

**Klinische, immunologische und molekulargenetische Differenzierung von
Patienten mit autosomal-dominantem Hyper-IgE-Syndrom (HIES) und
Patienten mit Verdacht auf HIES**

Phänotyp-Genotyp-Korrelationsanalysen und Entwicklung eines modifizierten HIES
Diagnostik-Scores



Lena-Friederike Schimke
2011

Aus der Kinderklinik und Kinderpoliklinik
im Dr. von Haunerschen Kinderspital
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. Dr. Christoph Klein

**Klinische, immunologische und molekulargenetische Differenzierung von Patienten
mit autosomal-dominantem Hyper-IgE-Syndrom (HIES) und
Patienten mit Verdacht auf HIES**

Phänotyp-Genotyp-Korrelationsanalysen und Entwicklung eines modifizierten HIES
Diagnostik-Scores

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Lena-Friederike Schimke
aus Hannover

2011

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

| | |
|---|---|
| Berichterstatter: | Prof. Dr. Bernd.H. Belohradsky |
| Mitberichterstatter: | Prof. Dr. Günter Schlimok Priv. Doz. Dr. Peter Kufer |
| Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter: | Prof. Dr. Peter Lohse Priv. Doz. Dr. Ellen Renner |
| Dekan: | Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR |
| Tag der mündlichen Prüfung: | 06.10.2011 |

INHALTSVERZEICHNIS

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG..... | 4 |
| 1.1 | <i>Hyper-IgE-Syndrome</i> | 4 |
| 1.2 | <i>Fragestellung</i> | 9 |
| 2 | PATIENTEN UND METHODEN..... | 10 |
| 2.1 | <i>Patientendaten</i> | 10 |
| 2.1.1 | Einschlusskriterien..... | 10 |
| 2.1.2 | Untersuchungsablauf | 11 |
| 2.1.3 | Phänotypische Einteilung | 11 |
| 2.2 | <i>Labormethoden</i> | 14 |
| 2.2.1 | Geräte..... | 14 |
| 2.2.2 | Reagenzien | 14 |
| 2.3 | <i>Molekulargenetische und immunologische Diagnostik</i> | 15 |
| 2.3.1 | Isolierung von gDNA aus peripheren Blutzellen | 15 |
| 2.3.2 | Polymerase-Kettenreaktion (PCR) | 16 |
| 2.3.3 | Gelelektrophorese..... | 19 |
| 2.3.4 | Aufreinigung des PCR-Produktes..... | 20 |
| 2.3.5 | Sequenzierung..... | 20 |
| 2.3.6 | Bestimmung von T _H 17-Zellen | 22 |
| 2.4 | <i>Statistische Methoden</i> | 23 |
| 3 | ERGEBNISSE..... | 24 |
| 3.1 | <i>Phänotypische Einteilung</i> | 24 |
| 3.1.1 | Gesicherte-HIES-Patienten | 24 |
| 3.1.2 | Verdacht-auf-HIES Patienten..... | 26 |
| 3.2 | <i>Molekulargenetische und immunologische Diagnostik</i> | 30 |
| 3.2.1 | Mutationsanalyse | 30 |
| 3.2.2 | Genotypische Einteilung..... | 35 |
| 3.2.3 | Bestimmung der T _H 17-Zellzahlen | 37 |
| 3.3 | <i>Korrelationsanalysen</i> | 40 |
| 3.3.1 | Phänotyp-Genotyp Korrelation | 40 |
| 3.3.2 | Korrelation von Genotyp und T _H 17-Zellzahlen | 43 |
| 3.3.3 | Korrelation von NIH-Score-Punkten, Genotyp und T _H 17-Zellzahlen | 44 |
| 3.4 | <i>Vereinfachung des Diagnoseschemas zum Hyper-IgE Syndrom</i> | 46 |
| 3.4.1 | Entwicklung des 5-Punkt-Score | 46 |
| 3.4.2 | Korrelation von 5-Punkte-Score, Genotyp und T _H 17-Zellzahlen | 51 |
| 3.4.3 | Vergleich von 5-Punkt-Score und NIH-Score Ergebnissen..... | 52 |
| 4 | DISKUSSION | 57 |
| 4.1 | <i>Patientendaten und phänotypische Einteilung</i> | 57 |
| 4.2 | <i>Mutationsanalyse</i> | 58 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 4.3 | <i>Korrelationsanalysen</i> | 62 |
| 4.3.1 | Phänotyp-Genotyp Korrelation | 62 |
| 4.3.2 | Korrelation von Genotyp und NIH-Score Punkten | 69 |
| 4.3.3 | Korrelation von Genotyp und T _H 17-Zellzahlen | 70 |
| 4.4 | <i>Vereinfachtes Diagnoseschema zum Hyper-IgE-Syndrom</i> | 72 |
| 4.4.1 | Der 5-Punkt-Score | 72 |
| 4.4.2 | Vergleich von NIH-Score und 5-Punkt-Score | 74 |
| 5 | ZUSAMMENFASSUNG | 76 |
| 6 | LITERATURVERZEICHNIS | 78 |
| 7 | ANHANG | 85 |
| 7.1 | <i>Abkürzungsverzeichnis</i> | 85 |
| 7.2 | <i>Abbildungsverzeichnis</i> | 87 |
| 7.3 | <i>Tabellenverzeichnis</i> | 88 |
| 7.4 | <i>Danksagung</i> | 89 |
| 7.5 | <i>Veröffentlichungen</i> | 90 |
| 7.6 | <i>Lebenslauf</i> | 91 |

1 Einleitung und Fragestellung

1.1 Hyper-IgE-Syndrome

Die Funktion des Immunsystems besteht unter anderem darin, den Körper vor Krankheitserregern zu schützen und fremde Mikroorganismen zu bekämpfen. Diese Aufgabe wird durch die Interaktion einer Vielzahl von zellulären und humoralen Komponenten des Immunsystems übernommen. Treten aufgrund erblicher Defekte Störungen in diesen komplexen Abwehrmechanismen auf, spricht man von einem primären Immundefekt (PID). Bei diesen Erkrankungen kann keine ausreichende Immunität entwickelt werden und es kommt zu häufigen und hartnäckigen Infektionen, manchmal von atypischen Erregern verursacht, die durch Standardtherapieverfahren oft nicht kuriert werden können. PIDs können isoliert, als Teil komplexer Syndrome oder in Kombination mit immunologisch bedingten Folgeerkrankungen wie Autoimmunerkrankungen oder Neoplasien auftreten.

Für viele primäre Immundefekte wurde die molekulargenetische Ursache in den letzten Jahrzehnten identifiziert, und Analysen von betroffenen Signalwegen tragen wesentlich zur Aufklärung von Pathomechanismen und Zusammenhängen der einzelnen Komponenten und Funktionen des Immunsystems, sowie zu einem besseren Verständnis von Krankheitsentstehung bei (Fischer 2007; Notarangelo et al. 2009).

Die Hyper-IgE-Syndrome (HIES) gehören zu den primären Immundefekten und können sowohl autosomal-dominant (AD-HIES) als auch autosomal-rezessiv (AR-HIES) vererbt werden. Bei etwa 80% der Patienten mit AD-HIES entsteht die Erkrankung jedoch aufgrund einer „de novo“ Mutation. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich vordergründlich mit dem AD-HIES, welches sowohl durch infektiologische Symptome als auch assoziierte Skelett- und Bindegewebsanomalien charakterisiert wird. Zum ersten Mal wurde das AD-HIES 1966 von Davis et al. als Hiob-Syndrom (auch Job's Syndrom) mit dem Symptomkomplex Ekzem, „kalte“ Staphylokokkenabszesse der Haut und respiratorischen Infektionen beschrieben (Davis et al. 1966). In den darauf folgenden Jahren wurde durch die Beobachtung zahlreicher Patienten mit ähnlichen Symptomen und der Assoziation von deutlich erhöhten Serum-IgE-Spiegeln das Hyper-IgE-Syndrom als solches definiert (Buckley et al. 1972; Buckley and Becker 1978; Daumling et al. 1980; Donabedian and Gallin 1983a; Leung and Geha 1988).

Zu den charakteristischen infektionsimmunologischen Symptomen haben sich vor allem Ekzem, erhöhtes Serum-IgE, Eosinophilie, Abszesse der Haut, Pneumonien mit Pneumatozelenbildung und rezidivierende Infektionen mit *Staphylococcus aureus* und *Candida albicans* herauskristallisiert. Des Weiteren sind in unterschiedlicher Häufigkeit und Ausprägung folgende Skelett- und Bindegewebsanomalien assoziiert: Hyperextensibilität der Gelenke, Frakturen ohne adäquates Trauma, Skoliose, dysmorphe Gesichtszüge (verbreiteter Nasenflügelabstand, Hypertelorismus, prominente Stirn und milde Prognathie) sowie ein verzögerter oder fehlender Milchzahnwechsel

(Belohradsky et al. 1987; Grimbacher et al. 1999a; Buckley 2001; Renner et al. 2002). Viele dieser Symptome manifestieren sich erst im Laufe von Wachstum und Entwicklung und können daher eine Diagnose und den Beginn einer rechtzeitigen adäquaten Therapie verzögern. Der erste Verdacht auf ein HIES entsteht häufig auf dem Boden der Trias Ekzem, erhöhtes Serum-IgE und Eosinophilie. Diese Symptome sind auch Kennzeichen der atopischen Dermatitis, so dass eine Differenzierung dieses Krankheitsbildes insbesondere bei Kindern in jungen Jahren eine Herausforderung darstellt. Die atopische Dermatitis manifestiert sich häufig bereits im Säuglings- und Kleinkindalter, kann aber auch bis ins Erwachsenenalter persistieren und äußert sich durch ein chronisches, juckendes Ekzem mit typischem Verteilungsmuster, weißem Dermographismus und hohen Serum-IgE-Werten. Darüber hinaus ist dieses Krankheitsbild häufig mit allergischem Asthma, Rhinokonjunktivitis allergica und Nahrungsmittelallergien assoziiert (Leung and Bieber 2003). Bedingt durch einen Barrieredefekt der Haut treten bei Patienten mit schwerer atopischer Dermatitis häufig Superinfektionen durch verschiedene Bakterien und Viren auf; *Staphylococcus aureus*, *Herpes simplex* und *Molluscum contagiosum* sind häufige Erreger, wodurch eine Abgrenzung zum HIES zusätzlich erschwert wird (Wollenberg and Klein 2007).

Lange Zeit war die Ursache des AD-HIES ungeklärt, und die Diagnose wurde aufgrund klinischer Manifestation und dem Ausschluss anderer primärer Immundefekte gestellt. Durch Analysen von betroffenen Patienten wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen eine genetische Ursache postuliert (Van Scoy et al. 1975; Blum et al. 1977; Buckley and Becker 1978) und 1999 von Grimbacher et al. ein autosomal-dominanter Erbgang bestätigt (Grimbacher et al. 1999a). Von Renner et al. wurde anhand klinischer Untersuchungen und Stammbaumanalysen das AR-HIES charakterisiert (Renner et al. 2004). Diese Patienten unterscheiden sich klinisch vom AD-HIES durch zusätzlich auftretende schwere Pilzinfektionen sowie schwere virale Infektionen mit *Molluscum contagiosum*, *Herpes zoster* und *Herpes simplex* sowie Auffälligkeiten des ZNS (subarachnoidale Blutungen oder ischämische Infarkte). Die beim AD-HIES assoziierten Skelett- und Bindegewebsanomalien sowie die Bildung von Pneumatozelen nach Pneumonien wurden bei AR-HIES Patienten nicht beobachtet (Renner et al. 2004).

Zahlreiche Studien versuchten immunologische Aspekte dieser komplexen Erkrankung aufzuklären. Diese beinhalteten zu Beginn der Syndrombeschreibung die Antikörperproduktion und Regulation der IgE-Synthese (Buckley and Becker 1978; Dreskin et al. 1987; Vercelli et al. 1990). Verschiedene Studien berichteten von einer defekten Granulozytenchemotaxis bei Patienten mit HIES (Hill and Quie 1974; Donabedian and Gallin 1983b) sowie einem Ungleichgewicht von T_H1- und T_H2-Zellen, was die Infektionsanfälligkeit gegenüber Bakterien jedoch immer nur teilweise erklärte (Shirafuji et al. 1999; Netea et al. 2002). Weitere Studien konzentrierten sich auf die Produktion und Interaktion von Zytokinen, insbesondere Interleukin-4 (IL-4) und Interferon- γ (IFN γ), die unter anderem die IgE-Synthese regulieren (Del Prete et al. 1989; King et al. 1989; Paganelli et al. 1991; Rousset et al. 1991). Borges et al. fanden im Jahr 2000 bei HIES-Patienten

einen Defekt im IL-12/INF γ Signalweg nach Stimulation von Lymphozyten mit *Staphylococcus aureus* und vermuteten darin die Ursache der gestörten IgE Produktion sowie einer inadäquaten Antwort auf lokale Entzündungsreaktionen, woraus die für HIES typischen „kalten Abszesse“ resultierten (Borges et al. 2000). Eine Zytokin- und Chemokindysregulation bei HIES-Patienten wurde auch von Chehimi et al. und Ito et al. beobachtet (Chehimi et al. 2001; Ito et al. 2003). Die Beschreibung von Toll-like-Rezeptoren (TLR), die inflammatorische Signaltransduktionswege beeinflussen und sowohl angeborene als auch erworbene Immunantworten regulieren (Akira and Takeda 2004), und die Beobachtung von TLR-Defekten bei Tieren und Menschen mit erhöhter Infektionsanfälligkeit gegenüber pyogenen Bakterien legte den Verdacht nahe, dass Defekte in diesen Signalwegen eine grundlegende Ursache des HIES darstellen könnten. Renner et al. und Hawn et al. widerlegten jedoch die Assoziation von Defekten in TLR-Signalwegen und HIES, wobei in der Studie von Renner et al. erneut ein Ungleichgewicht der T-Zell-Antwort beschrieben wurde, die in einer verminderten Immunantwort als Ursache für das HIES resultierte (Hawn et al. 2005; Renner et al. 2005). Die Vermutung eines Gendefektes in zytokinabhängigen Signaltransduktionswegen kehrte immer wieder, zusammenfassend konnte bis dahin jedoch kein einheitlicher zellulärer Defekt gefunden werden, der bei allen HIES-Patienten regelmäßig auftrat und die immunologischen Phänomene ausreichend erklärte.

Ein entscheidender Durchbruch gelang Minegishi et al., als diese Autoren 2006 eine homozygote Mutation in TYK2 identifizierten - einer Tyrosinkinase der JAK Familie mit wichtiger Funktion in den IL-12 und Typ-I-IFN abhängigen Signaltransduktionswegen (IL-12 und IFN abhängige Phosphorylierung von STAT4). Diese Beobachtung stammte von einem Patienten mit Ekzem, erhöhtem Serum-IgE und einer pathologischen Infektionsanfälligkeit gegenüber Viren, Pilzen und Mykobakterien (klinischem AR-HIES) (Minegishi et al. 2006). Woellner et al. untersuchten 15 autosomal-rezessive Familien mit HIES durch Genotypisierung und Linkage-Analysen, konnten jedoch bei keinem HIES-Patienten eine TYK2 Mutation finden (Woellner et al. 2007). Bei dem von Minegishi et al. beschriebenen Patienten handelt es sich demnach um eine Variante des AR-HIES, die den Verdacht nahe legte, dass weitere Defekte in JAK/STAT Signalwegen die Ursache für Hyper-IgE-Syndrome (AD-HIES und mögliche Varianten des AR-HIES) darstellen können. Es folgten weitere genetische Analysen und 2007 wurden dominant-negative Mutationen im Gen „Signal Transducer and Activator of Transcription 3“ (*STAT3*) als Ursache für das AD-HIES identifiziert (Holland et al. 2007; Minegishi et al. 2007).

STAT3 ist ein zytoplasmatischer Transkriptionsfaktor, der in allen Zellen des menschlichen Körpers exprimiert wird. Ein vollständiges Fehlen führt zu embryonaler Letalität, was durch Studien an *Stat3* knockout Mäusen gezeigt wurde (Takeda et al. 1997). Nach Aktivierung durch Phosphorylierung bildet STAT3 Dimere, wandert in den Zellkern und reguliert dort die Expression verschiedener Zielgene (Levy and Loomis 2007).

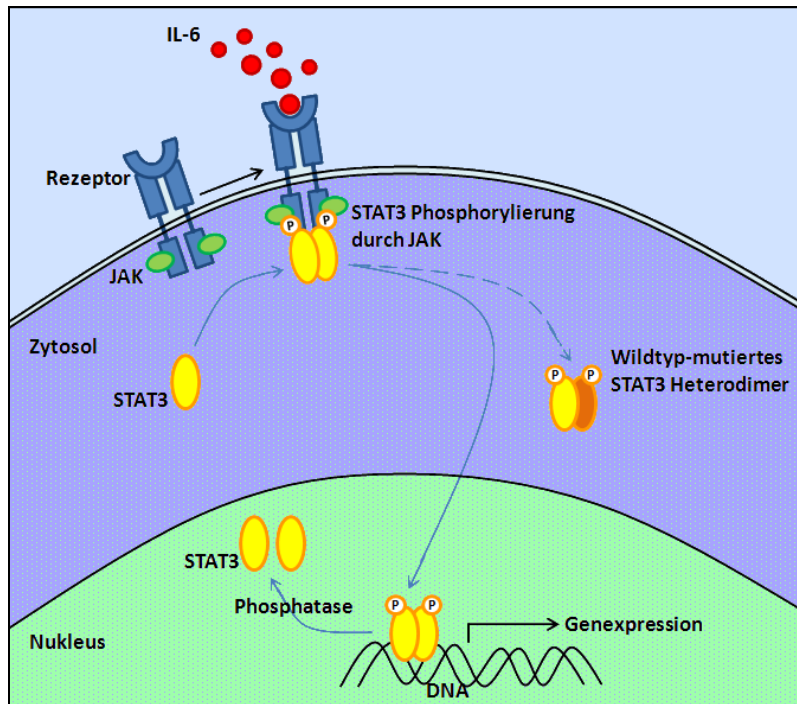


Abbildung 1: Schematische Darstellung des STAT3-Signalweges [modifiziert nach (Levy and Loomis 2007)]

Zytokine (IL-6) binden an ihren spezifischen Rezeptor, was durch Aktivierung von JAKs zur Phosphorylierung und Dimerisierung von STAT3 führt. STAT3-Dimere wandern in den Zellkern und regulieren durch Bindung an spezifische DNA-Regionen die Expression von Zielgenen. Wildtyp-mutierte STAT3-Heterodimere können nicht an DNA binden und üben einen dominant-negativen Effekt auf die STAT3 Funktion aus.

STAT3 wird durch verschiedene Zytokine (IL-6-, IL-2-, Interferon-Familie) stimuliert und vermittelt eine Vielzahl von Signalen in unterschiedlichen Zelllinien und Geweben (z.B. Apoptose, Zelldifferenzierung und -überleben, Malignomentstehung, anti-inflammatorische Wirkung). Eine Zytokingruppe von besonderem Interesse stellt die IL-6-Zytokinfamilie dar, die bei der Immunantwort, Entzündungsreaktionen und der Regulation von Zellwachstum, -überleben und -differenzierung eine bedeutende Rolle spielt (Akira 2000; Hirano et al. 2000; Levy and Lee 2002). Des Weiteren ist STAT3 an der Differenzierung von IL-17 produzierenden CD4⁺-T-Zellen (T_H17-Zellen) beteiligt. Dabei handelt es sich um eine Subpopulation der T-Zellen, die eine wichtige Funktion bei der Abwehr von extrazellulären Bakterien und Pilzen haben und eine wichtige Rolle bei der Genese von Autoimmunität und Entzündung sowie der Entstehung von allergischen Reaktionen spielen (Bettelli et al. 2007; Tesmer et al. 2008).

Bisher gibt es keine kurative Therapie für das AD-HIES, und die Behandlung besteht aus einer symptomatischen antibakteriellen, antimykotischen und antiviralen Therapie. Eine rechtzeitige parenterale Antibiotikatherapie bei schweren akuten Infektionen sowie eine Dauerprophylaxe mit einem staphylokokkenwirksamen Antibiotikum sind zur Vermeidung von Infektionskomplikationen besonders wichtig. Therapieversuche mit anderen, das Immunsystem beeinflussenden Medikamenten (IFN γ , Glukokortikoide, Ciclosporin A), zeigten bisher keinen

nennenswerten Erfolg (King et al. 1989; Etzioni et al. 1997). Ein weiterer Therapieansatz ist die Gabe von intravenösen Immunglobulinen (IVIG), die einen positiven Effekt auf inflammatorische Prozesse (z.B. Hemmung proinflammatorischer Zytokine und Beeinflussung der Antikörpersynthese) ausüben und bei einigen Patienten zur Abnahme der Serum-IgE-Werte sowie einer geringeren Anzahl von Infektionen führte (Wakim et al. 1998; Waldfahrer et al. 1999; Bilora et al. 2000).

Die Therapie der rezidivierenden Abszesse muss häufig chirurgisch erfolgen. Die chirurgische Entfernung von Pneumatozelen sollte dagegen sehr zurückhaltend erfolgen, da sich Pneumatozelen auch im späteren Verlauf noch spontan zurückbilden können und Lungengewebe unbedingt erhalten werden soll. Da HIES-Patienten häufig ein wenig ausgeprägtes Krankheitsempfinden im Verhältnis zu den schwerwiegenden Infektionen haben, ist es besonders wichtig, bereits ein geringes Krankheitsgefühl ernst zu nehmen und rechtzeitig eine medikamentöse Therapie einzuleiten. Durch eine frühzeitige Diagnose und adäquate Infektionsbehandlung können HIES-Patienten bei guter Lungenfunktion das Erwachsenenalter erreichen. Die Mehrzahl der Patienten befindet sich jedoch derzeit noch im Kindes- und jungen Erwachsenenalter, so dass eine Aussage über die Lebenserwartung noch nicht möglich ist.

Die einzige kurative Therapie des Immundefektes stellt die hämatopoetische Stammzelltransplantation (HSCT) dar, die bei einigen Patienten mit AR-HIES bereits erfolgreich durchgeführt wurde (Bittner et al. 2010; Gatz et al. 2010). Die ersten Versuche der HSCT bei zwei Patienten mit AD-HIES 1998 und 2000 zeigten leider keinen Langzeiterfolg (Nester et al. 1998; Gennery et al. 2000). Kürzlich wurde jedoch von zwei Patienten mit molekulargenetisch gesichertem AD-HIES berichtet, die nach erfolgreicher HSCT eine Regeneration des Immundefektes und nach Beobachtung von 14 und 10 Jahren keine Komplikationen zeigten (Goussetis et al. 2010). Demnach stellt die HSCT bei Patienten mit AD-HIES besonders bei progressiver Lungenerkrankung oder malignen Erkrankungen eine kurative Therapie dar, die nach Abwägung von Risiken und möglichen Langzeitkomplikationen neu diskutiert und in Betracht gezogen werden sollte.

1.2 Fragestellung

Die Entdeckung von heterozygoten STAT3-Mutationen bei AD-HIES Patienten wirft die Frage auf, inwieweit ein klassischer HIES-Phänotyp mit einer Mutation in STAT3 assoziiert ist, oder ob auch Patienten mit milderem HIES-Phänotyp eine STAT3-Mutation tragen. Welche funktionellen Auswirkungen ein verändertes STAT3 Protein hervorruft und in welchem Maß sich dadurch HIES-Symptome erklären lassen, ist bisher ungeklärt. Des Weiteren stellt sich die Frage, ob sich aus der genetischen Definition des HIES neue Möglichkeiten für die Diagnostik und Therapie des AD-HIES ergeben.

Ziel dieser Arbeit ist:

- die Korrelation zwischen dem klassischen AD-HIES-Phänotyp und dem STAT3-Genotyp zu erstellen,
- eine klinische und laborchemische Abgrenzung von AD-HIES Patienten und solchen mit HIES ähnlichem Phänotyp (z.B. atopische Dermatitis) herauszuarbeiten
- und anhand der Ergebnisse Parameter für einen diagnostischen Algorithmus zu erstellen.

Dafür erfolgte die klinische Untersuchung, STAT3 Mutationsanalyse und Bestimmung der T_H17-Zellproduktion bei einem ausgewählten Kollektiv von 78 Patienten mit klassischem HIES und milder Variante des HIES. Die Ergebnisse wurden analysiert und neue Wege für die Diagnostik des HIES erschlossen.

2 Patienten und Methoden

2.1 Patientendaten

In der Infektionsimmunologischen Abteilung des Dr. von Haunerschen Kinderspitals (Haunersches Kinderspital) der Ludwig-Maximilians-Universität München (LMU) existiert eine Datenbank aller zum HIES untersuchten Patienten. Diese Datenbank umfasste im Jahr 2007 113 Patienten mit unterschiedlicher ethnischer Herkunft aus ganz Deutschland.

Für diese Studie wurden 41 Patienten, darunter 29, die bereits 2002 im Rahmen einer medizinischen Dissertation am Haunerschen Kinderspital zum HIES genauer untersucht wurden (Renner 2002), anhand spezifischer Merkmale ausgewählt. Durch die Kooperation mit der University of Salt Lake City, UT (USA), der University of Washington und dem Seattle Children's Hospital, Seattle, WA (USA) kamen 16 Patienten aus den USA hinzu. Weitere 31 Patienten wurden von auswärtigen Kliniken aus Deutschland, Österreich und der Schweiz im Zeitraum von Juli 2007 bis Dezember 2008 mit dem Verdacht auf HIES an das Haunersche Kinderspital überwiesen, was eine Gesamtzahl von 88 Studienpatienten ergibt.

Vor Einschluss wurden Patienten und gegebenenfalls Eltern über die von der Ethikkommission der LMU genehmigte Studie aufgeklärt. Es erfolgte ein schriftliches Einverständnis von volljährigen Patienten und von Erziehungsberechtigten minderjähriger Patienten.

2.1.1 Einschlusskriterien

Die Kriterien nach denen Patienten aus der bestehenden Datenbank für diese Studie ausgewählt wurden setzten sich aus folgenden Symptomkombinationen zusammen:

- chronisches Ekzem,
- erhöhtes Serum-IgE oder
- Bluteosinophilie

mit einem der folgenden Symptome:

- rezidivierende Infektionen der Haut oder Atemwegsorgane
- Abszesse der Haut und/oder inneren Organe
- Vorhandensein assoziierter Bindegewebsanomalien:
Milchzahnpersistenz, Hyperextensibilität der Gelenke, Frakturen ohne adäquates Trauma, Skoliose, HIES-typische Gesichtszüge

Des Weiteren wurden neue Patienten, die mit der Verdachtsdiagnose HIES an das Haunersche Kinderspital zwischen Juli 2007 und Dezember 2008 überwiesen wurden, in die Studie eingeschlossen.

2.1.2 Untersuchungsablauf

Zunächst erfolgte nach Aktenstudie der Patienten der HIES Datenbank die Auswahl von 41 Patienten aufgrund der genannten Einschlusskriterien. Vier Patienten waren bereits verstorben (einer mit klinisch diagnostiziertem AD-HIES, drei mit AR-HIES) und mussten von der Studie ausgeschlossen werden. Bei 68 Patienten wurde der Verdacht auf ein HIES aufgrund fehlender klinischer Symptome oder eindeutig diagnostiziertem atopischem Ekzem und allergisch bedingten hohen Serum-IgE-Werten ausgeschlossen.

Unter den 41 ausgewählten Patienten (30 Jungen und 11 Mädchen) befanden sich die 29 Patienten, von denen eine ausführliche Dokumentation der klinischen und laborchemischen Untersuchungen aus der 2002 erhobenen Studie bereits vorhanden war (Renner 2002). Bei 14 Patienten lag zusätzlich isolierte genomische DNA, die in dieser Studie verwendet wurde, vor. Alle Patienten wurden für ein klinisches Follow-up, die Studienaufklärung und Einverständniserklärung sowie gegebenenfalls zur Gewinnung von Zellmaterial für die molekulargenetische und immunologische Diagnostik angeschrieben. Bei vier Patienten konnte der Kontakt aufgrund nicht ermittelbarer Adressen nicht mehr hergestellt werden, sechs Patienten waren an einer Studienteilnahme nicht interessiert.

Für diese Studie wurde folglich eine Gesamtgruppe von 78 Patienten (16 aus den USA, 31 aus der HIES-Datenbank und 31 neu überwiesene Patienten des Haunerschen Kinderspitals) untersucht, darunter 50 männlichen und 28 weiblichen Geschlechts, mit einem mittleren Alter von 19,6 Jahren (Altersspanne: 8 Monate–57 Jahre).

Die molekulargenetischen- und immunologischen Untersuchungen erfolgten sowohl am Center for Immunity and Immunotherapies, Seattle Children's Research Institute, University of Washington, Seattle, WA (USA) als auch in Zusammenarbeit mit der Abteilung für Molekulargenetik des Instituts für Klinische Chemie, LMU Klinikum Großhadern in München.

2.1.3 Phänotypische Einteilung

Die phänotypische Einteilung der Patienten erfolgte anhand eines klinisch-immunologischen Scoring-Systems zum HIES (NIH-Score), in dem alle charakteristischen HIES-Symptome sowie Laborwerte in einem Punktwert zusammengefasst werden (Tabelle 1).

Ursprünglich wurde dieser Score für die Evaluation der phänotypischen Variabilität von Angehörigen eines Indexpatienten mit klinischem HIES von einer Gruppe am National Institutes of Health (NIH) entwickelt. Nach Analysen von 30 HIES-Patienten und deren Familien wurden 21 Symptome, die mit HIES assoziiert sind, mit unterschiedlicher Gewichtung für die Definition des HIES zusammengestellt (Grimbacher et al. 1999b). Die Einteilung der HIES definierenden Grenzen wurde durch die Analyse einer großen Anzahl von Patienten mit dem Anfangsverdacht auf HIES und einer klinisch-genetischen Definition des HIES von Renner 2002 optimiert. Ab einer

Anzahl von ≥ 40 Punkten im NIH-Score war ein HIES sehr wahrscheinlich und zwischen 20-40 Punkten bestand der Verdacht auf HIES (Renner 2002). Diese Einteilung wurde auch in der vorliegenden Arbeit angewendet.

Die Summe der Score-Punkte setzte sich aus allen Symptomen zusammen, die im Verlauf der Erkrankung aufgetreten waren und spiegelte somit den Zeitpunkt des größten Verdachts auf HIES wieder.

49 Patienten (63%), davon 30 männliche und 19 weibliche mit einem Altersdurchschnitt von 23,5 Jahren (Alterspanne: 2-51 Jahre) erreichten einen Score von ≥ 40 Punkten und bildeten die Kohorte der klinisch-gesicherten HIES-Patienten.

Die „Verdacht auf HIES“ Kohorte umfasste 29 Patienten mit einem NIH-Score < 40 Punkten, 20 männliche und 9 weibliche mit einem Altersdurchschnitt von 13,0 Jahren (Altersspanne: 8 Monate-57 Jahre). In dieser Kohorte erreichten 26 Patienten einen NIH-Score zwischen 20 und 40 Punkten, drei Patienten (ID# 12, 14 und 19) wiesen weniger als 20 Punkte auf und wurden als „HIES sehr unwahrscheinlich“ bezeichnet.

Score erhoben am: _____ Geschlecht: M W NAME: _____
 geb.: _____

| Klinische Symptome | Punktwertung ¹ | | | | | | | | | | Punkt- zahl |
|---|---|---------|-------------|-----------|-----------|-----------|----------------|---------|---------------|-------|----------------|
| | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 10 | |
| Höchster IgE-Wert im Serum (IU/ml) | < 200 | 200-500 | | | 501-1000 | | | | 1001-2000 | >2000 | |
| Hautabszesse | keine | | 1-2 | | 3-4 | | | | >4 | | |
| Pneumonien (Zahl der Episoden seit Geburt) | keine | | 1 | | 2 | | 3 | | >3 | | |
| Parenchymale Lungenveränderungen | keine | | | | | | Bronchiectasen | | Pneumatocelen | | |
| Zurückbehaltene Milchzähne | keine | 1 | 2 | | 3 | | | | >3 | | |
| Skoliose, maximale Verkrümmung | <10° | | 10°-14° | | 15°-20° | | | | >20° | | |
| Frakturen ohne adäquates Trauma | nein | | | | 1-2 | | | | >2 | | |
| Höchste Eosinophilenzellzahl (Zellen/□l) | <700 | | | 700-800 | | | > 800 | | | | |
| Charakteristisches Gesicht | nein | | mild | | | | vorhanden | | | | |
| Mittelliniendefekt ² | nein | | | | vorhanden | | | | | | |
| Neugeborenenexanthem | nein | | | | vorhanden | | | | | | |
| Ekzem (schwerste Ausprägung eintragen) | nein | mild | mässig | | schwer | | | | | | |
| Obere Atemwegsinfektionen pro Jahr (z.B. Rhinitis, Otitis, Sinusitis) | 1-2 | 3 | 4-6 | | >6 | | | | | | |
| Candidiasis | nein | oral | Fingernägel | | mucocutan | | | | | | |
| Andere schwere Infektionen (z.B. Osteomyelitis, Meningitis, Sepsis) | keine | | | | vorhanden | | | | | | |
| Infektion mit tödlichem Ausgang | nein | | | | vorhanden | | | | | | |
| Gelenküberstreckbarkeit | nein | | | | vorhanden | | | | | | |
| Lymphom | nein | | | | vorhanden | | | | | | |
| Nasenbreite ³ (Nasenflügelabstand) Messwert: _____ mm | <1 SD | 1-2 SD | | >2 SD | | | | | | | |
| Hoher Gaumen | nein | | vorhanden | | | | | | | | |
| Alterskorrektur (zusätzliche Punkte bei jungem Alter) | > 5 Jahre | | | 2-5 Jahre | | 1-2 Jahre | | < 1Jahr | | | |
| Organabszesse (z.B. Lymphknoten-, Leber-, Nierenabszess) | ausserhalb der Punktwertung, bitte einkreisen : keine vorhanden | | | | | | | | | | |
| Gefässerkrankungen (z.B. Herz, ZNS) | ausserhalb der Punktwertung, bitte einkreisen : keine vorhanden | | | | | | | | | | |

¹ Eintragung in der am weitesten rechts gelegenen Spalte ergibt den maximal möglichen Punktwert für diesen Befund

² z.B. Gaumenspalte, Zungenspalte, Wirbelkörperanomalien

³ entsprechend der Normwerttabelle für Alter und Geschlecht (aus Farkas et al. 1994)

nach Grimbacher B, Schaffer AA, Holland SM, et al. (1999)
 Genetic linkage of hyper-IgE syndrome to chromosome 4. *Am.J.Hum.Genet.* 65 (3):735-744

Momentane Interpretation:

>40 Pkt.: HIES
 20-40 Pkt.: V.a. HIES
 < 20 Pkt.: kein HIES

Gesamtpunktzahl:

Tabelle 1: Scoringsystem zum Hyper-IgE-Syndrom

13

2.2 Labormethoden

2.2.1 Geräte

| Gerät | Typ | Hersteller |
|-----------------------|---|--|
| Zentrifugen | Centrifuge 5415 C Centrifuge 5417 C Megafuge 1.0 | Eppendorf, Hamburg Eppendorf, Hamburg Heraeus, Hanau |
| Kühlzentrifuge | Centrifuge 5417 R | Eppendorf, Hamburg |
| Elektrophoresekammern | Horizon 58 und 11.14 | Invitrogen Karlsruhe |
| Spannungsgerät | | Amersham Biosciences, Freiburg |
| Photoanlage | | MWG-Biotech, Ebersberg |
| Brutschrank | 5% CO ₂ Brutschrank | |
| Thermocycler | PTC 225 Peltier Thermal Cycler GeneAmp PCR System 9700 GeneAmp PCR System 9600 | Biozym, Hessisch Oldendorf PE Applied Biosystems, Weiterstadt PE Applied Biosystems, Weiterstadt |
| DNA-Sequenzierer | 3130 Gene Analyzer | PE Applied Biosystems, Weiterstadt |
| Flowzytometer | BD FACS Calibur | BD Biosciences, San Diego/CA oder Heidelberg |
| Software | BD CellQuest™ Pro, Version 4.0.2 DNA Analyzer | BD Biosciences, San Diego/CA oder Heidelberg |

Tabelle 2: Geräte

2.2.2 Reagenzien

| Reagenz | Hersteller |
|--|--|
| 0,5 M EDTA | Applied Biosystems, Darmstadt |
| EDTA 3 M Natriumacetat Ethidiumbromid Ficoll-Ladepuffer Phorbol 12-Myristat 13-Acetat (PMA) Ionomycin | Sigma-Aldrich, Taufkirchen bei München |
| Äthanol Natriumchlorid | Merck, Darmstadt |
| Tris-Cl Agarose | Invitrogen, Karlsruhe |
| Borsäure | Roth, Karlsruhe |
| Aqua bidest. | Baker, Deventer/Niederlande |
| Gene Ruler™ DNA ladder mix | Fermentas Life Sciences, St.Leon-Rot |
| dNTP | GE Healthcare, Buckingham, UK |
| ExoSAP-IT™ | united states biochemicals (usb), Staufen |
| QiAMP blood mini Kit QIA Hot Start Taq DNA Polymerase PCR Puffer | Qiagen, Heidelberg Qiagen, Hilden Qiagen, Hilden |
| Big Dye™ Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Kit 5x Sequenzierpuffer | PE Applied Biosystems, Weiterstadt |
| Hi di Formamide | PE Applied Biosystems, Weiterstadt |

Tabelle 3: Reagenzien

| Reagenz | Hersteller |
|---|--|
| Ficoll-Paque Plus PBS Dulbecco RPMI FBS | Biochrom, Berlin |
| BD Cytotfix/Cytoperm™ Plus Phycoerythrin-konjugiertes Anti-CD4 | BD Biosciences, San Diego/CA oder Heidelberg |
| Alexa Fluor 647 konjugierter anti-17A | Natutec, Frankfurt |
| FITC konjugierter anti-INFy | Biozol, Eching |
| Penicillinstreptomycin | |

Fortsetzung **Tabelle 3:** Reagenzien

Verwendete Oligonukleotid-Primer wurden als Auftragssynthesen von der Firma Thermo Scientific (Thermo Fisher Scientific GmbH, Ulm, Deutschland) und Invitrogen™ (Invitrogen™ Corporation, Carlsbad, CA, USA) hergestellt.

2.3 Molekulargenetische und immunologische Diagnostik

Für die Gewinnung von Zellmaterial zur molekulargenetische Untersuchung wurde von jedem Patienten entweder ein Röhrchen mit EDTA antikoaguliertem oder heparinisiertem venösem Blut abgenommen. Die Blutabnahme erfolgte entweder im Haunerschen Kinderspital oder bei Hausärzten aus ganz Deutschland mit anschließendem Versand nach München.

2.3.1 Isolierung von gDNA aus peripheren Blutzellen

Die genomische DNA (gDNA) wurde aus kernhaltigen peripheren Blutzellen unter Verwendung des „QiaAmp DNA Blood Mini Kit“ (Qiagen, Heidelberg, Deutschland) nach Angaben des Herstellers isoliert. Je 200 µl Substrat (EDTA-Blut oder Buffy coat) wurden mit einer Proteinase und einem Puffer versetzt. Durch Erhöhen der Temperatur wurden die Zellen lysiert. Das Blut wurde dann über eine zentrifugierbare Filtersäule pipettiert, an die sich die freiliegende DNA anhaftete. Nachdem durch zwei Waschvorgänge überschüssiges Zellmaterial und Puffer entfernt wurden, konnte die gDNA mit AE-Puffer eluiert werden.

(AE-Puffer: 10mM Tris-Cl, 10mM EDTA, ph=9,0)

Die Konzentration der isolierten gDNA wurde durch die photometrische Messung der optischen Dichte (OD) mit folgender Formel berechnet.

$$c \text{ [}\mu\text{g/ml]} = 50 \times \text{OD} \times V$$

c=Konzentration
V=Verdünnungsfaktor
50=Multiplikationsfaktor für dsDNA
(50µg DNA haben eine OD von 1)

War die gDNA nicht amplifizierbar, wurde die Konzentration durch eine erneute Präparation und anschließende Alkoholfällung erhöht. Hierfür wurde die in 200 µl AE-Puffer gelöste gDNA mit 5 µl tRNA (-20°C) versetzt und erneut mit dem QiAmp DNA Blood Mini Kit (Qiagen) behandelt. Anschließend erfolgte eine Alkoholpräzipitation, für die die gDNA mit 4M NaCl auf eine 200 mM Konzentration eingestellt wurde und mit 100% Äthanol (-20°C) in der 2,5-fachen Menge des gDNA Aliquots gefällt wurde. Nachdem die Lösung für 30 Minuten bei -80°C eingefroren war, erfolgte eine Zentrifugation bei -4°C und 14000 rpm für weitere 30 Minuten. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet an der Luft getrocknet und erneut in 200 µl AE-Puffer aufgenommen.

2.3.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Der Goldstandard zur Amplifikation verschiedener DNA Abschnitte ist die Polymerase-Kettenreaktion („polymerase chain reaction“, PCR). Diese Methode wurde von Kary Mullis 1983 erfunden und ermöglicht eine bestimmte DNA-Sequenz aus der Gesamtheit des Genoms zu isolieren und um ein Vielfaches zu kopieren (Mullis and Faloona 1987).

Jede PCR-Reaktion setzt sich aus folgenden Komponenten zusammen:

DNA: Die Original-DNA, die den bekannten, zu kopierenden Abschnitt enthält.

Oligonukleotide – Primer: Diese chemisch synthetisierten Fragmente von ca. 20 Basenpaaren sind komplementär zum Einzelstrang. Sie sind so gewählt, dass sie sich ca. 100 Basenpaare vor und hinter der zu vervielfältigenden Sequenz anlagern und jeweils den Startpunkt für die Neusynthese der DNA durch die Polymerase festlegen.

dNTPs: Nukleotidlösung aus gleichem Anteil der vier Basen der DNA: Guanin, Cytosin, Adenin und Thymin jeweils gekoppelt an ein Zuckerphosphatmolekül, welche die einzelnen Bausteine der Polymerase sind und zu neuen DNA-Strängen synthetisiert werden.

DNA-Polymerase: Das Enzym DNA-Polymerase startet die Synthese eines DNA Abschnittes in 5'-3' Richtung durch Einbau der spezifischen Nukleotide.

Pufferlösung und Mg²⁺-Ionen: Diese stellen eine optimale Umgebung für die Polymerase sicher und sind für ihre Funktion essentiell.

Die PCR läuft in drei sich wiederholenden Schritten ab:

1. Denaturierung: Hier wird durch Erhitzen auf 93-97°C die DNA in ihre beiden Einzelstränge aufgeschmolzen, sodass die Sequenzen für die Primeranhaftung freiliegen.

2. Hybridisation der Primer: Nach Abkühlen auf eine primer-spezifische Temperatur binden diese an die komplementäre DNA-Sequenz jedes Einzelstranges.

3. DNA-Synthese: Die Temperatur wird üblicherweise auf 72°C erhöht. Am 3' Ende des Primers beginnt das Enzym Polymerase die einzelnen Nukleotide einzubauen, sodass ein zum Einzelstrang

komplementärer DNA-Strang synthetisiert wird. Es entsteht erneut ein Doppelstrang, der im nächsten Zyklus denaturiert wird und als Matrize für weitere Synthesen dient.

Die Anzahl der sich wiederholenden Zyklen hängt hauptsächlich von der Ausgangskonzentration der DNA ab und beträgt üblicherweise 30-50 Zyklen.

Nach Ablauf der gewünschten Zyklen erfolgt eine Inkubationszeit, um noch unvollständige Produktmoleküle fertigzustellen (Saiki et al. 1985; Bauer et al. 2008).

Für die Amplifikation von STAT3 wurde nach folgendem PCR-Protokoll für jedes Exon eine Gesamtlösung von 25,125 μ l in ein 0,5 ml Eppendorf-Röhrchen pipettiert:

| | |
|---------------------------|------------------------------|
| Puffer | 2,5 μ l |
| dNTPs | 2,5 μ l |
| Taq Polymerase | 0,125 μ l |
| H ₂ O | 16,0 μ l |
| Primer Forward 20 μ M | 0,5 μ l |
| Primer Reverse 20 μ M | 0,5 μ l |
| <u>gDNA</u> | <u>3,0 μl</u> |
| Gesamtlösung | 25,125 μ l |

Bei einer gDNA Konzentration unter 10 μ g/ml wurde für jede Probe die doppelte Menge gDNA eingesetzt. Das Gesamtvolumen von 25,125 μ l wurde jedoch durch den Einsatz von entsprechend weniger H₂O konstant gehalten.

Die verwendeten Primer wurden am Center for Immunity and Immunotherapies, Seattle Children's Research Institute, University of Washington, Seattle, USA und mit Hilfe von Professor Lohse, Abteilung für Molekulargenetik, Institut für Klinische Chemie, LMU Klinikum Großhadern erstellt (vergl. Tabelle 4). Jeder Primer wurde mit TE-Puffer in einer 200 μ M Stock-Lösung gelöst, die dann je nach Bedarf auf 20 μ M (für die PCR) und 5 μ M (für die Sequenzreaktion) mit Aqua dest. verdünnt wurden.

TE-Puffer: 10 mM Tris Cl (pH 7.5), 1 mM EDTA (pH 8.0)

| kodierendes Exon | Primersequenz | |
|------------------|-----------------------------|--------------------------------|
| | Vorwärts (5' → 3' Richtung) | Rückwärts (3' → 5' Richtung) |
| 2 | CTGTGTTGGGCAATGGCTACTTC | GATCTCATTTCATCCCATCACCTG |
| 3 | CTGTGTTTGTGTGTATGCGTCG | AGAGATGCTTCCAGGAAAGAACAC |
| 4 | GCCGACAGAGAGCCTTACC | CCATTGGGTCTGTTGGATTC |
| 5 | CGTCTCAAGCCAAACAAGAAGG | GTAGGAGGATCGCTTGGGCC |
| 6 | CCTGCAGGTCCTGCATGTATC | GCCCGCCTTAAGATCTAACAGAG |
| 7 - 8 | CAAAGGAGCCTGGTCATTAAGGAC | TGTGGGCCTGCAGTTAAGATCAG |
| 9 | TCCATGTCTTCAGTATTCCTTCCC | CTCCACCACAAAGGCACTGAG |
| 10 | GATGCTGGAGGAGAGAATCGTG | GAGAGCAAGCAGATAGTATGGCAAC |
| 11 | GCCTGTAATTATAGACAGCTTGGCC | CAGACACGTAATGACAATGCACC |
| 12 - 14 | GAGGTGTTATGTTGCGCTGATC | CTGTTTATGTCACCTTGGCCTG |
| 15 | GACTGGTCTCGAACTCCTGG | GTACGTAGCCTCTCACCGATTCTGCTGCAG |
| 16 - 17 | GTGAGATGCGGGTGAAGAGATTTC | GCCTAATGCTCAGTAGACATGGC |
| 18 | GTGGGATGAATGTGTGTGTGTTTC | TCTACCTTCAGGCAGGTCCTACTG |
| 19 - 20 | GTAGGACCTGCCTGAAGGTAGACG | AGGTGCTTGCAACTAGAAGCAGTG |
| 21 | GCTTAAGTCTTTTCCCCTTCGAGG | CCAGGTTATTCAGGCATTTGCC |
| 22 | GCTGCTAGTGCCTGGGAGATC | GCCATCAAACCTCTGGTCTCC |
| 23 | GGAGACCAGAGTTTGATGGC | GCCACTCACCCAGCCTCAAC |
| 24 | GAGATTGGATAGCAGTGGTAGCCTG | CTGATCATGGGTCTCAGAGAACAC |

Tabelle 4: Primer-Sequenzen

Die Reaktionsschritte der PCR liefen im PTC 225 Peltier Thermal Cycler (Bio RAD, München, Deutschland) und werden im Folgenden erläutert.

Programm für Exon 2, 3, 5, 6, 7-8, 9, 10, 11, 12-14, 16-17, 18, 19-20, 21 und 24

| | Temperatur | Zeit | Zyklen |
|-------------------------|------------|---------|--------|
| Denaturierung | 95°C | 10 min | 40 |
| Denaturierung | 95°C | 20 sec | |
| Hybridisation/Annealing | 62°C | 20 sec | |
| Synthese/Elongation | 72°C | 30 sec | |
| Elongation | 72°C | 40 min | |
| | 8°C | forever | |

Für die Exons 4, 15, 22 und 23 lautete das Programm wie folgt:

| | Temperatur | Zeit | Zyklen |
|-------------------------|------------|---------|--------|
| Denaturierung | 95°C | 10 min | 36 |
| Denaturierung | 95°C | 20 sec | |
| Hybridisation/Annealing | 60°C | 20 sec | |
| Synthese/Elongation | 72°C | 45 sec | |
| Elongation | 72°C | 5 min | |
| | 8°C | forever | |

2.3.3 Gelelektrophorese

Die Produkte der PCR wurden mittels Gelelektrophorese nachgewiesen. Dafür wurden zunächst 10µl des PCR-Produktes mit 2µl Ladepuffer versetzt und jeweils in eine Tasche eines 1,5%igen Agarosegels in 1 x TBE-Puffer (1M Tris, 0,9M Borsäure, 0,001M EDTA) pipettiert. Durch Anlegen einer Spannung von 130 V bei einer Stromstärke von 80 mA wanderten die negativ geladenen DNA-Fragmente im elektrischen Feld zur Anode und wurden so nach ihrer Basenpaargröße spezifisch aufgetrennt.

Nach einer Laufzeit von 30 Minuten wurde das Gel in einer Wanne mit Ethidiumbromid für 8-10 Minuten gefärbt. Ethidiumbromid ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der sich zwischen den Basenpaaren der DNA einlagert und die Detektion der DNA-Produkte unter UV-Licht (302 nm) in Form von Nukleinsäure-Banden ermöglicht. Für jedes Gel wurde ein Foto zur Dokumentation erstellt (siehe Abbildung 2).

Die Größenbestimmung der Banden erfolgte durch einen auf jedem Gel mitgelaufenen Größenmarker (Gene Ruler™ DNA Ladder mix (Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) 0,5µg/µl, 50µg).

Ladepuffer: Loading-Dye 10x
 0,25% BPB (Bromphenolblau-Pulver)
 0,25% XC (Xylene Cyanol-Pulver)
25% Ficoll-Pulver
 2g auf 100ml Aqua dest.

Es wurde eine 1:8 Verdünnung der 2%igen Ladepuffer-Stocklösung verwendet.

Agarosegel: 1,5g Agarose auf 100ml TBE-Puffer

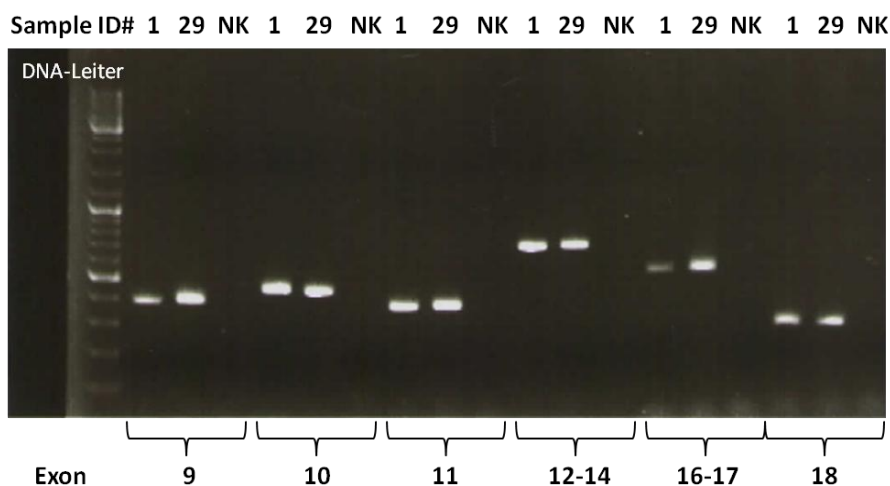


Abbildung 2: Gelelektrophorese

NK= negativ Kontrolle

2.3.4 Aufreinigung des PCR-Produktes

Für das Sequenzieren der amplifizierten DNA-Produkte mussten diese zunächst gereinigt werden. Hierfür wurde das Enzym Exo SAP-IT (usb, Staufen, Deutschland), welches überschüssige Primer, dNTP's und Einzelstrang-DNA verdaut, verwendet.

7 µl des PCR-Produkts wurden mit 1,5 µl Exo SAP-IT in einem 0,2 ml Eppendorf-Röhrchen gut gemischt und nach folgendem Schema inkubiert.

| Temperatur | Zeit | Zyklen |
|------------|--------------|--------|
| 37°C | 15 min |] 2 |
| 80°C | 7 min 30 sec | |
| 8°C | for ever | |

2.3.5 Sequenzierung

Das Sequenzieren von DNA dient dazu, die Nukleotid-Abfolgen eines DNA-Abschnittes zu identifizieren und ist die Methode der Wahl um Mutationen (besonders Punktmutationen) zu bestimmen.

Die Sequenzierung von STAT3 wurde mit der Kettenabbruch-Methode nach Sanger et. al und anschließender Kapillarelektrophorese durchgeführt (Sanger et al. 1977).

Ein Einzelstrang DNA-Abschnitt wird durch Zugabe eines Primers (entweder Vorwärts oder Rückwärts) durch die DNA-Polymerase linear verlängert. Dem Reaktionsgemisch werden zu den üblichen dNTP's auch Didesoxynukleosidtriphosphate (ddNTP's) der vier Basen zugegeben. Diese unterscheiden sich von den üblichen dNTP's durch eine fehlende 3'-OH-Gruppe, die für die Verknüpfung mit einem folgenden Nukleotid essentiell ist. Wird also ein ddNTP statt eines herkömmlichen Nukleotids in die DNA-Kette eingebaut, führt es zum Abbruch der Synthese. Es entstehen demzufolge DNA-Fragmente unterschiedlicher Länge mit jeweils einem ddNTP Ende.

Zum Bestimmen der DNA-Sequenz werden die Kettenabbruchprodukte mittels Kapillarelektrophorese aufgetrennt. Jedes Fragment unterscheidet sich in seiner Wanderungsgeschwindigkeit entsprechend der durch den Kettenabbruch bestimmten Größe. Die verwendeten ddNTP's sind mit einem für jede Base spezifischen Fluoreszenz-Farbstoff markiert und können durch einen Laser zur Fluoreszenz angeregt werden. Die vom Laser detektierte Nukleotid-Abfolge wird mit einer speziellen Software aufgezeichnet (Dovich and Zhang 2000).

Die Sequenzier-Reaktion wurde nach folgendem Schema pipettiert und anschließend mit dem unten aufgeführten Programm durchgeführt.

Sequenz-Reaktions-Protokoll:

| | |
|-------------------------|------------|
| Big Dye | 1,5µl |
| 5xSeq.Puffer | 1,5µl |
| H ₂ O | 4µl |
| Gereinigtes PCR-Produkt | 2µl |
| <u>Primer 5µM</u> | <u>1µl</u> |
| Gesamtlösung | 10µl |

Für die Exons 2-6, 9-11, 15, 18, und 21-24 wurde nur in eine Richtung sequenziert und demnach entweder der Vorwärts- oder der Rückwärtsstrang mit dem entsprechenden Primer in einem separaten Reaktionsgefäß angesetzt. Für Primerpaare, die mehrere Exons umfassen (Exons 7-8, 12-14, 16-17, und 19-20) wurde immer sowohl der Vorwärts- als auch der Rückwärtsstrang sequenziert. Bei Auffälligkeiten in der Sequenzabfolge, und um eine Mutation zu bestätigen, wurde ebenfalls immer in beide Richtungen sequenziert.

Die in der Sequenzreaktion verwendeten Primersequenzen sind aus Tabelle 4 zu entnehmen.

Durchgeführt wurde die Sequenzreaktion unter folgenden Bedingungen entweder mit dem GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland), oder dem Gene Amp PCR System 9600 (Applied Biosystems)

| | Temperatur | Zeit | Zyklen |
|---------------|------------|----------|--------|
| Denaturierung | 96°C | 1 min |] 25 |
| Denaturierung | 96°C | 10 sec | |
| Annealing | 60°C | 5 sec | |
| Elongation | 60°C | 1 min | |
| | 4°C | for ever | |

Nach der Sequenzreaktion mussten die Sequenzreaktionsprodukte mit 3 M Na-Acetat und 100%igem Äthanol gefällt werden. Zu einem Gemisch aus 55 µl reinem Äthanol und 2 µl 3M Na-Acetat wurden 10 µl EDTA und das gesamte Sequenzreaktionsprodukt (10µl) gegeben. Dieses Gemisch wurde nach gründlichem Vortexen zur Fällung 10min stehen gelassen und dann für 30 Minuten zentrifugiert (10900 rpm). Der Überstand wurde abpipettiert und das Pellet mit 70%igem Äthanol zweimal gewaschen.

Die gereinigten und getrockneten Sequenzreaktionsprodukte wurden in 30 µl Hi di Formamide (Applied Biosystems) aufgenommen und mit dem 3130 Gene Analyzer (Applied Biosystems) analysiert.

Die erhaltenen DNA-Sequenzen wurden zur Mutationsbestimmung mit der Wildtyp-*STAT3*-Sequenz (OMIM*102582) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?term=STAT3>; Chromosom: 17, Lokalisation: 17q21.31) verglichen.

2.3.6 Bestimmung von T_H17-Zellen

Die durchflusszytometrische Bestimmung von IL-17 produzierenden CD4⁺-T-Zellen (T_H17-Zellen) fand bei insgesamt 53 Patienten, 28 gesunden Kontrollen und 22 asymptomatischen Familienangehörigen von 16 Patienten statt. Von 25 Patienten war kein frisches Zellmaterial vorhanden, so dass diese Untersuchung nicht durchgeführt werden konnte. Bei einem Patienten konnte das Ergebnis aufgrund unzureichender Probenqualität nicht verwendet werden.

T_H17-Zellen wurden durch Anfärben von IL-17 produzierenden CD4⁺-T-Zellen identifiziert.

Dazu erfolgte zunächst die Isolierung von PBMCs (peripheral blood mononuclear cells) aus 10 ml frischem Heparinblut unter Verwendung des Ficoll-Paque Plus Protokolls (Biochrom, Berlin) nach Vorgaben des Herstellers.

Jeweils 3 x 10⁶ PBMCs eines Patienten und einer gesunden Kontrolle wurden in 6-well-Platten nach folgendem Ansatz über Nacht bei 37°C inkubiert.

| | Unstimuliert | Stimuliert |
|-----------|--|--|
| Kontrolle | 2,7ml Zellkulturmedium + 3µl Golgi Plug + 3 Mio. Zellen | 2,7 ml Zellkulturmedium + 3µl Golgi Plug + 3 µl Ionomycin (1µg/ml unverdünnt) + 30 µl PMA (10ng/ml 1:100 verdünnt) + 3 Mio. Zellen |
| Patient | 2,7 ml Zellkulturmedium + 3µl Golgi Plug + 3 Mio. Zellen | 2,7 ml Zellkulturmedium + 3µl Golgi Plug + 3µl Ionomycin (1µg/ml unverdünnt) + 30µl PMA (10ng/ml 1:100 verdünnt) + 3 Mio. Zellen |

Tabelle 5: Zellkulturansatz zur Bestimmung von IL-17 produzierenden CD4⁺ T Zellen

Legende: Zellkulturmedium= RPMI+10%FBS+Penicillinstreptomycin

Der Inhalt der 6-well-Platten wurde in konische 15 ml Röhren übertragen, mit 3 ml FACS-Puffer (PBS + 1% FBS) gemischt und 5 Minuten bei 1500 rpm zentrifugiert.

Nach zweimaligem Waschen mit 5 ml FACS-Puffer und fünfminütiger Zentrifugation (1500 rpm), wurde die Zelloberfläche mit 25 µl Phycoerythrin-konjugiertem Anti-CD4 (1:25 verdünnt) (BD Biosciences) bei 4°C für 30-35 Minuten gefärbt. Anschließend wurde erneut mit 100µl FACS-

Puffer zweimal gewaschen und unter gleichen Bedingungen (5 Minuten und 1500 rpm) zentrifugiert, so dass die Zellen mit 100 µl 1 x Cytofix/Cytoperm Lösung fixiert und permeabilisiert werden konnten. Nach kurzem Aufmischen und einer Inkubation von 20 Minuten bei 4°C erfolgte ein zweimaliges Waschen mit 100 µl Perm/Wasch Puffer (1:10 verdünnt). Schließlich wurden die Zellen mit 25 µl eines spezifischen Antikörpermixes gefärbt. Dieser bestand jeweils aus 100 µl Perm/Wasch Puffer in Kombination mit 10 µl Alexa Fluor 647-konjugiertem Anti-17A (1:10 verdünnt) (Natutec, Frankfurt) oder 4 µl FITC-konjugiertem Anti-INF γ (1:25 verdünnt) (Biozol, Eching).

Es erfolgte eine weitere Inkubation bei Raumtemperatur für 35-45 Minuten. Die Zellen wurden noch zweimal mit 100 µl FACS-Puffer gewaschen, zentrifugiert und für die durchflusszytometrische Messung schließlich in 300 µl FACS- Puffer resuspendiert.

Alle durchflusszytometrischen Analysen wurden mit dem BD FACS Calibur (BD Biosciences) durchgeführt und mit Hilfe der BD CellQuest™ Pro Software (BD Biosciences) ausgewertet.

2.4 Statistische Methoden

Prozentuale Angaben der T_H17-Zellzahlen von Patienten mit und ohne STAT3-Mutation sowie den Normalkontrollen wurden mit dem Student's T-test mit Hilfe der Software SPSS analysiert. Ein p-Wert unter 0,01 wurde als signifikant deklariert.

Die Sensitivität und Spezifität von einzelnen HIES-Symptomen wurde mit Hilfe von Vierfeldertafeln ermittelt. Daraus wurde abgeleitet, wie zuverlässig ein Symptom das STAT3-HIES definiert. Die Ergebnisse des neuen 5-Punkte-Scores (vergl. Kap. 3.4) wurden mit den NIH-Score Ergebnissen in Bezug auf Sensitivität und Spezifität verglichen. Zur Erstellung der Abbildungen, Graphiken und Tabellen wurden Microsoft Word, Excel und Power-Point sowie Paint und IBM SPSS verwendet.

3 Ergebnisse

3.1 Phänotypische Einteilung

Der Phänotyp von 78 Patienten dieser Studie wurde anhand von 20 Symptomen, die zum größten Teil der Auflistung der Symptome des NIH-Scores entsprechen, charakterisiert. Jedes vorhandene Symptom wurde mit einem „Ja“ bezeichnet, unabhängig von Ausprägungsschwere, Häufigkeit bzw. Anzahl der Ereignisse oder der genauen Lokalisation dieses Symptoms. Als Grundlage für die Einteilung in eine „gesicherte HIES“ und eine „Verdacht auf HIES“-Kohorte diente die Anzahl der NIH-Score-Punkte, die ein Patient mit allen Symptomen, die im Verlauf seiner Krankengeschichte bis 2008 eruierbar waren, erreichte.

3.1.1 Gesicherte-HIES-Patienten

In der Kohorte der gesicherten HIES-Patienten erreichten die Patienten einen Score zwischen minimal 40 und maximal 89 Punkten (Score-Mittelwert 59 Punkte).

Die Verteilung der einzelnen Symptome jedes Patienten ist in Tabelle 5 aufgezeigt. Die relativen Häufigkeiten der Symptome werden in der untersten Zeile der Tabelle angegeben. In der letzten Spalte sind die NIH-Score-Punkte jedes Patienten aufgelistet. In Abbildung 3 werden beispielhaft einige Symptome dargestellt.

Zwei Patienten (ID# 47 und ID# 52) dieser Kohorte sind aufgrund respiratorischer Komplikationen nach multiplen Pneumonien gestorben und einer (ID# 68) an Leberversagen aufgrund einer Infektion mit *Echinococcus multilocularis*. Ein weiterer Patient (ID# 78) starb an einer Lungenfibrose, die sechs Wochen nach einer Knochenmarkstransplantation aufgrund eines Lymphoms aufgetreten war. Eine Patientin (ID# 20) hatte neben bakteriellen Infektionen der Haut und Lunge rezidivierende Infektionen mit *Molluscum contagiosum*, eine periphere Facialisparesie sowie einen assoziierten T-Zell-Defekt. Aufgrund des klinischen Erscheinungsbildes und einer konsanguinen Familienanamnese wurde bereits in der Doktorarbeit von Renner die klinische Diagnose AR-HIES gestellt (Renner 2002).



Abbildung 3: Symptome von Patienten mit klinisch-gesichertem HIES

3.1.2 Verdacht-auf-HIES Patienten

Der Mittelwert aller NIH-Score-Punkte dieser Kohorte ergab 29 Punkte bei einer Spanne von minimal 12 und maximal 38 Punkten.

Die Symptome, die bei jedem Patienten den Verdacht auf ein HIES hervorbrachten, sowie die relative Häufigkeit jedes Symptoms sind in Tabelle 6 aufgeführt. Abbildung 4 zeigt einige Symptome der Patienten dieser Kohorte.

Bei drei Patienten, die einen NIH-Score unter 20 Punkten erreichten (ID# 5, NIH-Score: 12; ID# 24, NIH-Score: 14; ID# 41, NIH-Score: 19), musste der Zusatz „HIES sehr unwahrscheinlich“ vermerkt werden, da ein HIES bei einem Score unter 20 Punkten mit großer Wahrscheinlichkeit nicht vorliegt.

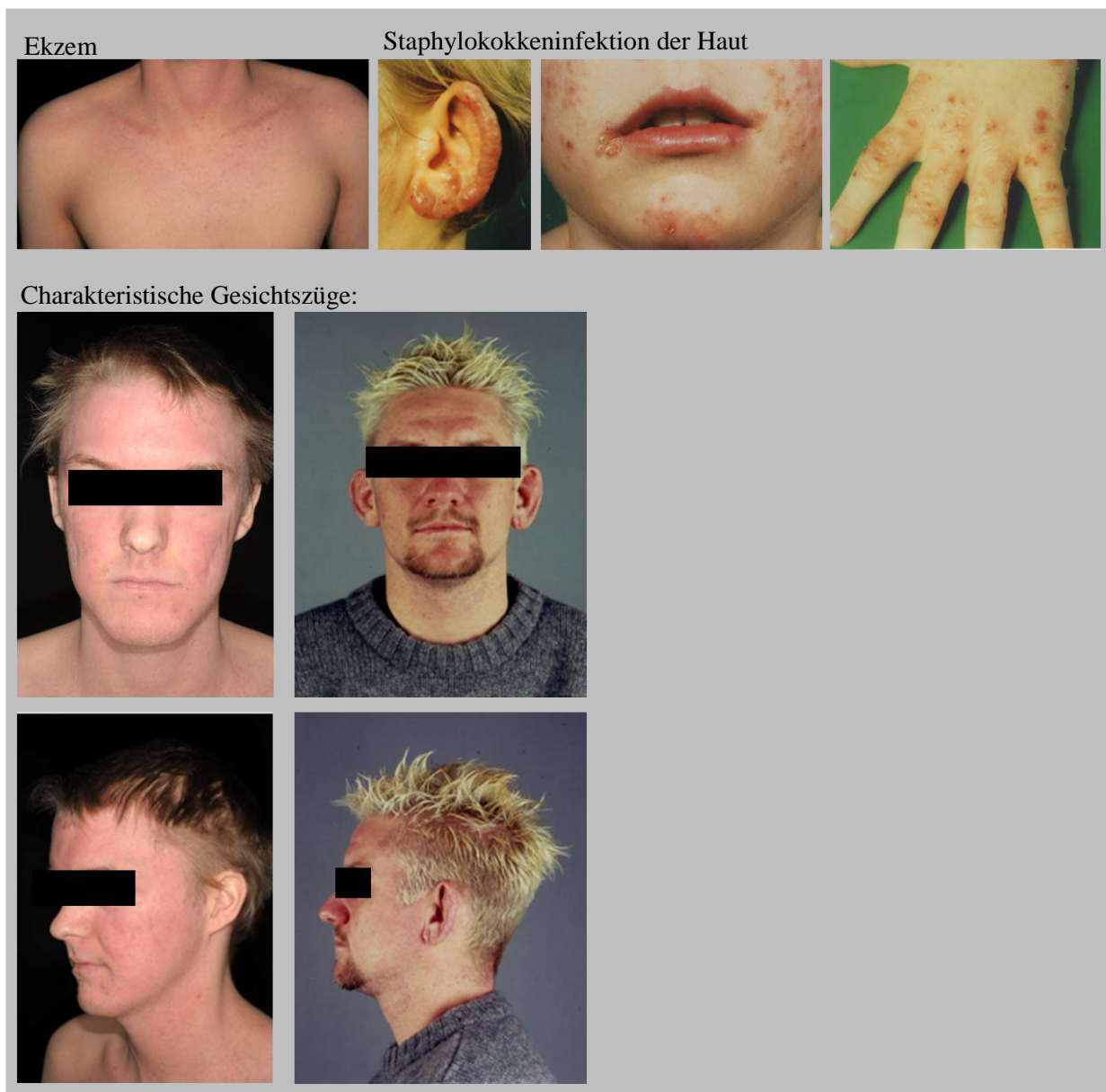


Abbildung 4: Symptome von Patienten mit „Verdacht auf HIES“

| ID# | Alter in 2008 | Geschlecht | IgE > 10fach der Norm | Eosinophilie | Ekzern | Ekzembeginn < 6.LW | Hautabszesse | Organabszesse | Pneumonie(n) | Pneumatozelen | rez. Infektionen | schwere Infektionen | Orale Candidiasis | Nagelmukokutane Candidiasis | Milchzahn-persistenz | Spontanfrakturen | Skoliose | Hyperextensibilität | charakteristisches Gesicht | Nasenbreite > 1SD | hoher Gaumen | Allergie | weitere Symptome | NIH-Score-Punkte |
|-----|---------------|------------|-----------------------|--------------|--------|--------------------|-----------------------|---------------|--------------|---------------|--------------------|---------------------|-------------------|-----------------------------|----------------------|------------------|----------|---------------------|----------------------------|-------------------|--------------|---|---|------------------|
| 52 | †29 | m | Ja | Ja | Ja | Ja | Nein | Ja | Ja | Ja | Ja ² | Ja | Nein | Ja | Ja | Ja | Ja | Ja | Nein | Nein | k.A. | | 89 | |
| 31 | 17 | w | Ja | Ja | Ja | Ja | Ja ^{VI} | Ja | Nein | Ja | Ja ² | Ja | Ja | Ja | Ja | Nein | Nein | Ja | Ja | Ja | Ja | überzähliges Rippenpaar | 84 | |
| 51 | 51 | w | Ja | Ja | Ja | Ja | Nein | Ja | Ja | Ja | k.A. | Ja | Ja | Ja | Ja | Ja | Ja | Ja | Ja | Ja | k.A. | | 83 | |
| 55 | 26 | m | Ja | Ja | Ja | Ja | Ja ^{II} | Ja | Ja | Ja | Ja ² | Ja | Ja | Ja | Ja | Nein | Ja | Ja | Ja | Ja | Ja | Nein | Fazialisparese, Osteoporose | 79 |
| 61 | 25 | m | Ja | Ja | Ja | Ja | Nein | Ja | Ja | Ja | Nein | Nein | Ja | Ja | Ja | Ja | Ja | Ja | Ja | Ja | Ja | k.A. | Aspergillose | 76 |
| 74 | 25 | m | Ja | Ja | Ja | Ja | Nein | Ja | Ja | Ja | Nein | Nein | Ja | Ja | Ja | Nein | Nein | Ja | k.A. | Ja | k.A. | | 75 | |
| 75 | 22 | w | Ja | Ja | Ja | Nein | Ja ^{k.A.} | Ja | Ja | Ja | Ja ^{k.A.} | Ja | Ja | Ja | Nein | Nein | Nein | Ja | Ja | Ja | Ja | Nein | | 74 |
| 14 | 21 | w | Ja | Ja | Ja | Nein | Nein | Ja | Ja | Ja | Nein | Nein | Ja | Ja | Ja | Ja | Ja | Ja | Ja | Nein | Nein | Nein | akuter Hörsturz links 2007, IgG2+4 Subklassendefekt | 74 |
| 73 | 11 | m | Ja | Ja | Ja | Ja | Ja ^{II} | Ja | Ja | Nein | Nein | Nein | Nein | Ja | Nein | Ja | Ja | Ja | Ja | Ja | Ja | k.A. | | 72 |
| 9 | 18 | w | Ja | Ja | Ja | Ja | Ja ^{VII} | Ja | Nein | Ja | Nein | Ja | Ja | Ja | Ja | Ja | Ja | Ja | Ja | Nein | Nein | Ja | Aspergillose, Tinea capitis, Hüftluxation | 72 |
| 68 | †18 | m | Ja | Ja | Ja | Ja | Ja ^{I,II} | Ja | Nein | Ja | Ja ² | Ja | Ja | Ja | Ja | Nein | Ja | Ja | Ja | Ja | Ja | Ja | prä-mature Nahtsynostose, gespaltene Uvula, Echinokokkose, Aspergillose | 70 |
| 71 | 19 | m | Ja | Ja | Ja | Ja | Ja ^{VI} | Ja | Nein | Ja | Nein | Ja | Ja | Ja | Ja | Nein | Ja | Ja | Nein | Nein | Ja | Schallleitungsschwerhörigkeit | 70 | |
| 77 | 31 | m | Ja | Ja | Ja | Ja | Nein | Ja | Ja | Ja | Nein | Nein | Ja | Ja | Ja | Ja | Ja | Ja | Ja | Ja | Ja | k.A. | | 70 |
| 62 | 41 | w | Ja | Ja | Ja | Ja | k.A. | Ja | Nein | k.A. | Nein | Ja | Ja | Ja | Ja | Ja | k.A. | Ja | Ja | Ja | Ja | k.A. | Wangenschleimhautentzündungen | 69 |
| 58 | 32 | m | Ja | Ja | Ja | Ja | Ja ^{I,III} | Ja | Nein | Ja | Nein | Ja | Nein | Ja | Ja | Ja | Ja | Ja | Ja | Ja | Nein | Nein | Hämophilie A, Osteoporose | 67 |
| 12 | 48 | m | Ja | Ja | Ja | Ja | Ja ^{I,III} | Ja | Nein | Ja | Ja ¹ | Ja | Ja | Ja | Ja | Ja | Ja | Ja | Ja | Ja | Ja | Nein | Mitralklappeninsuff., Aortenaneurysma (abdominal), maligne Lymphome, Gicht, Tibiakopmfekrose, Osteoporose | 66 |
| 59 | 51 | m | Ja | Ja | Ja | Ja | Ja ¹ | Ja | Nein | Ja | Ja ² | Nein | Ja | Nein | Nein | Nein | Ja | Nein | Ja | Nein | Ja | k.A. | | 65 |
| 27 | 31 | w | Ja | Ja | Ja | Ja | Ja ^{k.A.} | Ja | Ja | Ja | Nein | Ja | Nein | Nein | Ja | Ja | Nein | Ja | Ja | Ja | Ja | k.A. | | 65 |
| 78 | †46 | m | Ja | Nein | Ja | Nein | Nein | Ja | Ja | Ja | k.A. | Nein | Ja | k.A. | Ja | Ja | Nein | Ja | Ja | Ja | Nein | k.A. | diffus-großzelliges B-Zell-Lymphom | 64 |
| 7 | 10 | w | Ja | Nein | Ja | Ja | Nein | Nein | Ja | Ja | Nein | Nein | Nein | Ja | Ja | Nein | Ja | Ja | Ja | Ja | Nein | Nein | Submuköse Gaumenspalte, prä-mature Nahtsynostose, Mitralklappeninsuff. | 63 |
| 70 | 33 | m | Ja | Ja | Ja | Nein | Ja ^{II} | Ja | Nein | Ja | Ja ² | Ja | Nein | Ja | Nein | Ja | Nein | Ja | k.A. | Ja | k.A. | prä-mature Nahtsynostose, Blockwirbel mit Keilwirbelbildung BWK 8-9 | 63 | |
| 49 | 35 | m | Ja | Ja | Ja | Ja | Nein | Ja | Ja | Ja | Nein | Ja | Nein | Nein | Ja | Nein | Ja | Ja | Ja | Ja | Nein | Nein | Follikuläre lymphatische Hyperplasie | 62 |
| 3 | 19 | m | Ja | Ja | Ja | Ja | Nein | Ja | Nein | Ja | Nein | Ja | Ja | Nein | Ja | Ja | Ja | Ja | Ja | Ja | Ja | Ja | prä-mature Nahtsynostose | 60 |
| 65 | 20 | w | Ja | Ja | Ja | Ja | Ja ^{VI,VIII} | Ja | Nein | Ja | Nein | Ja | Nein | Ja | Ja | Nein | Nein | Ja | Ja | Ja | Ja | Ja | | 58 |
| 69 | 20 | w | Ja | Ja | Ja | Ja | Ja ^{II} | Ja | Nein | Ja | Ja ² | Nein | Nein | Ja | Ja | Nein | Nein | Ja | Nein | Nein | Ja | Ja | | 57 |

Tabelle 5: Klinische Daten von gesicherten HIES-Patienten (NIH-Score Punkte ≥ 40)

Ergebnisse

| ID# | Alter in 2008 | Geschlecht | IgE > 10fach der Norm | Eosinophilie | Ekzern | Ekzernbeginn < 6.LW | Hautabszesse | Organabszesse | Pneumonie(n) | Pneumatozelen | rez. Infektionen | schwere Infektionen | Orale Candidiasis | Nagelmukokutane Candidiasis | Milchzähnersistenz | Spontanfrakturen | Skoliose | Hyperextensibilität | charakteristisches Gesicht | Nasenbreite > 1 SD | hoher Gaumen | Allergie | weitere Symptome | NIH-Score-Punkte |
|--------------------------------|---------------|------------|-----------------------|--------------|--------|---------------------|--------------|--------------------|--------------|---------------|------------------|---------------------|-------------------|-----------------------------|--------------------|------------------|----------|---------------------|----------------------------|--------------------|--------------|---|------------------|------------------|
| 67 | 16 | m | Ja | Ja | Ja | Ja | Nein | Ja | Nein | Ja | Ja ¹ | Ja | Ja | Ja | Nein | Ja | Ja | Ja | Ja | Ja | Ja | | 56 | |
| 76 | 13 | m | Ja | Ja | Ja | Nein | Ja | Ja ^{VI} | Ja | Ja | Ja | Ja | Nein | Ja | Nein | Nein | Ja | Ja | Ja | Nein | Ja | Bridenileus, narbige Phimose | 56 | |
| 10 | 13 | w | Ja | Ja | Ja | Ja | Ja | Nein | Ja | Nein | Ja | Nein | Ja | Ja | Nein | Nein | Ja | Ja | Ja | Ja | Ja | | 56 | |
| 63 | 26 | m | Nein | k.A. | Ja | Ja | Ja | k.A. | Ja | Nein | Ja | Ja ^{1,2} | Nein | Ja | Ja | Ja | Ja | Ja | Ja | Ja | k.A. | | 55 | |
| 54 | 9 | m | Ja | Ja | Ja | Ja | Nein | Nein | Ja | Ja | Ja | Nein | Ja | Ja | Nein | Ja | Ja | Nein | Ja | Ja | Ja | leicht gepaltene Uwula, Hüftluxation, Systolikum, IgG2+4 | 55 | |
| 17 | 13 | w | Ja | Ja | Ja | Ja | Ja | Nein | Ja | Ja | Nein | Nein | Nein | Nein | Ja | Ja | Nein | Nein | Ja | Ja | k.A. | Z.n.PDA Verschluss | 54 | |
| 60 | 39 | m | Ja | Ja | k.A. | k.A. | Ja | Ja ^{k.A.} | Ja | Nein | Ja | Ja ^{k.A.} | Nein | Ja | k.A. | Ja | Ja | Nein | Ja | Ja | Nein | k.A. | | 53 |
| 20 | 18 | w | Ja | Ja | Ja | Ja | Ja | Nein | Ja | Nein | Ja | Nein | Ja | Nein | Nein | Nein | Ja | k.A. | Ja | Ja | Ja | Molluscum contagiosum, Facialisparesie klinisch AR-HIES (Renner 2002) | 52 | |
| 30 | 7 | m | Nein | Nein | Ja | Ja | Ja | Ja ^I | Ja | Nein | Ja | Nein | Ja | Ja | zu jung | Nein | Nein | Ja | Ja | k.A. | Nein | Schwerhörigkeit, Gastroösophagealer Reflux | 51 | |
| 56 | 42 | m | Ja | Ja | Ja | Nein | Ja | Ja ^{IV,V} | Ja | Nein | Ja | Ja ^{2,3} | Ja | Ja | Ja | Nein | Nein | Nein | Ja | Ja | Ja | juvenile art. Hypertonie | 51 | |
| 64 | 9 | m | Ja | Ja | Ja | Nein | Ja | Nein | Ja | Ja | Ja | Nein | Ja | Nein | Ja | Nein | Nein | Nein | Nein | Nein | Nein | IgG 2+4 Subklassendefekt | 51 | |
| 47 | †36 | w | Ja | Ja | Ja | Ja | Ja | Nein | Ja | Ja | Ja | Nein | Nein | Ja | Nein | Nein | Ja | Nein | Ja | k.A. | k.A. | | 48 | |
| 66 | 26 | m | Ja | Ja | Ja | Ja | Ja | Ja ^{k.A.} | Ja | Ja | Ja | Ja ² | Ja | Nein | Nein | Nein | Nein | Ja | Ja | Ja | Nein | Aspergillose | 48 | |
| 50 | 23 | m | Ja | Ja | Ja | Ja | Ja | Ja ^{IV} | Nein | Nein | Ja | Nein | Ja | Nein | Ja | Ja | Nein | Ja | Ja | Ja | Ja | prä-mature Nahtsynostose, Osteoporose | 47 | |
| 72 | 5 | w | Ja | Ja | Ja | Ja | Nein | Nein | Ja | Ja | Ja | Nein | Ja | Ja | zu jung | Ja | Nein | Ja | Ja | Ja | Ja | Mitralklappeninsuff. Grad IV | 45 | |
| 38 | 17 | w | Ja | Ja | Ja | Ja | Nein | Nein | Ja | Ja | Ja | Nein | Nein | Nein | Ja | Nein | Nein | Ja | Nein | Ja | Ja | | 44 | |
| 45 | 44 | m | Ja | k.A. | Ja | k.A. | Ja | Nein | Ja | Ja | Nein | Nein | Nein | Nein | Nein | Nein | Nein | Nein | Ja | Ja | Nein | | 43 | |
| 36 | 2 | w | Ja | Ja | Ja | Nein | Ja | Nein | Ja | Nein | Nein | Nein | Ja | Ja | zu jung | Ja | Nein | Nein | Nein | k.A. | k.A. | | 43 | |
| 1 | 9 | m | Ja | Ja | Ja | Ja | Nein | Nein | Ja | Nein | Ja | Nein | Nein | Nein | Ja | Nein | Nein | Nein | Ja | Nein | Nein | Kleinwuchs, IgM Mangel | 43 | |
| 46 | 13 | w | Ja | Ja | Ja | Nein | Nein | Nein | Ja | Nein | Ja | Nein | Nein | Nein | Ja | Nein | Nein | Nein | Nein | Ja | Nein | | 42 | |
| 48 | 35 | m | Ja | Ja | Ja | Nein | Ja | Ja ^I | Nein | Nein | Ja | Nein | Ja | Ja | Nein | Ja | Nein | Ja | Ja | Ja | Ja | z.N. Katarakt-OP bds. | 42 | |
| 57 | 24 | m | Ja | Ja | Ja | Ja | Ja | Nein | Ja | Nein | Ja | Ja ² | Nein | Ja | Ja | Nein | Ja | Nein | Ja | Nein | Ja | prä-mature Nahtsynostose, Mittelgesichtshypoplasie/Dysgnathie | 42 | |
| 29 | 12 | m | Ja | Ja | Ja | Nein | Ja | Nein | Ja | Nein | Ja | Nein | Nein | Nein | Ja | Nein | Nein | Ja | Ja | Nein | Ja | | 42 | |
| 34 | 3 | w | Ja | Ja | Nein | Nein | Nein | Ja ^{VII} | Ja | Nein | Ja | Nein | Nein | Nein | zu jung | Nein | Nein | Ja | Ja | Ja | Nein | Hypertelorismus, Epikanthus | 40 | |
| Anzahl Positive/ | | | 47/49 | 44/47 | 47/48 | 35/47 | 42/49 | 22/47 | 47/49 | 22/49 | 44/48 | 17/47 | 29/49 | 27/49 | 34/43 | 29/49 | 19/49 | 29/48 | 43/48 | 34/44 | 28/46 | 19/31 | | |
| relative Häufigkeit (%) | | | 96 | 94 | 98 | 74 | 86 | 47 | 96 | 45 | 92 | 36 | 59 | 55 | 79 | 59 | 39 | 60 | 90 | 77 | 61 | 61 | | |

Fortsetzung Tabelle 5: Klinische Daten von gesicherten HIES-Patienten (NIH-Score Punkte ≥ 40)

k.A. keine Angaben
^I Niere
^{II} Lunge
^{III} Maxilla
^{IV} Peritonsillar
^V Lymphknoten
^{VI} Leber
^{VII} Zahnwurzel
^{VIII} Hoden
^I Osteomyelitis
² Sepsis
³ Mumps-Meningitis

Ergebnisse

Verdacht auf HIES-Patienten

| ID# | Alter in 2008 | Geschlecht | IgE >10fach der Norm | Eosinophilie | Ekzem | Ekzembeginn < 6. LW | Hautabszesse | Organabszesse | Pneumonie(n) | Pneumatozelen | rez. Infektionen | schwere Infektionen | Orale Candidiasis | Nagelmukokutane Candidiasis | Milchzahnpersistenz | Spontanfrakturen | Skoliose | Hyperextensibilität | charakteristisches Gesicht | Nasenbreite > 1SD | hoher Gaumen | Allergie | weitere Symptome | NIH-Score-Punkte | |
|----------------------------------|---------------|------------|----------------------|--------------|-------|---------------------|--------------|---------------|--------------|---------------|------------------|---------------------|-------------------|-----------------------------|---------------------|------------------|----------|---------------------|----------------------------|-------------------|--------------|-----------|--|------------------|----|
| 40 | 3 | w | Ja | Ja | Ja | Nein | Nein | Nein | Ja | Nein | Ja | Nein | Nein | Nein | zu jung | Nein | Nein | Nein | Nein | Nein | Nein | Ja | | 39 | |
| 8 | 12 | w | Ja | Ja | Ja | Nein | Ja | Nein | Ja | Nein | Ja | Nein | Nein | Nein | Nein | Nein | Ja | Nein | Nein | Nein | Nein | Ja | Zöliakie | 38 | |
| 18 | 24 | m | Ja | Ja | Ja | Ja | Nein | Nein | Ja | Nein | Ja | Nein | Ja | Nein | Nein | Nein | Nein | Nein | Ja | Nein | Ja | | | 38 | |
| 21 | 3 | m | Nein | Nein | Ja | Ja | Ja | Nein | Ja | Nein | Ja | Nein | Nein | Nein | zu jung | Nein | Nein | Ja | Nein | Nein | Nein | Nein | Reflux | 37 | |
| 26 | 19 | m | Ja | Ja | Ja | Nein | Ja | Nein | Nein | Nein | Nein | Nein | Nein | Nein | Nein | Ja | Nein | Ja | Ja | Nein | Nein | k.A. | | 37 | |
| 32 | 22 | m | Ja | Ja | Ja | Nein | Nein | Nein | Ja | Ja | Nein | Nein | k.A. | Nein | Ja | Nein | Nein | Nein | Nein | Nein | Ja | Ja | Brustkyphose, Entwicklungsretardierung | 36 | |
| 11 | 14 | m | Ja | Ja | Ja | Ja | Nein | Nein | Ja | Nein | Ja | Nein | Ja | Nein | Ja | Nein | Ja | Ja | Nein | Ja | Nein | Ja | | 36 | |
| 16 | 11 | m | Ja | Ja | Ja | Ja | Nein | Nein | Ja | Nein | Ja | Nein | Nein | Nein | Nein | Nein | Nein | Nein | Nein | Nein | Nein | Ja | mit 3. LJ Rachitis | 36 | |
| 35 | 46 | m | Ja | Ja | Ja | Ja | Ja | Nein | Nein | Nein | Ja | Nein | Nein | Nein | Nein | Nein | Nein | Nein | Ja | Ja | Nein | k.A. | | 35 | |
| 23 | 3 | m | Ja | Ja | Ja | Ja | Nein | Nein | Ja | Nein | Ja | Nein | Nein | Nein | zu jung | Nein | Nein | Nein | Nein | Ja | Nein | Ja | | 34 | |
| 53 | 8Monate | m | Ja | Ja | Ja | Ja | Nein | Nein | Ja | Ja | Nein | Nein | Nein | Nein | zu jung | Ja | Nein | Nein | Nein | k.A. | Nein | k.A. | Lungenempyem | 34 | |
| 15 | 5 | m | Ja | Ja | Ja | Nein | Ja | Nein | Nein | Nein | Ja | Nein | Nein | Nein | zu jung | Nein | Nein | Nein | Nein | Nein | Nein | Ja | Kälteurtikaria | 33 | |
| 37 | 2 | w | Ja | Ja | Ja | Nein | Nein | Nein | Ja | Nein | Ja | Nein | Nein | Nein | zu jung | Nein | Nein | Nein | Nein | Nein | Nein | Ja | | 33 | |
| 44 | 2 | m | Ja | Ja | Ja | Ja | Ja | Nein | Ja | Nein | Ja | Nein | Ja | Ja | zu jung | Nein | Nein | Nein | Nein | Nein | Nein | Ja | | 33 | |
| 42 | 17 | w | Ja | Nein | Nein | Nein | Ja | Nein | Nein | Nein | Nein | Nein | Nein | Nein | Nein | Nein | Nein | Nein | Nein | Nein | Ja | Ja | | 32 | |
| 2 | 2 | m | Ja | Ja | Ja | Nein | Nein | Nein | Nein | Nein | Ja | Nein | Ja | Ja | zu jung | Nein | Nein | Nein | Nein | Nein | Nein | Nein | k.A. | | 31 |
| 4 | 17 | w | Ja | Ja | Ja | Ja | Nein | Nein | Nein | Nein | Nein | Nein | Nein | Ja | Nein | Nein | Nein | Nein | Ja | Nein | Ja | Ja | | 30 | |
| 6 | 16 | m | Ja | Ja | Ja | Ja | Ja | Nein | Nein | Nein | Nein | Nein | Nein | Nein | Nein | Nein | Nein | Ja | Ja | Nein | Nein | Ja | eosinophile Ösophagitis | 28 | |
| 39 | 11 | m | Ja | Ja | Ja | Ja | Nein | Nein | Nein | Nein | Ja | Nein | Nein | Nein | Ja | Nein | Nein | Nein | k.A. | k.A. | k.A. | k.A. | bds. Scapula alata, Pectus excavatus | 26 | |
| 43 | 2 | m | Ja | Ja | Nein | Nein | Ja | Nein | Ja | Nein | Nein | Nein | Nein | Nein | zu jung | Nein | Nein | Nein | Nein | k.A. | k.A. | Ja | | 25 | |
| 13 | 36 | m | Ja | Ja | Ja | Nein | Ja | Nein | Nein | Nein | Nein | Nein | Nein | Nein | Nein | Nein | Nein | Nein | Ja | Nein | Nein | Nein | Urtikaria | 25 | |
| 22 | 5 | m | Ja | Nein | Ja | Nein | Nein | Nein | Ja | Nein | Ja | Nein | Nein | Nein | zu jung | Nein | Nein | Nein | Nein | Nein | Nein | Ja | | 24 | |
| 28 | 4 | m | Ja | Ja | Ja | Nein | Nein | Nein | Nein | Nein | Ja | Nein | Nein | Nein | zu jung | Nein | Nein | Nein | Nein | Ja | Ja | Ja | | 24 | |
| 19 | 3 | w | Ja | Ja | Ja | Nein | Nein | Nein | Nein | Nein | Nein | Nein | Nein | Nein | zu jung | Nein | Nein | Nein | Nein | Nein | Nein | Ja | | 24 | |
| 33 | 1 | m | Ja | Nein | Ja | Nein | Nein | Nein | Nein | Nein | Ja | Nein | Nein | Nein | zu jung | Nein | Nein | Nein | Nein | Nein | Nein | Ja | Kleinwuchs, Mikrozephalie | 23 | |
| 25 | 20 | w | Ja | Ja | Ja | Nein | Nein | Nein | Nein | Nein | Ja | Nein | Ja | Nein | Nein | Nein | Nein | Nein | Nein | Nein | Nein | Ja | Rolando Epilepsie | 22 | |
| 41* | 4 | w | Ja | Nein | Nein | Nein | Nein | Nein | Ja | Nein | Ja | Nein | Nein | Nein | zu jung | Nein | Nein | Ja | Nein | Nein | Nein | Ja | | 19 | |
| 24* | 57 | w | Ja | Nein | Ja | Nein | Nein | Nein | Nein | Nein | Nein | Nein | Nein | Nein | Nein | Nein | Nein | Nein | Nein | Nein | Nein | Nein | 2 Leberhämangiome | 14 | |
| 5* | 15 | m | Ja | Nein | Ja | Nein | Nein | Nein | Nein | Nein | Ja | Nein | Nein | Nein | Nein | Nein | Ja | Nein | Nein | Ja | k.A. | Urtikaria | 12 | | |
| Anzahl Positive/ Gesamtanzahl | | | 28/29 | 22/29 | 26/29 | 11/29 | 10/29 | 0/29 | 14/29 | 2/29 | 19/29 | 0/29 | 5/28 | 3/29 | 3/15 | 1/29 | 2/29 | 6/29 | 5/28 | 6/26 | 5/27 | 20/23 | | | |
| relative Häufigkeit (%) | | | 97 | 76 | 90 | 38 | 34 | 0 | 48 | 7 | 66 | 0 | 18 | 10 | 20 | 3 | 7 | 21 | 18 | 23 | 19 | 87 | | | |

Tabelle 6: Klinische Daten von Verdacht auf HIES-Patienten (NIH-Score Punkte < 40)

* HIES sehr unwahrscheinlich
k.A. Keine Angaben

3.2 Molekulargenetische und immunologische Diagnostik

3.2.1 Mutationsanalyse

Eine *STAT3* Genanalyse fand bei 78 Patienten aus 75 nichtverwandten Familien unterschiedlicher ethnischer Herkunft statt. Bei 48 Patienten aus 45 Familien wurde eine Mutation in *STAT3* identifiziert, die bei 53 asymptomatischen Familienmitgliedern (Eltern, Geschwister oder Verwandte) aus 26 betroffenen Familien nicht vorhanden war. Bei 30 untersuchten Patienten konnte eine Mutation im kodierenden Bereich des *STAT3* Gens ausgeschlossen werden.

Bei den meisten Patienten (94%) handelt es sich um eine „de novo“ Mutation, was durch die Sequenzierung klinisch gesunder Eltern, die zwei Wildtyp-Allele aufwiesen, belegt wurde (24 Familien untersucht, 17 Paare, 7 Mütter). In zwei Familien wurde die Mutation an nachfolgende Generationen mit dominantem Modus vererbt (ID# 45/46 und 51/52/53; Indexpatient unterstrichen). Keine der Mutationen war als Single-Nucleotid-Polymorphismus in der NCBI-Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>) veröffentlicht und konnte in keinem von 200 Kontroll-Chromosomen identifiziert werden. Mutationsverdächtige Abschnitte wurden durch einen zweiten Sequenzierungsansatz verifiziert.

Es wurden 24 verschiedene Mutationen bei 48 Patienten gefunden. Bei den Mutationen handelt es sich um 18 verschiedene Punktmutationen und sechs in-frame Deletionen. Alle Mutationen beschränken sich auf drei Bereiche des *STAT3* Proteins: die DNA Bindungsdomäne, Src homology 2 Domäne (SH2-Domäne) und Transaktivierungsdomäne (TA-Domäne). Als eine der häufigsten Mutationen konnte in dieser Studie die Punktmutation R382W in der DNA Bindungsdomäne beschrieben werden, die bei 32% der Patienten vertreten war. Eine weitere Mutation, die gehäuft auftrat, ist die Mutation V637M in der SH2-Domäne; sie wurde bei 7 Patienten (15%) identifiziert. Von den weiteren 16 Punktmutationen liegen sieben in der DNA Bindungsdomäne (H332L, R335W, V343L, R382Q, F384L, Q469R und Q469H), fünf in der SH2-Domäne (G617E, T620A, S636F, E638G, M660T) und vier in der TA-Domäne (Y705C, F710C, V713L, I711T). Bei den Deletionen handelt es sich um in-frame Deletionen einer oder mehrerer Aminosäuren. Zwei der Mutationen betreffen die Splice-Donor- und Splice-Akzeptor Seite in unmittelbarer Nähe zu Exon 12. Bei der IVS12+1 g>t Mutation führt dies, durch cDNA Analysen bestätigt, zum Überspringen von Exon 12 und somit zu einer Deletion von 10 Aminosäuren. Für die IVS12-2 a>g Mutation wird ein ähnlicher Effekt, der zum Überspringen von Exon 12 führt, erwartet. Die Mutation K340N/T341del in der DNA Bindungsdomäne führt durch die Aminosäuresubstitution Lysin zu Asparagin an Position 340 (K340N) zur Deletion der nachfolgenden Aminosäure Threonin (T341). Die Deletion der drei Basenpaare GTG an Position 1387-1389 führt zum Verlust der Aminosäure Valin463 (Mutation V463del) und bei der Mutation E690_P699del kommt es zu einer Deletion von 10 Aminosäuren in der TA-Domäne. Das Sequenzieren über Introngrenzen hinaus deckte eine große Deletion auf (c.2101+2332_o*STAT3*: c.2257+772del13933bp), die von Intron 21 an Position

c.2101+2332 bis Intron 23 an Position c.2257+772 fortläuft und in einer Deletion von 53 Aminosäuren (Exon 22-23) resultiert (Abbildung 7).

Das Ergebnis einer kapillarelektrophoretischen Sequenzauftrennung ist beispielhaft für eine Punktmutation in Abbildung 5 und für eine Deletion von drei Basenpaaren in Abbildung 6 dargestellt. Ein schematischer Überblick aller Mutationen dieser Studie wird in Abbildung 8 und Tabelle 7 gezeigt.

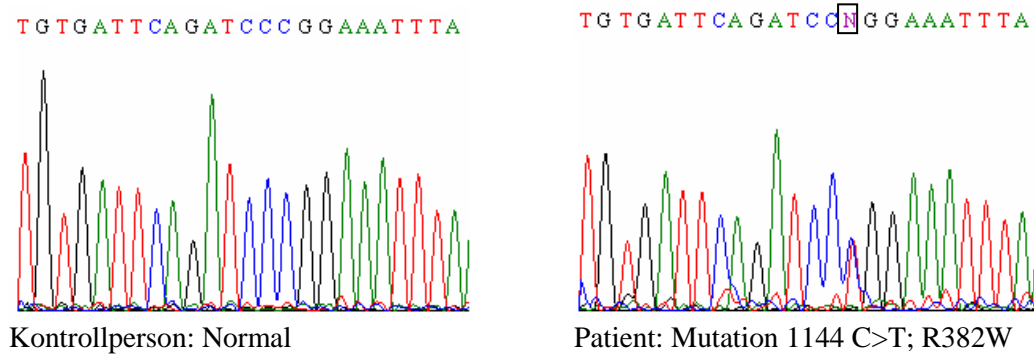


Abbildung 5: Sequenzchromatogramme der *STAT3*-Exon 12 Punktmutation eines Patienten sowie einer Kontrollperson

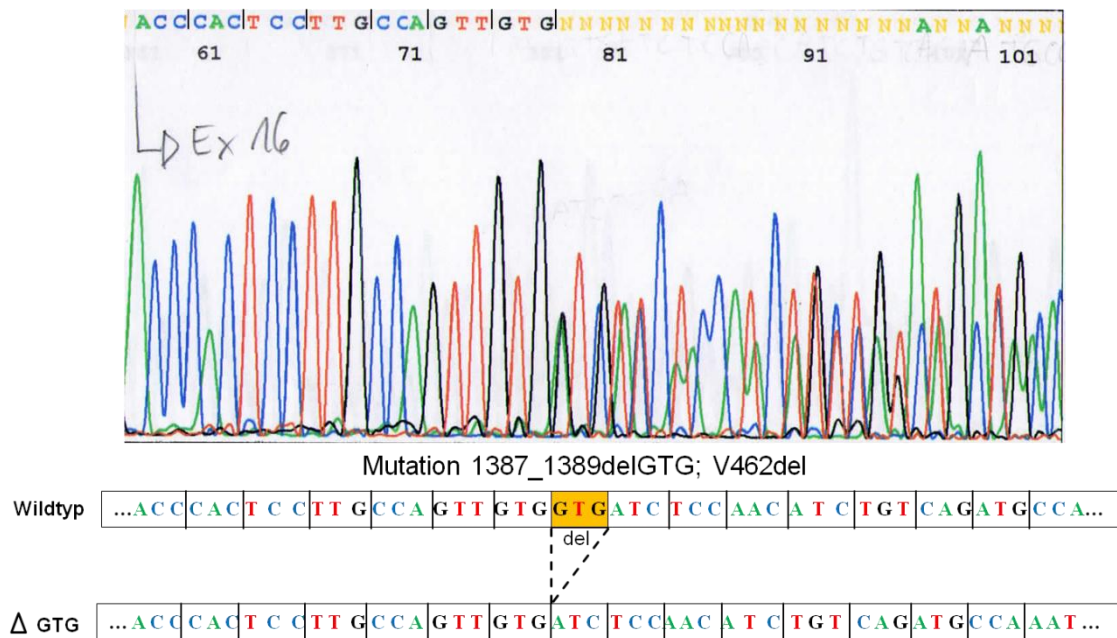


Abbildung 6: Sequenzchromatogramm des *STAT3*-Exon 16 eines Patienten mit Deletion von drei Basenpaaren

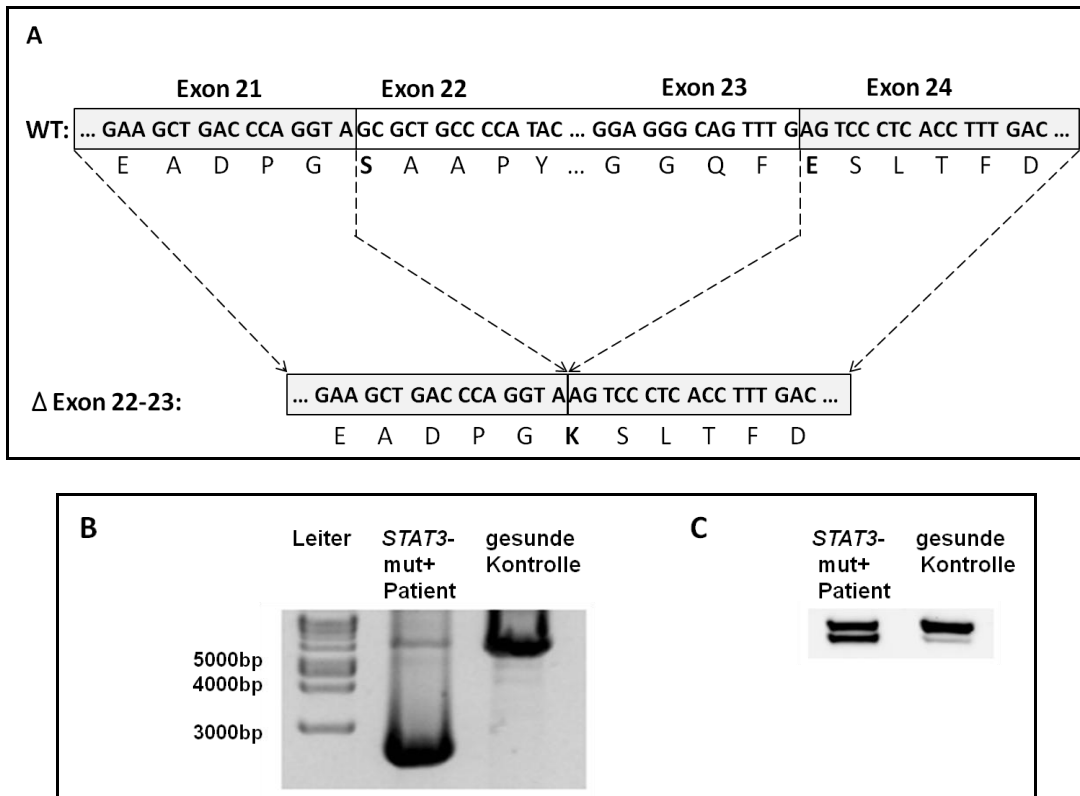


Abbildung 7: Darstellung der *STAT3*-Exon 22-23 Deletion¹

A: Schematische Darstellung der Deletion von Exon 22 und 23 in *STAT3* auf genomischer Ebene.

B: Die Gelelektrophoretische Auftrennung der amplifizierten gDNA mit Primern in Exon 21 und 24 zeigt das Deletionsprodukt bei 2500 bp (*STAT3*-patient) statt bei 6000 bp (gesunde Kontrolle).

C: Western-Blot mit zwei unterschiedlich großen Proteinprodukten beim Patienten versus gesunder Kontrolle.

¹ Abbildung übernommen von Koautoren aus der gemeinsamen Publikation Schimke et al. 2010

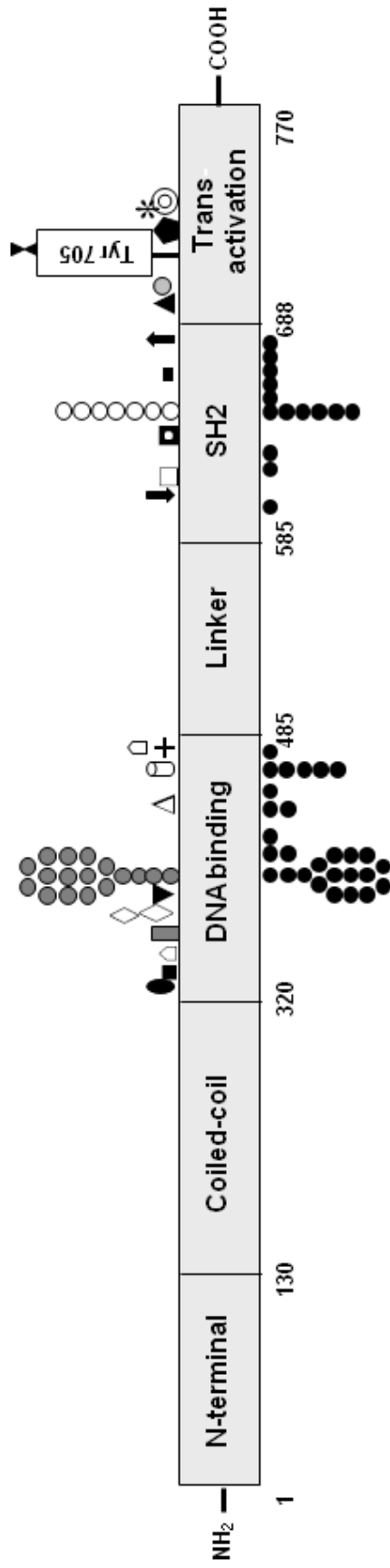


Abbildung 8: Mutationsgraphik

Oberhalb der STAT3 Protein-Struktur sind alle Mutationen dieser Kohorte mit einem Symbol pro Familie (Legende siehe Tabelle 7) dargestellt. Unterhalb steht jeder Punkt für eine Mutation pro Familie, die von Minegishi et al. und Holland et al. veröffentlicht wurden (Holland et al. 2007; Minegishi et al. 2007).

| Exon | Symbol | Basenaustausch | Effekt auf Protein | Funktionelle Domäne | Anzahl | bereits publiziert |
|------|--------|---------------------------------|--------------------|---------------------|--------|--------------------|
| 10 | ● | 995 A>T | H332L | DNA | 1 | Schimke et al. |
| 10 | △ | 1020_1023delGAC | K340, T341del | DNA | 1 | Renner et al. |
| 10 | ■ | 1003 C>T | R335W | DNA | 2 | Renner et al. |
| 10 | ▣ | 1027 G>C | V343L | DNA | 1 | Renner et al. |
| 12 | ▼ | IVS12-2 a>g | Ex12 del | DNA | 1 | Renner et al. |
| 12 | ◇ | IVS12+1 g>t | Ex12 kein stop | DNA | 2 | Renner et al. |
| 13 | ● | 1144 C>T | R382W | DNA | 15 | Renner et al. |
| 13 | ● | 1145 G>A | R382Q | DNA | 4 | Renner et al. |
| 13 | △ | 1152 T>A | F384L | DNA | 1 | Renner et al. |
| 16 | ⊔ | 1387_1389delGTG | V462del | DNA | 1 | Schimke et al. |
| 16 | ⊓ | 1406 A>G | Q469R | DNA | 1 | Schimke et al. |
| 16 | + | 1407 G>T | Q469H | DNA | 1 | Renner et al. |
| 20 | ↓ | 1850 G>A | G617E | SH2 | 1 | Renner et al. |
| 20 | □ | 1858 A>G | T620A | SH2 | 1 | Renner et al. |
| 21 | ■ | 1907 C>T | S636F | SH2 | 1 | Renner et al. |
| 21 | ○ | 1909 G>A | V637M | SH2 | 7 | Renner et al. |
| 21 | ■ | 1913 A>G | E638G | SH2 | 1 | Renner et al. |
| 21 | ↑ | 1979 T>C | M660T | SH2 | 1 | Schimke et al. |
| 21 | ▲ | 2069 del 30 bp | E690- P699del | TA | 1 | Renner et al. |
| 21 | ○ | 2101+2332_2257+772del 3933bp | Ex22+23 del | TA | 1 | Schimke et al. |
| 22 | ⌘ | 2114 A>C | Y705C | TA | 1 | Schimke et al. |
| 22 | ⬠ | 2129 T>C | F710C | TA | 1 | Schimke et al. |
| 22 | * | 2132T>C | I711T | TA | 1 | Schimke et al. |
| 22 | ⊙ | 2137 G>C | V713L | TA | 1 | Renner et al. |

Tabelle 7: Auflistung der in Abbildung 8 symbolisch dargestellten Mutationen im Protein STAT3

3.2.2 Genotypische Einteilung

Für weitere Analysen erfolgte die Patienteneinteilung nach dem STAT3-Genotyp in eine Kohorte von Patienten mit STAT3-Mutation (STAT3-mut) und eine Kohorte von Patienten ohne STAT3-Mutation (STAT3-wt).

Die STAT3-mut Kohorte umfasste 48 Patienten, davon 31 männliche und 17 weibliche mit einem mittleren Alter von 24 Jahren (Altersspanne: 8 Monate bis 51 Jahre). Alle bis auf zwei Patienten dieser Kohorte hatten einen NIH-Score ≥ 40 Punkte und gehörten somit zu der Gruppe der „gesicherten-HIES“ Patienten. Bei 30 Patienten, darunter 19 Jungen und 11 Mädchen mit einem mittleren Alter von 13 Jahren (Altersspanne: 1-57 Jahre) wurde keine STAT3 Mutation gefunden. Diese Patienten bildeten die STAT3-wt Kohorte, darunter waren drei Patienten aus der „gesicherten-HIES“ Kohorte mit einem NIH-Score von ≥ 40 Punkten. Näheres zu den Phänotyp-Genotyp Korrelationen wird in Abschnitt 3.3.1 erläutert.

In Tabelle 8 ist der Phänotyp anhand der NIH-Score-Punkte dem STAT3-Genotyp aller Patienten nach absteigendem NIH-Score-Wert gegenübergestellt. Eine Korrelation zwischen Höhe der NIH-Score-Punkte und Lokalisation der Mutation in *STAT3* konnte nicht festgestellt werden.

| ID# | Mutation in STAT3 | NIH-Score-Punkte | NIH-Score-Punkte | Mutation in STAT3 | ID# |
|-----|---|------------------|------------------|-------------------|-----|
| 52 | 1144 C>T, R382W | 89 | | | |
| 31 | 1145 C>A, R382Q | 84 | | | |
| 51 | 1144 C>T, R382W | 83 | | | |
| 55 | 1144 C>T, R382W | 79 | | | |
| 61 | 1144 C>T, R382W | 76 | | | |
| 74 | 1909 G>A; V637M | 75 | | | |
| 75 | 1909 G>A, V637M | 74 | | | |
| 14 | c.2101+2332_oSTAT3 : c.2257+772del3933bp | 74 | | | |
| 73 | 1909 G>A, V637M | 72 | | | |
| 9 | 2137 G>C, V713L | 72 | | | |
| 68 | 1858 A>G, T620A | 70 | | | |
| 71 | 1909 G>A, V637M | 70 | | | |
| 77 | 1913 A>G, E638G | 70 | | | |
| 62 | 1144 C>T, R382W | 69 | | | |
| 58 | 1144 C>T, R382W | 67 | | | |
| 12 | IVS12-2 a>g | 66 | | | |
| 27 | 1144 C>T, R382W | 65 | | | |
| 59 | 1144 C>T, R382W | 65 | | | |
| 78 | E690_P699del | 64 | | | |
| 7 | 1145 G>A, R382Q | 63 | | | |
| 70 | 1909 G>A, V637M | 63 | | | |
| 49 | IVS12+1 g>t | 62 | | | |
| 3 | 2129 T>C, F710C | 60 | | | |
| 69 | 1907 C>T, S636F | 57 | | | |
| 65 | 1145 G>A, R382Q | 57 | | | |
| 10 | 1979 T>C, M660T | 56 | | | |
| 67 | 1407 G>T, Q469H | 56 | | | |
| 76 | 1909 G>A, V637M | 56 | | | |

Tabelle 8: NIH-Score-Punkte und Mutation von STAT3-mut (links) und STAT3-wt (rechts) Patienten

| ID# | Mutation in STAT3 | NIH-Score-Punkte | NIH-Score-Punkte | Mutation in STAT3 | ID# |
|-----|------------------------------|------------------|------------------|-------------------|-----|
| 63 | 1144 C>T, R382W | 55 | | | |
| 54 | 1144 C>T, R382W | 55 | | | |
| 17 | 2114 A>C, Y705C | 54 | | | |
| 60 | 1144 C>T, R382W | 53 | | | |
| | | | 52 | Keine | 20 |
| 64 | 1145 G>A, R382Q | 51 | | | |
| 56 | 1144 C>T, R382W | 51 | | | |
| 30 | 995 A>T, H332L | 51 | | | |
| 66 | 1152 T>A, F348L | 48 | | | |
| 47 | 1020delGAC, K340N/T341del | 48 | | | |
| 50 | IVS12+1 g>t | 47 | | | |
| 38 | 1406 A>G, Q469R | 44 | | | |
| 46 | 1003 C>T, R335W | 43 | 43 | Keine | 36 |
| | | | 43 | Keine | 1 |
| 57 | 1144 C>T, R382W | 42 | | | |
| 29 | c1387_1389delGTG; V462del | 42 | | | |
| 72 | 1909G>A, V637M | 42 | | | |
| 48 | 1027 G>C, V343L | 42 | | | |
| 45 | 1003 C>T, R335W | 42 | | | |
| 34 | 2132 T>C, I711T | 40 | | | |
| | | | 39 | Keine | 40 |
| | | | 38 | Keine | 8 |
| 26 | 1850 G>A, G617E | 37 | 37 | Keine | 21 |
| | | | 36 | Keine | 32 |
| | | | 36 | Keine | 16 |
| | | | 35 | Keine | 11 |
| | | | 35 | Keine | 35 |
| | | | 35 | Keine | 18 |
| 53 | 1144 C>T, R382W | 34 | 34 | Keine | 23 |
| | | | 33 | Keine | 44 |
| | | | 33 | Keine | 37 |
| | | | 33 | Keine | 15 |
| | | | 32 | Keine | 42 |
| | | | 31 | Keine | 2 |
| | | | 30 | Keine | 4 |
| | | | 28 | Keine | 6 |
| | | | 26 | Keine | 39 |
| | | | 25 | Keine | 43 |
| | | | 25 | Keine | 13 |
| | | | 24 | Keine | 22 |
| | | | 24 | Keine | 28 |
| | | | 24 | Keine | 19 |
| | | | 23 | Keine | 33 |
| | | | 22 | Keine | 25 |
| | | | 19 | Keine | 41 |
| | | | 14 | Keine | 24 |
| | | | 12 | Keine | 5 |

Fortsetzung **Tabelle 8:** NIH-Score-Punkte und Mutation von allen STAT3-mut (links) und STAT3-wt (rechts) Patienten

3.2.3 Bestimmung der T_H17-Zellzahlen

Funktionelle Unterschiede in Zellen des Immunsystems, die durch eine Mutation in *STAT3* bedingt sein können, wurden mittels T_H17-Zellzahlbestimmung analysiert. Dazu wurden IL-17 produzierende CD4⁺-T-Zellen von 28 STAT3-mut und 25 STAT3-wt Patienten sowie von 22 gesunden Familienangehörigen und 28 gesunden Kontrollpersonen bestimmt und miteinander verglichen. Als Kontrollparameter für das intrazelluläre Färben und die Zellaktivität wurde zusätzlich die IFN γ -Produktion der CD4⁺-T-Zellen gemessen. Die Normgrenzen der Zytokinmessungen ergaben sich aus der Berechnung des 95 % Konfidenzintervalls aller Kontrollmesswerte. Für die IFN γ -Produktion wurde eine Spanne von 1,30 % bis 47,20 % der gesamt CD4⁺-T-Zellen als normal bewertet. Für die IL-17-Produktion galten Werte über 0,2 % der gesamt CD4⁺-T-Zellen als normal.

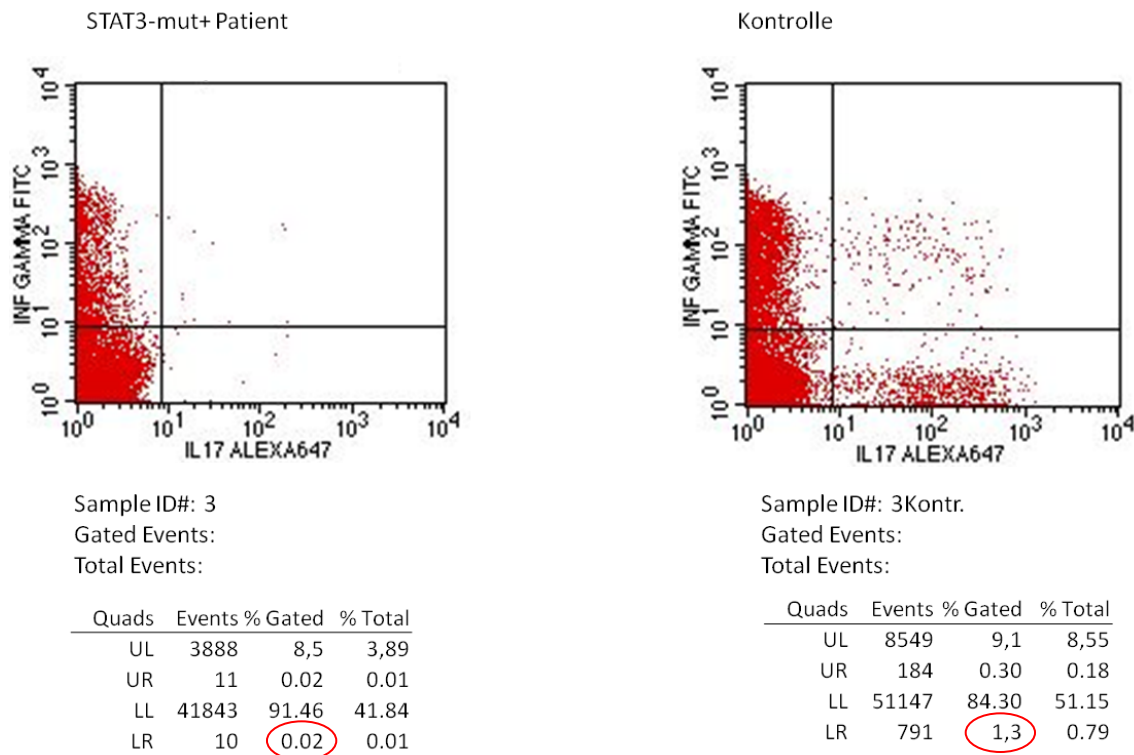


Abbildung 9: Darstellung der CD4⁺-T-Lymphozyten (rot) anhand Zytokin-Positivität für IL-17 (x-Achse) und IFN γ (y-Achse) nach Stimulation mit PMA/Ionomycin und daraus ermittelte Dot-plot Quadratstatistiken eines Patienten mit STAT3 Mutation (0,02% IL-17-Positivität) im Vergleich zu einer gesunden Kontrolle (1,3% IL-17-Positivität).

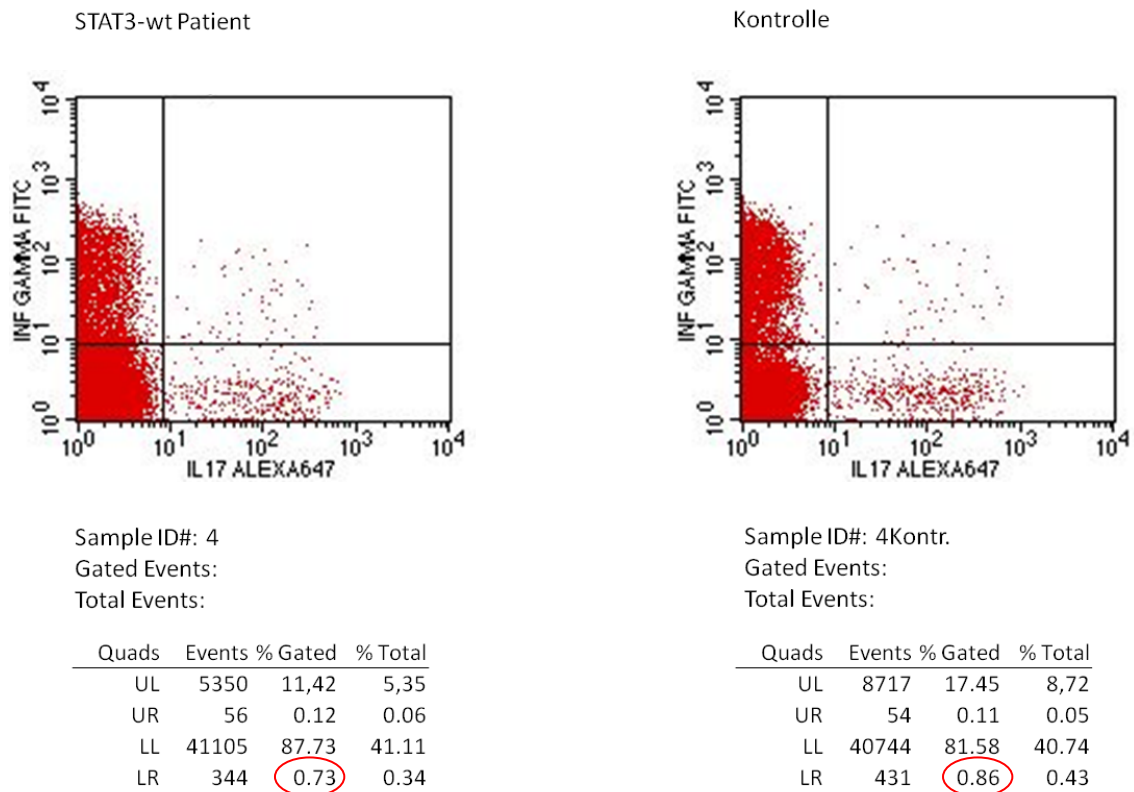


Abbildung 10: Darstellung der CD4⁺-T-Lymphozyten (rot) anhand Zytokin-Positivität für IL-17 (x-Achse) und INF γ (y-Achse) nach Stimulation mit PMA/Ionomycin und daraus ermittelte Dot-plot Quadratstatistiken eines STAT3-wt Patienten (0,73% IL-17-Positivität) im Vergleich zu einer gesunden Kontrolle (0,86% IL-17-Positivität).

Die IFN γ -Produktion war sowohl in STAT3-mut als auch STAT3-wt Patienten vergleichbar mit den Normalkontrollen, so dass von einer ausreichenden Stimulation der CD4⁺-T-Zellen ausgegangen wurde.

Die T_H17-Zellzahlen in STAT3-wt Patienten (MW 0.50% der CD4⁺-T-Zellen; Spanne 0.1-1.9%) waren vergleichbar mit denen von Normalkontrollen (MW 0.62% der CD4⁺-T Zellen; Spanne 0.2-2.0%). Im Vergleich dazu betragen die T_H17-Zellzahlen in STAT3-mut Patienten jedoch entweder null oder wiesen deutlich niedrigere Werte als die von gesunden Kontrollen auf (MW 0.09% der CD4⁺-T-Zellen; Spanne 0-0.3%). Ausnahmen bildeten zwei STAT3-wt Patienten, die ähnlich niedrige Werte wie STAT3-mut Patienten hatten (beide 0,11%), sowie drei STAT3-mut Patienten bei denen niedrig-normale T_H17-Zellzahlen gemessen wurden (2 x 0,23%, 1 x 0,3%).

In Abbildung 11 werden die Mittelwerte der T_H17-Zellzahlen von STAT3-mut und STAT3-wt Patienten im Vergleich zu Normalkontrollen dargestellt.

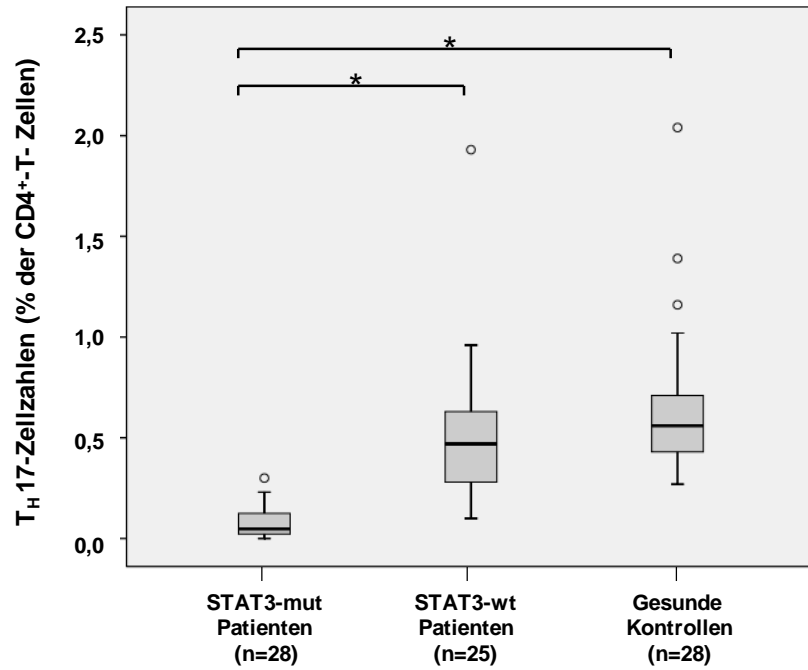


Abbildung 11: T_H17-Zellzahlen von STAT3-mut und STAT3-wt Patienten sowie normalen Kontrollpersonen

Box-Plot Diagramm von T_H17-Zellzahlen in % der CD4⁺-T-Zellen von STAT3-mut, STAT3-wt Patienten und Normalkontrollen. Es besteht ein signifikanter Unterschied zwischen STAT3-mut und STAT3-wt Patienten, sowie zwischen STAT3-mut Patienten und Normalkontrollen (*p<0,001).

3.3 Korrelationsanalysen

3.3.1 Phänotyp-Genotyp Korrelation

Zur Definition von STAT3-HIES assoziierten Symptomen erfolgte die Gegenüberstellung von klinischen Merkmalen von Patienten der STAT3-mut Kohorte und Patienten der STAT3-wt Kohorte (Tabelle 9).

Die häufigsten Merkmale, die sowohl bei STAT3-mut als auch bei STAT3-wt Patienten auftraten, waren die Trias Ekzem, erhöhtes Serum-IgE und Eosinophilie im peripheren Blut (>90% für Ekzem und erhöhtes Serum-IgE; > 77% für Eosinophilie in beiden Kohorten). Rezidivierende Infektionen der oberen Atemwege waren ebenfalls relativ häufig vorhanden und unterschieden sich nur leicht in den beiden Kohorten (89% versus 70%).

Andere Symptome aus dem infektiologischen Block traten zwar auch bei Patienten beider Kohorten auf, insgesamt waren sie aber häufiger bei STAT3-mut Patienten vorhanden. Dies traf vor allem für die Symptome Hautabszesse (85% STAT3-mut versus 37% STAT3-wt Patienten) und Nagel/mukokutane Candidiasis (54% versus 13%) zu, aber auch das Neugeborenenekzem und orale Candidiasis waren zirka doppelt so häufig bei STAT3-mut Patienten wie bei STAT3-wt Patienten vorhanden. Vor allem die Kombination aus mindestens drei dieser Symptome lag deutlich höher bei den STAT3-mut Patienten (48% [n=23/48]) im Vergleich zu den STAT3-wt Patienten (10% [n=3/30]). Während bei 51% der STAT3-mut Patienten mit Pneumonien auch Pneumatozelen [n=23] auftraten, hatte nur ein Patient ohne STAT3 Mutation eine Pneumatozele, obwohl Pneumonien selbst auch bei 53% der STAT3-wt Patienten vorhanden waren. Bei diesem heute 22-jährigen STAT3-wt Patient (ID# 32) wurde in den klinischen Aufzeichnungen eine Pneumatozele im Kindesalter berichtet, die jedoch aufgrund fehlender radiologischer Bildgebung nicht bestätigt werden konnte. Sein klinischer Zustand besserte sich bis heute und eine Pneumatozele war anamnestisch nicht mehr bekannt. Abszesse in inneren Organen (Leber [n=6], Lymphknoten [n=5], Lunge (ohne Pneumatozelen) [n=4], Zahnwurzel [n=2], Hoden [n=2], Maxilla [n=2], perirenal [n=1] und peritonsillar [n=1]) sowie schwere Infektionen (Sepsis [n=12], Meningitis [n=1], Osteomyelitis [n=3]) traten ausschließlich bei STAT3-mut Patienten auf.

Merkmale aus dem nicht-infektiologischen Block waren ebenfalls deutlich häufiger bei STAT3-mut Patienten assoziiert. Besonders traf das für die Symptome „Frakturen ohne adäquates Trauma“ und Skoliose zu, die jeweils nur einmal (3%) in der STAT3-wt Kohorte vorhanden waren. Ein charakteristisches Gesicht (mit der Ausprägung mild oder vorhanden) wurde bei 43 der STAT3-mut Patienten (90%) beschrieben, während nur fünf der STAT3-wt Patienten (17%) mit diesem Kriterium klassifiziert wurden. Ähnlich verhielten sich die Angaben zum verbreiterten Nasenflügelabstand und hohen Gaumen (vergl. Tabelle 9). Eine Milchzahnpersistenz beziehungsweise ein pathologischer Milchzahnwechsel in Form von Doppelreihenbildung oder gezogenen Milchzähnen aufgrund fehlender Wurzelresorption wurde bei 33 von 42 (79%) STAT3-

mut Patienten berichtet. Sechs STAT3-mut Patienten waren zum Zeitpunkt der Untersuchung zu jung für die Evaluation dieses Merkmals (< 9 Jahre). In der STAT3-wt Kohorte wurde bei drei von 16 evaluierbaren Patienten (> 9 Jahre) ebenfalls ein pathologischer Milchzahnwechsel beschrieben. Einer dieser Patienten hatte mehrere Milchzähne im Alter von 14 Jahren gezogen bekommen, ein 22-jähriger Patient berichtete von einer Milchzahnpersistenz und bei einem 11-jährigen Jungen wurde eine Doppelzahnreihe im Alter von acht Jahren beschrieben.

Weitere Skelett- und Gelenkveränderungen, die bei STAT3-mut Patienten auffielen waren Veränderungen der Schädelform aufgrund einer primären Nahtsynostose (n=6), ein überzähliges Rippenpaar (n=1), Blockwirbel und Keilwirbelbildung im Bereich der Brustwirbelsäule (n=1) und eine Osteoporose, die bereits im Kindes- und Jugendalter auftrat (n=4).

| Klinische Merkmale | STAT3-mut Patienten (n=48) | STAT3-wt Patienten (n=30) |
|---|-------------------------------|------------------------------|
| Geschlecht | [männlich:weiblich] 31:17 | [männlich:weiblich] 19:11 |
| | [% (Anzahl/Gesamt)] | [% (Anzahl/Gesamt)] |
| erhöhtes Serum-IgE¹ | 96 (46/48) | 97 (29/30) |
| Eosinophilie | 93 (43/46) | 77 (23/30) |
| Ekzem | 98 (47/48) | 90 (27/30) |
| Neugeborenenekzem | 74 (34/46) | 40 (12/30) |
| Hautabszess(e) | 85 (41/48) | 37 (11/30) |
| Organabszess(e) | 46 (22/46) | 0 (0/30) |
| Pneumonie(n) | 94 (45/48) | 53 (16/30) |
| Pneumatozelen | 48 (23/48) | 3 (1/30) |
| rezidivierende Infektionen | 89 (42/47) | 70 (21/30) |
| Schwere Infektionen² | 35 (16/46) | 0 (0/30) |
| Orale Candidiasis | 56 (27/48) | 24 (7/29) |
| Nagel/mucocutane Candidiasis | 54 (26/48) | 13 (4/30) |
| zurückbehaltene Milchzähne | 79 (33/42) | 25 (4/16) |
| Frakturen ohne adäquates Trauma | 60 (29/48) | 3 (1/30) |
| Skoliose | 42 (20/48) | 3 (1/30) |
| hyperextensible Gelenke | 60 (28/47) | 23 (7/30) |
| charakteristisches Gesicht | 90 (43/48) | 18 (5/28) |
| Nasenbreite³ | 79 (34/43) | 22 (6/27) |
| Hoher Gaumen | 59 (27/46) | 22 (6/27) |
| zusätzliche atopische Merkmale⁴ | 57 (16/28) | 88 (23/26) |
| NIH-Score ≥ 40 Punkte | 96 (46/48) | 10 (3/30) |
| NIH-Score < 40 Punkte | 4 (2/48) | 90 (27/30) |

¹ IgE (IU/ml) über 10fach der oberen Normgrenze

² Sepsis, Meningitis, Osteomyelitis

³ Nasenbreite > 1SD entsprechend der Normwerttabelle für Alter und Geschlecht (Farkas 1994)

⁴ Allergisches Asthma, Nahrungsmittelallergien, Rhinokonjunktivitis allergica

Tabelle 9: Charakteristische klinische Merkmale von STAT3-mut Patienten im Vergleich zu STAT3-wt Patienten

Zusätzliche Merkmale aus dem atopischen Formenkreis wie allergisches Asthma, allergische Rhinokonjunktivitis oder Nahrungsmittelallergien wurden bei fast allen der STAT3-wt Patienten

(88%) berichtet sowie bei etwas über der Hälfte der STAT3-mut Patienten (57%), die für diese Symptome beurteilt werden konnten.

Als weitere Befunde sind bei den STAT3-mut Patienten ein Mittelliniendefekt in Form von einer gespaltenen Uvula (n=3), Gefäßerkrankungen [Mitralklappeninsuffizienz (n=3), juvenile arterielle Hypertonie (n=1), Bauchaortenaneurysma (n=1) und Myokardinfarkt (n=1)] und Malignome (n=2) zu nennen. Ein Patient, bei dem post-mortem eine Mutation in STAT3 nachgewiesen wurde, hatte ein diffus-großzelliges B-Zell Lymphom. Ein anderer hatte rezidivierende Lymphome der B- und T-Zellreihe.

Ein zusätzlicher Befund bei den STAT3-wt Patienten war eine Urtikaria (n=3).

Eine Korrelation von klinischer Diagnose (mit dem NIH-Score erfasst) und dem STAT3-Genotyp bestand bei 94% der untersuchten Patienten (In Abbildung 12 der jeweils äußere Pfad nach links und rechts).

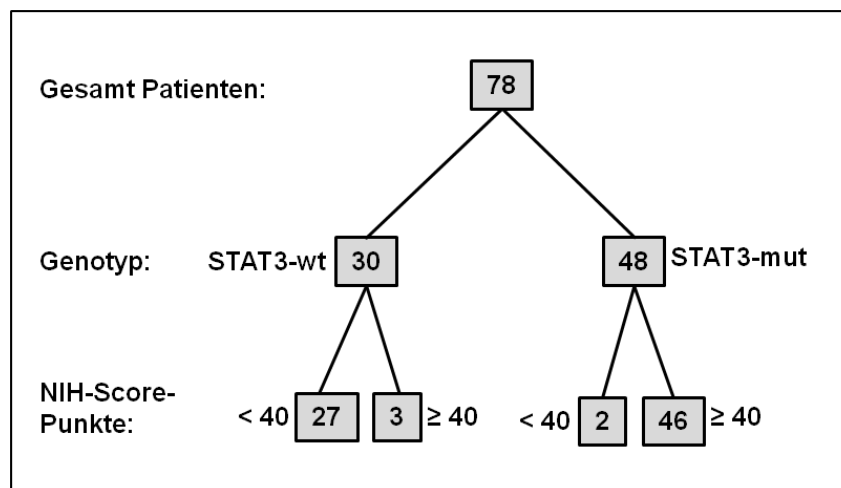


Abbildung 12: Korrelation von STAT3-Genotyp und klinischer Diagnose (NIH-Score ≥ 40 und < 40 Punkte) im Pfaddiagramm

Bei 46 Patienten mit klinischer Diagnose HIES (≥ 40 Punkte im NIH-Score) wurde eine Mutation in STAT3 identifiziert, während 27 Patienten mit dem klinischen Verdacht auf HIES (NIH-Score < 40 Punkte) keine Mutation in STAT3 hatten. Zwei Patienten (7%) mit STAT3 Mutation hatten einen NIH-Score unter 40 Punkten (34 und 37 Punkte). Einer davon, ein zum Zeitpunkt der Untersuchung acht Monate alter Säugling (ID# 53, NIH-Score 34), dessen Vater und Großmutter väterlicherseits ein gesichertes AD-HIES mit STAT3-Mutation (NIH-Score 89 und 83 Punkte) haben, fiel mit Neugeborenenekzem und Pneumonie mit Empyembildung im Alter von drei Monaten auf. Der Zweite, ein 19-jähriger Junge (ID# 26, NIH-Score-Punkte 37), zeigte erhöhte Serum-IgE-Werte (>5000 IU/ml), Ekzem, Hautabszesse, Skoliose und charakteristische Gesichtszüge; Pneumonien oder andere schwere Infektionen traten bei ihm bisher nicht auf. Drei Patienten (4,5%) hatten einen hohen NIH-Score (> 40 Punkte) aber keine STAT3-Mutation. Es handelte sich

bei diesen Patienten um das Mädchen mit AR-HIES Phänotyp (ID# 20, NIH-Score-Punkte 52), einen Jungen im Alter von neun Jahren (ID# 1) und einem zweijährigen Mädchen (ID# 36), beide mit einem NIH-Score von 43 Punkten, schwerem Ekzem, Superinfektion der Haut mit *Staphylokokkus aureus* sowie *Candida albicans* und Pneumonien. Zusätzlich lagen bei dem Jungen charakteristische Gesichtszüge vor, die im NIH-Score als mild bewertet wurden, und bei dem Mädchen wurde eine Oberschenkelfraktur ohne adäquates Trauma angegeben.

3.3.2 Korrelation von Genotyp und T_H17-Zellzahlen

Die Ergebnisse der T_H17-Zellzahlbestimmung bei 53 Patienten zeigten, dass die T_H17-Zellzahlen bei STAT3-mut Patienten signifikant niedriger im Vergleich zu STAT3-wt Patienten waren. Die Grenze zwischen normalen und pathologischen T_H17-Zellzahlen wurde in dieser Arbeit bei 0,2% der gesamt CD4⁺-T-Zellen, basierend auf dem Normkollektiv, festgelegt. Bei 46 von 53 untersuchten Patienten (87%) korrelierte der STAT3-Genotyp mit dem Ergebnis der T_H17-Zellzahlbestimmung. Darunter waren 24 STAT3-mut Patienten, die pathologisch niedrige T_H17-Zellzahlen aufwiesen und 22 STAT3-wt Patienten mit normalen T_H17-Zellzahlen. Bei fünf Patienten bestand keine Korrelation zwischen dem STAT3-Genotyp und der Anzahl der T_H17-Zellen. Drei Patienten, zwei Männer (48 und 42 Jahre) und ein 13-jähriges Mädchen mit klassischem AD-HIES Phänotyp (NIH-Score-Punkte 66, 51 und 56) und STAT3-Mutation, hatten bei mehrfacher Messung T_H17-Zellzahlen, die leicht über der Normgrenze lagen (0,23-0,4% der CD4⁺-T-Zellen). Zwei STAT3-wt Patienten zeigten pathologische (niedrige) T_H17-Zellzahlen. Darunter war ein zweijähriger Junge mit 31 Punkten im NIH-Score und die AR-HIES Patientin (NIH-Score-Punkte 52).

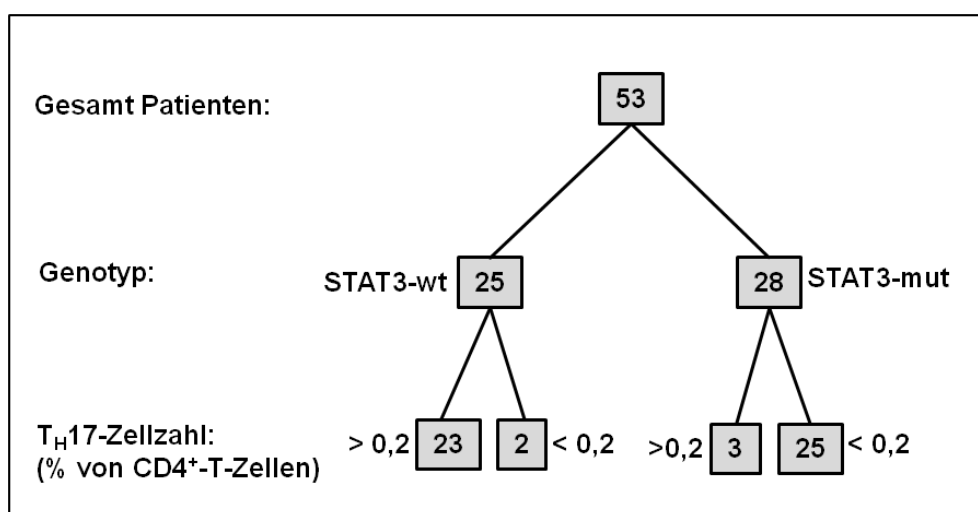


Abbildung 13: Korrelation von STAT3-Genotyp und T_H17- Zellzahlen (>0,2% und <0,2%) im Pfaddiagramm. (Die Zahlen in den grau markierten Kästchen stehen für Patientenzahl n=x)

3.3.3 Korrelation von NIH-Score-Punkten, Genotyp und T_H17-Zellzahlen

Zur Darstellung der Korrelation von NIH-Score-Punkten mit dem STAT3-Status und den T_H17-Zellzahlen erfolgte die Gegenüberstellung aller drei Merkmale in 53 Patienten dieser Studie. Bei STAT3-mut Patienten galt ein hoher NIH-Score (≥ 40 Punkte) mit niedrigen T_H17-Zellzahlen ($<0,2\%$ der CD4+-T-Zellen) positiv korrelierend und für STAT3-wt Patienten ein niedrige NIH-Score (< 40 Punkte) mit normalen T_H17-Zellzahlen ($>0,2\%$ der CD4+-T-Zellen) (Abbildung 14). Bei 44 Patienten (83%) korrelierten alle Ergebnisse positiv miteinander, das heißt die Patienten wurden anhand des NIH-Scores und den T_H17-Zellzahlen richtig kategorisiert (weiß gefüllte Symbole innerhalb des gelb markierten Bereichs in Abbildung 14). Bei acht (15%) der Patienten fiel einer der drei Parameter nicht in den korrelierenden Bereich. Dazu gehörten aus der STAT3-mut Kohorte die zwei Patienten mit niedrigem NIH-Score (hellgrau gefüllte Rauten in Abbildung 14 (x-/y-Wert): 34/0,09 und 37/0,18) und die drei Patienten mit normalen T_H17-Zellzahlen (dunkelgrau gefüllte Rauten: 56/0,23; 66/0,23 und 51/0,3). Aus der STAT3-wt Kohorte gehörten zwei Patienten dazu, die einen NIH-Score > 40 Punkte hatten (hellgrau gefüllte Kreise: 43/0,29 und 43/0,5), ein Patient mit pathologischen T_H17-Zellzahlen (dunkelgrau gefüllter Kreis: 31/0,11). Die AR-HIES Patientin wies sowohl einen hohen NIH-Score als auch pathologische T_H17-Zellzahlen auf und wurde demnach mit beiden Parametern nicht richtig kategorisiert (schwarzes Dreieck: 52/0,11).

Die Patienten der STAT3-wt Kohorte waren zum Zeitpunkt der Untersuchung deutlich jünger als die STAT3-mut Patienten (MW 13 versus 24 Jahre). Unter sechs Jahren waren 12 von 30 (40 %) Patienten ohne STAT3-Mutation, hingegen nur drei von 48 (6,25 %) Patienten mit STAT3-Mutation. Diese Patienten wurden in Abbildung 14 zusätzlich markiert (rot), da sich einige HIES-Merkmale erst im Laufe des Lebens entwickeln (Milchzahnpersistenz, Skoliose, charakteristische Gesichtszüge) und somit die Beurteilung des Zusammenhangs von hohen NIH-Score-Punkten mit STAT3-Mutation bzw. niedrigen NIH-Score-Punkten und STAT3-Wildtyp bei sehr jungen Patienten eingeschränkt ist. Zwei Patienten dieser Altersklasse wurden mit dem NIH-Score nicht richtig klassifiziert (einer falsch-positiv, einer falsch-negativ).

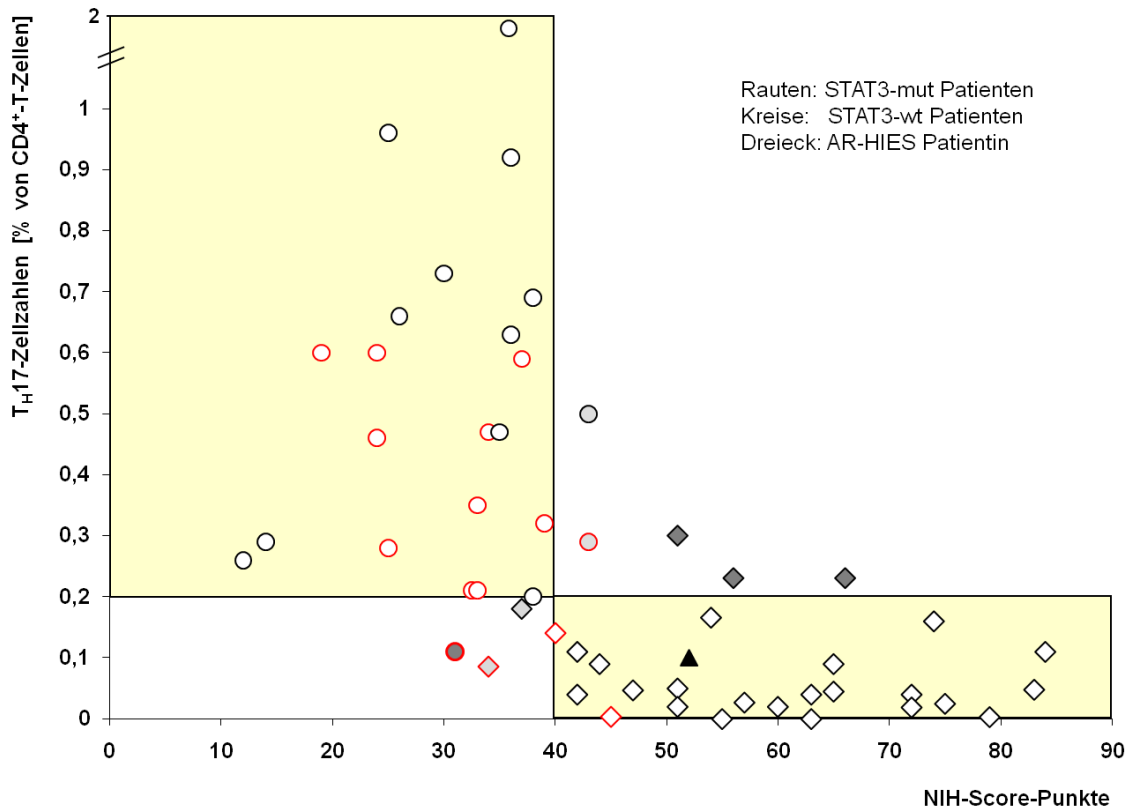


Abbildung 14: Korrelation von Phänotyp (NIH-Score), Genotyp (STAT3-Status) und immunologischem Merkmal (T_H17 -Zellzahl in % der gesamt $CD4^+$ -T-Zellen) in 53 Patienten

Jedes Symbol repräsentiert einen Patienten mit den Merkmalen: NIH-Score-Punkte auf der x-Achse, T_H17 -Zellzahlen auf der y-Achse und der STAT3-Genotyp anhand des entsprechenden Symbols dargestellt (Erläuterungen in der Abbildung). Symbole von Patienten, bei denen die T_H17 -Zellen nicht zu dem jeweiligen Genotyp passen sind dunkelgrau ausgefüllt. Hellgrau gefüllte Symbole zeigen Patienten, bei denen der NIH-Score nicht mit dem Genotyp korreliert. Rot umrandete Symbole zeigen Patienten unter sechs Jahren.

3.4 Vereinfachung des Diagnoseschemas zum Hyper-IgE Syndrom

Um eine Differenzierung von Patienten mit STAT3-HIES und Patienten mit ähnlichen Krankheitsbildern (z.B. atopischer Dermatitis) in allen Altersstufen auf klinischer Ebene zu ermöglichen, erfolgte die Erstellung eines an den NIH-Score angelehnten, vereinfachten diagnostischen Leitfadens, der als Hilfe bei der Entscheidung für eine STAT3-Sequenzierung dienen soll.

3.4.1 Entwicklung des 5-Punkt-Score

Aus der bereits dargestellten Häufigkeitsverteilung von 20 HIES charakterisierenden Symptomen bei STAT3-mut und STAT3-wt Patienten dieser Kohorte wurden die Sensitivität und Spezifität berechnet. Anschließend erfolgte eine Selektion der klinischen Merkmale, die hoch sensitiv (über 90%) und wenig spezifisch (unter 25%) für Patienten mit STAT3-Mutation waren von den Merkmalen, die relativ hoch spezifisch, aber weniger sensitiv erschienen. Daraus resultierte eine Einteilung in Haupt- und Nebenmerkmale, die sich folgendermaßen gliedert (Tabelle 10).

| | Klinische Merkmale | STAT3-mut Patienten (n=48) [% (Anzahl/Gesamt)] | STAT3-wt Patienten (n=30) [% (Anzahl/Gesamt)] | Sensitivität (%) | Spezifität (%) |
|---|----------------------------------|--|---|---------------------|-------------------|
| Haupt- merkmale | erhöhtes Serum-IgE ¹ | 96 (46/48) | 97 (29/30) | 96 | 3 |
| | Eosinophilie | 93 (43/46) | 77 (23/30) | 94 | 23 |
| | Ekzem | 98 (47/48) | 90 (27/30) | 98 | 10 |
| Nebenmerkmale | Organabszess(e) | 46 (22/46) | 0 (0/30) | 48 | 100 |
| | schwere Infektionen ² | 35 (16/46) | 0 (0/30) | 35 | 100 |
| | Pneumatozelen | 48 (23/48) | 3 (1/30) | 48 | 97 |
| | Frakturen ohne adäquates Trauma | 60 (29/48) | 3 (1/30) | 60 | 97 |
| | Skoliose | 42 (20/48) | 3 (1/30) | 42 | 97 |
| | Nagel/mukokutane Candidiasis | 54 (26/48) | 13 (4/30) | 54 | 87 |
| | charakteristisches Gesicht | 90 (43/48) | 18 (5/28) | 90 | 82 |
| | zurückbehaltene Milchzähne | 79 (33/42) | 25 (4/16) | 79 | 81 |
| | Nasenbreite ³ | 79 (34/43) | 22 (6/27) | 79 | 78 |
| | Hoher Gaumen | 59 (27/46) | 22 (6/27) | 59 | 78 |
| | hyperextensible Gelenke | 60 (28/47) | 23 (7/30) | 60 | 77 |
| | Orale Candidiasis | 56 (27/48) | 24 (7/29) | 56 | 74 |
| | Hautabszess(e) | 85 (41/48) | 37 (11/30) | 85 | 63 |
| | Neugeborenen Ekzem | 74 (34/46) | 40 (12/30) | 74 | 60 |
| | Pneumonie(n) | 94 (45/48) | 53 (16/30) | 94 | 47 |
| | rezidivierende Infektionen | 89 (42/47) | 70 (21/30) | 89 | 30 |
| zusätzliche atopische Merkmale ⁴ | 57 (16/28) | 88 (23/26) | 57 | 12 | |

¹ IgE (IU/ml) über 10fach der oberen Normgrenze

² Sepsis, Meningitis, Osteomyelitis

³ Nasenbreite > 1SD entsprechend der Normwerttabelle für Alter und Geschlecht (aus Farkas et.al 1994)

⁴ Allergisches Asthma, Nahrungsmittelallergien, Rhinokonjunktivitis allergica

Tabelle 10: Sensitivität und Spezifität von 20 klinischen Merkmalen zur Charakterisierung des STAT3-HIES

Erhöhtes Serum-IgE, Ekzem und Eosinophilie stellten Hauptmerkmale von sowohl STAT3-mut als auch STAT3-wt Patienten dar. Ein Zusammenhang zwischen Höhe und Verlauf dieser

Laborparameter und der Ausprägung des Ekzems mit der Diagnose „STAT3-HIES“ oder „kein STAT3-HIES“ wurde bei Patienten dieser Studie nicht beobachtet, so dass auf eine zusätzliche Wertung dieser Kriterien verzichtet wurde.

17 weitere Merkmale stellen zusätzliche Kriterien (Nebenkriterien) dar, die nach ihrer Spezifität für das HIES in absteigender Reihenfolge aufgelistet wurden. Auch bei diesen Kriterien waren keine Rückschlüsse auf den STAT3-Status aufgrund der Häufigkeit oder des Ausprägungsgrades eines Merkmals möglich. Die Wertung der Nebenkriterien basiert folglich auf Ja/Nein-Entscheidungen bezüglich des Vorhandenseins eines Merkmals. War ein Symptom vorhanden wurde ein Punkt mit bestimmter Gewichtung vergeben. Aus der Summe der vorhandenen Merkmale ließ sich dann die Wahrscheinlichkeit, dass ein AD-HIES vorlag, ableiten. Um eine einfache Erfassung der Merkmale in allen Altersstufen zu gewährleisten, wurde auf eine Erhöhung der Punkte durch gehäuftes Auftreten eines Symptoms verzichtet und nur eine quantitative Wertung vorgenommen. Zur weiteren Vereinfachung wurden die im NIH-Score einzeln aufgeführten Merkmale „charakteristisches Gesicht“, „breite Nasenwurzel“ und „hoher Gaumen“ in dem Überbegriff „charakteristische Facies“ zusammengefasst. War eines dieser drei Merkmale vorhanden galt für das Merkmal „charakteristische Facies“ die Entscheidung „Ja“. Die Kombination von zwei oder allen drei dieser Merkmale bei einem Patienten erhöhte die Wertung dieses Merkmals nicht.

Zusätzliche atopische Merkmale (allergisches Asthma, allergische Rhinokonjunktivitis, Nahrungsmittelallergien), die nicht für ein STAT3-HIES sprachen (Spezifität 11,5%), wurden mit einem negativen Punkt gewertet. Eine positive HIES-Familienanamnese wurde in die Gesamtwertung mit einbezogen, da bei autosomal-dominantem Erbgang die Wahrscheinlichkeit ein STAT3-HIES zu haben 50% beträgt.

Für die Auswahl der Gewichtung von insgesamt 16 Nebenmerkmalen in einem vereinfachten HIES-Scoringssystem wurden vier Versionen an unserem Patientenkollektiv getestet (Tabelle 11). Für die Auswertung des vereinfachten Scoring-Systems wurde folgende Vorgehensweise definiert:

1. Liegt eines der klinischen Hauptmerkmale vor, kann es sich differentialdiagnostisch um ein HIES handeln, so dass eine weitere Beurteilung der Nebenmerkmale erfolgen sollte.
2. Ist ein Nebenkriterium vorhanden so werden die dafür vorgesehenen Punkte vergeben.
3. Die durch die Summe der Nebenkriterien errechnete Gesamtpunktzahl ergibt Auskunft darüber, ob der Verdacht auf ein STAT3-HIES verworfen oder erhärtet werden kann.

Patienten mit einer Gesamtpunktzahl von ≥ 5 Punkten wurden in die Kategorie „STAT3-HIES sehr wahrscheinlich“ eingestuft. Bei < 5 Punkten wurden sie der Kategorie „HIES unwahrscheinlich“ zugeordnet.

| Hauptmerkmale | | | | | |
|---------------------------------|----------------------------|-----------------------------------|------------------|------------------|------------------|
| Erhöhtes Serum-IgE | } | Merkmale ohne Punktwertung | | | |
| Eosinophilie | | | | | |
| Ekzem | | | | | |
| Nebenmerkmale | | Verteilung der Scorepunkte | | | |
| | | Version A | Version B | Version C | Version D |
| Organabszesse | > 85% Spezifität | 1 | 2 | 2 | 2 |
| schwere Infektionen | | 1 | 2 | 2 | 2 |
| Pneumatozelen | | 1 | 2 | 2 | 4 |
| Frakturen ohne adäquates Trauma | | 1 | 2 | 1 | 2 |
| Skoliose | | 1 | 2 | 1 | 2 |
| Nagel/mukokutane Candidiasis | | 1 | 2 | 2 | 2 |
| charakteristische Facies | < 85% Spezifität | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Milchzahnpersistenz | | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Hyperextensibilität | | 1 | 1 | 1 | 1 |
| orale Candidiasis | | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Hautabszesse | | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Neugeborenenekzem | | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Pneumonien | | 1 | 1 | 1 | 1 |
| erhöhte Infektanfälligkeit | | 1 | 1 | 1 | 1 |
| positive HIES-Familienanamnese | | 1 | 2 | 2 | 2 |
| zusätzliche atopische Merkmale | | | -1 | -1 | -1 |
| Sensitivität (%) | | 94 | 98 | 98 | 98 |
| Spezifität (%) | | 87 | 83 | 83 | 80 |

Tabelle 11: Verteilung der Score-Punkte für 16 Nebenmerkmale in vier verschiedenen Versionen zur Vereinfachung der klinischen Evaluation von Patienten mit Verdacht auf HIES

In Version A wurden für jedes vorhandene Nebenmerkmal kategorisch ein Punkt vergeben. In Version B-D erfolgte die Punktvergabe in Anlehnung an die Spezifitätsverteilung jedes Merkmals. Merkmale mit hoher Spezifität (> 85 %) erhielten im Vergleich zu weniger spezifischen Merkmalen (< 85 %) durch die doppelte Punktzahl mehr Gewicht (Version B). Version C stellte einen Weg dar, eine möglichst äquivalente Beurteilung in allen Altersklassen zu ermöglichen, indem den zwar hoch spezifischen, aber häufig erst im Alter hinzukommenden Merkmalen wie „Skoliose“ und „Frakturen ohne adäquates Trauma“ weniger Gewicht beigemessen wurde. Diese Punkteverteilung führte jedoch weder zu einer besseren Erfassung von STAT3-mut Patienten noch zu einer geringeren falsch positiven Rate für die Erfassung der STAT3-wt Patienten (gleiche Sensitivität und Spezifität von Version B und C). Ein pathognomonisches Merkmal für STAT3-HIES war die Bildung von Pneumatozelen nach Pneumonien (96,7 % Spezifität in dieser Kohorte). Eine besondere Gewichtung dieses Merkmals mit einer höheren Punktzahl (Version D) verbesserte das Resultat des vereinfachten Scoring-Systems für die Erfassung von STAT3-HIES Patienten jedoch nicht. Ein weiterer für das HIES sehr spezifischer Parameter war das Merkmal Milchzahnpersistenz (81% Spezifität). Da dieses Merkmal stark altersabhängig ist und besonders Kinder unter 6 Jahren aus der Erhebung herausfallen, beziehungsweise eine eindeutige Beurteilung

erst im Erwachsenenalter erfolgen kann, erfolgte hier keine zusätzliche Gewichtung durch Erhöhen der Punktzahl.

Das Resultat der Score-Versionen A-D bei 78 untersuchten Patienten wird schematisch in Abbildung 15 dargestellt. Mit dem Ziel, eine hohe Sensitivität für die Erfassung von STAT3-mut Patienten zu erreichen und gleichzeitig möglichst wenig falsch-positive Patienten zu eruieren, galten Version B und C als verlässlichste Varianten.

Die Sensitivität dieser Score-Versionen ergab 98% und die Spezifität 83%. Nur geringe Abweichungen in Sensitivität und Spezifität wurden für Version A und D berechnet (siehe Tabelle 11).

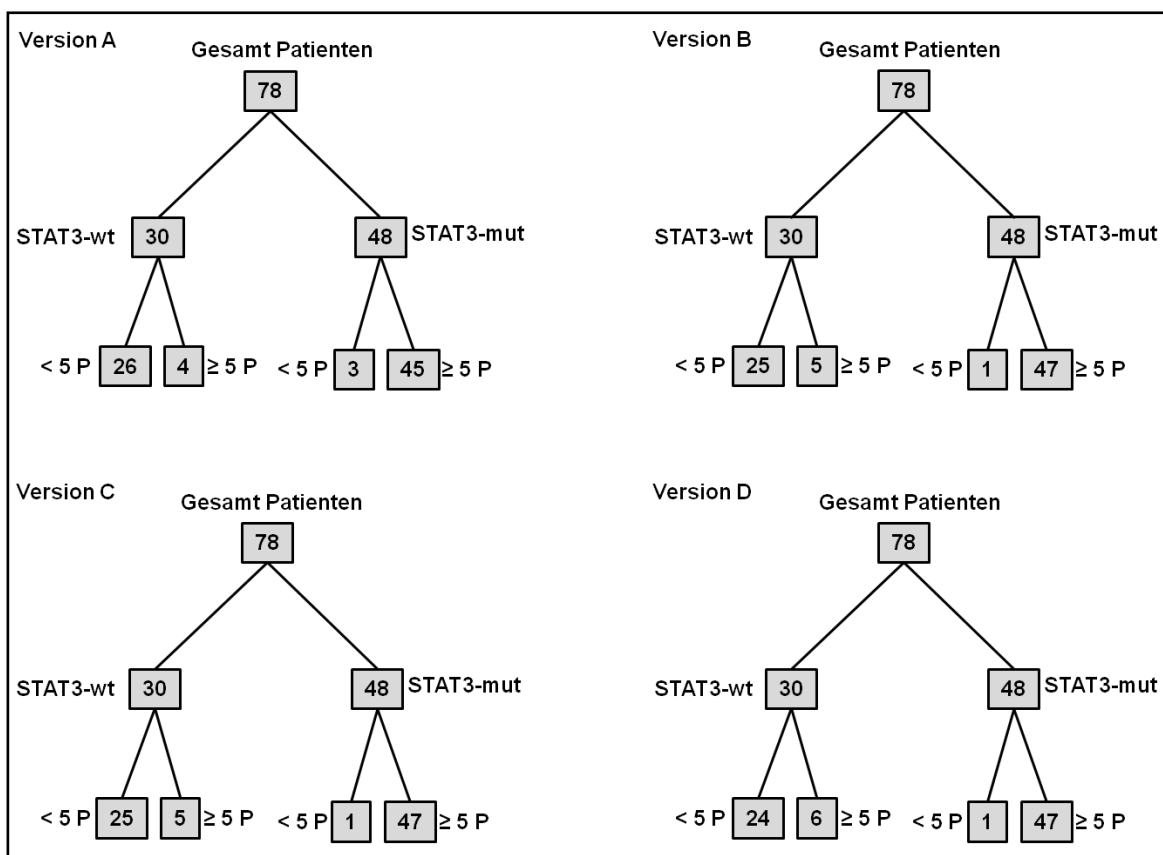


Abbildung 15: Schematische Darstellung der Ergebnisse der Score-Versionen A-D in 78 Patienten. In den grau markierten Kästchen ist die Patientenanzahl $n=x$ angegeben. P=Scorepunkte

Da es in dieser Kohorte keinen Unterschied machte, die eher altersabhängigen Merkmale (Skoliose und Frakturen ohne adäquates Trauma) geringer zu bewerten, erfolgte die Punktevergabe der Nebenmerkmale in einem vereinfachten klinischen Score-Systems gemäß Version B. Zusätzlich zu den Score-Punkten wurde die Bestimmung der T_H17 -Zellzahlen bei der Entscheidung zur Durchführung der STAT3-Sequenzierung herangezogen. Zusammengefasst ergab sich daraus der „5-Punkt-Score“, der einen diagnostischen Leitfaden für die Differenzierung von STAT3-HIES und ähnlichen Krankheitsbildern darstellt (Tabelle 12).

| A | Hauptkriterien: Ekzem, Serum IgE über 10fach der oberen Normgrenze, Eosinophilie | | |
|--|--|------------------------|------------------|
| B | Nebenkriterien: | nicht vorhanden | vorhanden |
| | Neugeborenenekzem | 0 | + 1 |
| | Hautabszess(e) | 0 | + 1 |
| | Organabszess(e) | 0 | + 2 |
| | Erhöhte Infektionsanfälligkeit Definiert als über 6 Episoden/Jahr von z.B. Rhinitis, Sinusitis, Otitis, oder Bronchitis und/oder antibiotische Behandlung bei den meisten der Infekte | 0 | + 1 |
| | Schwere Infektionen (z.B. Sepsis, Meningitis, Osteomyelitis) | 0 | + 2 |
| | Pneumonie(n) | 0 | + 1 |
| | Pneumatozele(n) | 0 | + 2 |
| | Orale Candidainfektion(en) | 0 | + 1 |
| | Candidainfektionen der Nägel oder mukokutane Candidiasis | 0 | + 2 |
| | Hyperextensibilität der Gelenke | 0 | + 1 |
| | Fraktur(en) ohne adäquates Trauma | 0 | + 2 |
| | Milchzahnpersistenz | 0 | + 1 |
| | Skoliose | 0 | + 2 |
| | Charakteristische Facies (breiter Naseflügelabstand, Hypertelorismus, hoher Gaumen) | 0 | + 1 |
| | Positive Familienanamnese für Hyper-IgE Syndrome | 0 | + 2 |
| | Allergische Manifestation von Asthma und/oder Nahrungsmittelallergien | 0 | - 1 |
| Gesamt Punktzahl: | | 0 | |
| <p>Interpretation:</p> <p>Ein oder mehr Hauptkriterien und:</p> <ul style="list-style-type: none"> • ≥ 5 Punkte => Hyper-IgE Syndrom ist sehr wahrscheinlich; Molekulardiagnostik und T_H17-Zellzahlbestimmung sollte erfolgen • < 5 Punkte => Hyper-IgE Syndrom ist unwahrscheinlich; Molekulardiagnostik nur bei auffälligen T_H17-Zellzahlen | | | |

Tabelle 12: Vereinfachtes klinisches Diagnoseschema zum STAT3-HIES: 5-Punkt-Score

Die Erhebung des 5-Punkt-Scores bei STAT3-mut und STAT3-wt Patienten dieser Studie erfolgte retrospektiv anhand der klinischen Daten, die bereits für die NIH-Score Erhebung eruiert wurden. Die Symptome jedes Patienten, die zu den Score-Punkten führten, sind aus Tabelle 5 und Tabelle 6 (Kap. 3.1.) zu entnehmen.

Nur ein Patient mit STAT3-Mutation erreichte vier Punkte im 5-Punkt-Score und wurde demzufolge mit diesem Score nicht erfasst; dies war der 19-jährige Patient (ID# 26) mit mildem HIES-Phänotyp (vergl. 3.3.1). Fünf Patienten der STAT3-wt Kohorte erreichten ebenfalls eine Gesamtpunktzahl von fünf oder mehr Punkten, womit die falsch-positiv Rate bei 17% lag. Dazu gehörte die bereits erwähnte Patientin mit AR-HIES-Phänotyp (ID# 20) und das zweijährige Mädchen (ID# 36), die beide sechs Punkte im 5-Punkte-Score erreichten. Ein 14-jähriger Patient (ID# 11) kam aufgrund einer leichten Skoliose, Hyperextensibilität der Gelenke, nicht spontan verlorenen Milchzähnen, einem etwas verbreiterten Nasenflügelabstand (= 5 Punkte) sowie mehreren infektiologischen Nebenmerkmalen (orale Candidainfektionen, rezidivierenden Infektionen, Pneumonie, Neugeborenenekzem, Allergien => 3 Punkte) insgesamt auf acht Punkte im 5-Punkt-Score. Ein zwei Jahre alter Patient ohne STAT3 Mutation (ID# 44), der ein Neugeborenenekzem, Hautabszesse, eine Pneumonie, orale und Nagelcandidiasis, rezidivierende

Sinusitiden und Allergien (= 6 Punkte) aufwies und ein dreijähriger Junge (ID #21), der durch ein Neugeborenenekzem, Hautabszessen, Pneumonien, rezidivierenden Infektionen und hyperextensible Gelenke auffiel, erreichten genau fünf Punkte.

3.4.2 Korrelation von 5-Punkte-Score, Genotyp und T_H17-Zellzahlen

Ähnlich wie in Abschnitt 3.2.3 erfolgte in 53 Patienten eine Korrelation der Ergebnisse des 5-Punkt-Scores mit den T_H17-Zellzahlen und dem STAT3-Genotyp (Abbildung 16). Bei 43 (81%) der Patienten korrelierte das Ergebnis des 5-Punkt-Scores mit den T_H17-Zellzahlen (Grenze bei 0,2% der CD4⁺-T-Zellen) und dem STAT3-Genotyp positiv miteinander (weiß gefüllte Symbole in den gelb markierten Bereichen in Abbildung 16). Bei neun Patienten (17%) (5 STAT3-wt und 4 STAT3-mut Patienten) lagen entweder der 5-Punkt-Score oder die T_H17-Zellzahlen nicht in dem für den STAT3-Genotyp definierten Bereich (in Grautönen markierte Symbole in Abbildung 16). Die fünf STAT3-wt Patienten, die ≥ 5 -Punkte im Score erreichten, hatten alle normale T_H17-Zellzahlen, während der 19-jährige STAT3-mut Patient, der anhand des 5-Punkt-Scores in die falsche Kategorie eingeordnet wurde (4 Punkte trotz STAT3-Mutation), seinem Genotyp entsprechend niedrige T_H17-Zellzahlen aufwies.

Die AR-HIES Patientin hatte sowohl einen hohen 5-Punkt-Score als auch niedrige T_H17-Zellzahlen, was nicht mit ihrem STAT3-wt Genotyp korrelierte (siehe Abbildung 16). Die Symbole für Patienten unter sechs Jahren sind in Abbildung 16 mit einem rot markierten Rand gekennzeichnet. Drei Patienten dieser Altersklasse wurden mit dem 5-Punkt-Score falsch-positiv getestet, kein Patient unter sechs Jahren wurde falsch-negativ getestet.

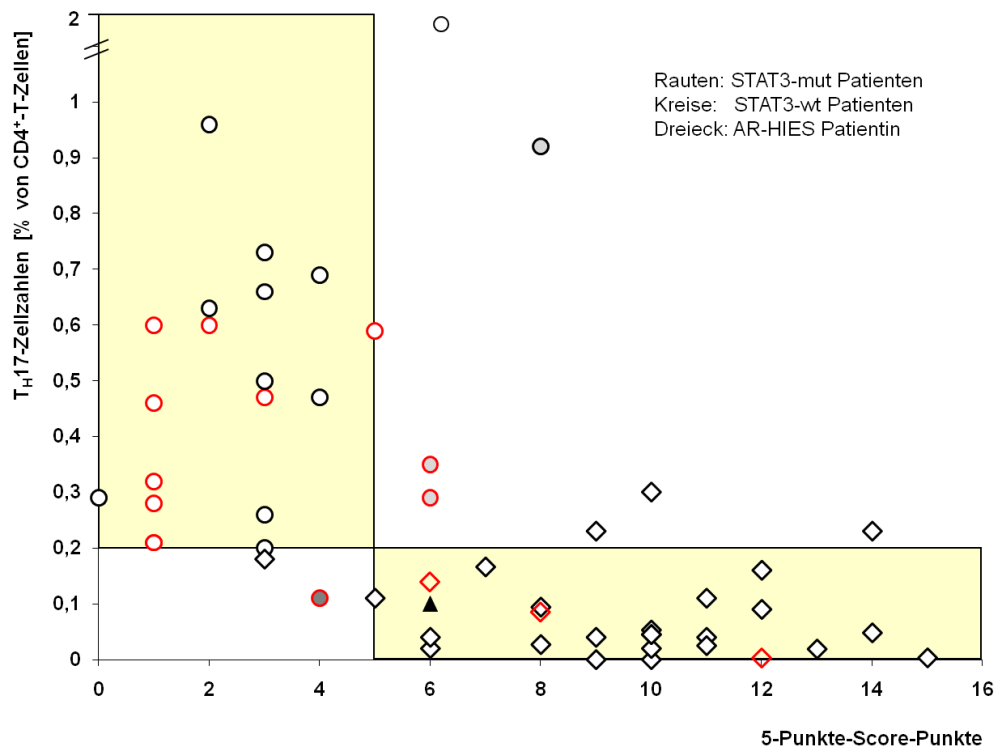


Abbildung 16: Korrelation von Phänotyp (5-Punkt-Score), immunologischen Daten (T_H17 -Zellen) und STAT3-Genotyp in 53 untersuchten Patienten.

Jedes Symbol repräsentiert alle drei Merkmale eines Patienten; 5-Punkte-Score Punkte auf der x-Achse, $TH17$ -Zellzahlen auf der y-Achse und der STAT3 Genotyp anhand des entsprechenden Symbols dargestellt (Erläuterungen in der Abbildung). Symbole von Patienten, bei denen die $TH17$ -Zellen nicht zu dem jeweiligen Genotyp passen sind dunkelgrau ausgefüllt. Hellgrau gefüllte Symbole zeigen Patienten, bei denen der 5-Punkte Score nicht mit dem Genotyp korreliert. Rot umrandete Symbole zeigen Patienten unter fünf Jahren an.

3.4.3 Vergleich von 5-Punkt-Score und NIH-Score Ergebnissen

Die beobachtete Übereinstimmung des Testergebnisses (Score-Wert) mit der Erkrankung (STAT-HIES) lag in dieser Studie für die Anwendung des 5-Punkt-Scores bei 92,3% und bei Gebrauch des NIH-Scores bei 93,6%. Betrachtet man die Ergebnisse beider Scores zusammen, lag die Übereinstimmungsrate bei 89,7%, das heißt 46 STAT3-mut Patienten und 24 STAT3-wt Patienten wurden mit beiden Scores richtig kategorisiert. Bei den meisten Patienten korrelierten hohe NIH-Score-Punkte mit hohen Punkten im 5-Punkt-Score und umgekehrt, eine exakte lineare Korrelation lag jedoch nicht vor. Die Beziehung der Ergebnisse beider Scores für jeden Patienten werden in Abbildung 17 gegenübergestellt.

Insgesamt wurden acht Patienten (6 STAT3-wt und 2 STAT3-mut) mit einem oder beiden Scores nicht richtig kategorisiert. Aus der STAT3-wt Kohorte betraf dies die AR-HIES Patientin (ID# 20: NIH-Score 52 Punkte und 5-Punkte-Score 6 Punkte) und das zweijährige Mädchen (ID# 36: NIH-Score 43 Punkte 5-Punkte-Score 6 Punkte), die mit beiden Scores in die Kategorie „HIES wahrscheinlich“ eingestuft wurden, sowie vier weitere Patienten, die mit dem NIH-Score (mit 43 Punkten) oder mit dem 5-Punkt-Score (drei Patienten mit 5, 6 und 8 Punkten) falsch-positiv getestet wurden.

Unter den STAT3-mut Patienten wurde ein Patient mit beiden Scores (ID# 26: 37 NIH-Score-Punkte und 4 Punkte im 5-Punkt-Score) fälschlicherweise in die Kategorie „HIES ist unwahrscheinlich“ eingestuft und ein Patient (ID# 53) mit dem NIH-Score unterschätzt (34 Punkte), mit dem 5-Punkt-Score (8 Punkte) aber in die richtige Kategorie eingestuft.

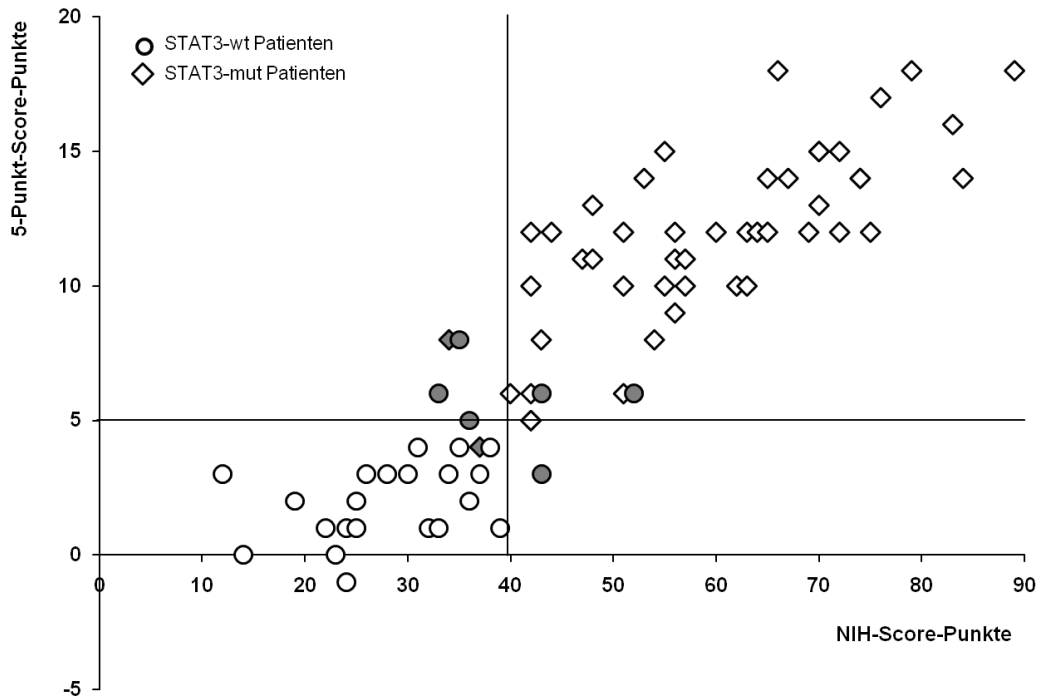


Abbildung 17: Ergebnisse des NIH-Scores (x-Achse) zu Ergebnissen des 5-Punkt-Scores (y-Achse) in STAT3-wt und STAT3-mut Patienten

Grau markierte Symbole zeigen Patienten, die mit einem/oder beiden Score Versionen nicht im Genotyp entsprechenden Bereich liegen.

Die für den jeweiligen Score zutreffende Anzahl der richtig/falsch zugeordneten Patienten wird in folgenden Kontingenztabelle(n) angezeigt, woraus die Sensitivität und Spezifität für die Erfassung von STAT3-HIES Patienten für jeden Score resultierte (Tabelle 13).

A) NIH-Score

| Phänotypische Einteilung: | Genotypische Einteilung: | | Summe |
|---------------------------|--------------------------|--------------------|-------|
| | STAT3-mut Patienten | STAT3-wt Patienten | |
| NIH-Score \geq 40 | 46 | 3 | 49 |
| NIH-Score $<$ 40 | 2 | 27 | 29 |
| Summe | 48 | 30 | 78 |

Sensitivität: 96%

Spezifität: 90%

B) 5-Punkt-Score

| Phänotypische Einteilung: | Genotypische Einteilung: | | Summe |
|---------------------------|--------------------------|--------------------|-------|
| | STAT3-mut Patienten | STAT3-wt Patienten | |
| New-Score \geq 5 | 47 | 5 | 52 |
| New-Score $<$ 5 | 1 | 25 | 26 |
| Summe | 48 | 30 | 78 |

Sensitivität: 98%

Spezifität: 83%

Tabelle 13: Vergleich von Phänotyp und STAT3-Genotyp mit dem NIH-Score (A) und dem 5-Punkt-Score (B)

Beide diagnostischen Tests erkannten die STAT3-mut Patienten aus der Gesamtkohorte von 78 Patienten dieser Studie mit einer Sensitivität von $> 90\%$, wobei der 5-Punkt-Score bei Vorliegen der Erkrankung mit einer 2% höheren Wahrscheinlichkeit ein positives Resultat lieferte. Betrachtet man die Spezifität der Scores, lag die Einstufung von STAT3-wt Patienten als „nicht STAT3-HIES Patienten“ mit dem NIH-Score etwas höher. Beide Score-Versionen erlaubten jedoch eine relativ gute Differenzierung von STAT3-mut und STAT3-wt Patienten in dieser Kohorte.

Zur Prüfung der Anwendbarkeit beider Scores bei sehr jungen Patienten mit Verdacht auf HIES erfolgte die Gegenüberstellung der Ergebnisse von unter sechsjährigen Patienten (3 STAT3-mut und 12 STAT3-wt Patienten).

Zwei STAT3-mut Patienten (3 und 5 Jahre) wurden sowohl mit dem NIH-Score als auch mit dem 5-Punkte-Score in die richtige Kategorie eingestuft. Einer aus der STAT3-mut Kohorte, der acht Monate alte Säugling, erreichte im NIH-Score unter 40 Punkte (34 Punkte), im 5-Punkte-Score acht Punkte (grau markierte Raute in Abbildung 18). Bei den STAT3-wt Patienten unter sechs Jahren war die klinische Beurteilung anhand des 5-Punkte-Scores dem NIH-Score etwas unterlegen. Drei STAT3-wt Patienten im Alter von zwei und drei Jahren lagen gerade über der 5-

Punkte-Grenze (einer mit 5 und zwei mit 6 Punkten), während nur einer von ihnen mit 43 Punkten auch im NIH-Score über der Grenze gemäß dem STAT3-Genotyp lag (vergl. Abbildung 18). Die Sensitivität, mit der im 5-Punkt-Score eine STAT3-Mutation bei Patienten unter sechs Jahren erfasst wurde, betrug 100%, die Spezifität lag bei 75%. Im Vergleich dazu hatte der NIH-Score für die Erfassung der unter sechs jährigen Patienten mit STAT3-Mutation eine Sensitivität von 67% und eine Spezifität von 92%.

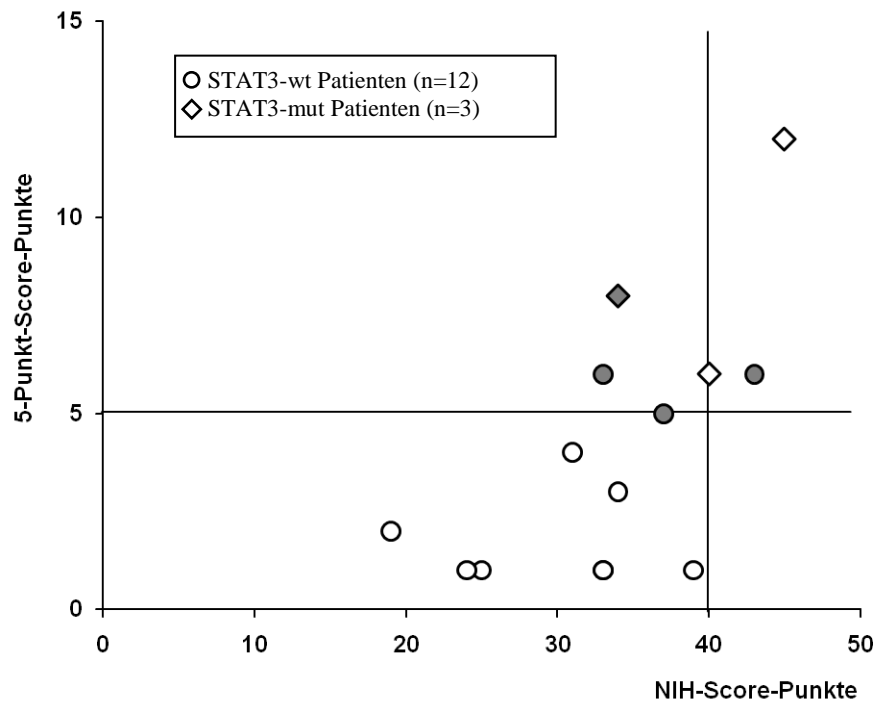


Abbildung 18: NIH-Score (y-Achse) gegen 5-Punkt-Score (x-Achse) von Patienten unter sechs Jahren

Grau markierte Symbole zeigen Patienten, die außerhalb des zu ihrem STAT3-Genotyp passenden Scorebereichs liegen.

Die Resultate der Korrelationsanalysen von klinischem Score, immunologischen Daten und dem STAT3-Genotyp von jedem Scoring-System wurden wie folgt gegenübergestellt:

A) NIH-Score

Einteilung nach STAT3-Genotyp:

| Ergebnisse von NIH-Score und Immunologie: | STAT3-mut Patienten | STAT3-wt Patienten | Summe |
|---|---------------------|--------------------|-------|
| ≥ 40 Punkte und T _H 17-Zellen < 0,2% | 23 | 1 | 24 |
| ≥ 40 Punkte und T _H 17-Zellen > 0,2% | 3 | 2 | 5 |
| < 40 Punkte und T _H 17-Zellen > 0,2% | 0 | 21 | 21 |
| < 40 Punkte und T _H 17-Zellen < 0,2% | 2 | 1 | 3 |
| Summe | 28 | 25 | 53 |

B) 5-Punkt-Score

Einteilung nach STAT3-Genotyp:

| Ergebnisse von 5-Punkt-Score und Immunologie: | STAT3-mut Patienten | STAT3-wt Patienten | Summe |
|--|---------------------|--------------------|-------|
| ≥ 5 Punkte und T _H 17-Zellen < 0,2% | 24 | 1 | 25 |
| ≥ 5 Punkte und T _H 17-Zellen > 0,2% | 3 | 4 | 7 |
| < 5 Punkte und T _H 17-Zellen > 0,2% | 0 | 19 | 19 |
| < 5 Punkte und T _H 17-Zellen < 0,2% | 1 | 1 | 2 |
| Summe | 28 | 25 | 53 |

Tabelle 14: Korrelationsvergleich von klinischem Score, T_H17-Zellzahlen und STAT3-Genotyp mit dem NIH-Score (A) und dem 5-Punkt-Score (B) in 53 Patienten.

Anzahl der richtig eingestuften Patienten fett gedruckt.

Für die Kombination des 5-Punkt-Scores mit den T_H17-Zellzahlen ergab sich eine Sensitivität von 86% für das Erkennen von STAT3-mut Patienten mit niedrigen T_H17-Zellzahlen (24 von 28 Patienten). Im Vergleich dazu lag die Sensitivität bei der Kombination von NIH-Score und T_H17-Zellzahlen bei 82% (23 von 28 Patienten). Die Spezifität betrug für beide Scores 96%.

4 Diskussion

Das autosomal dominante Hyper-IgE-Syndrom gehört zu den angeborenen Immundefekten und wird durch infektiologische sowie assoziierte Skelett- und Bindegewebssymptome charakterisiert (Grimbacher et al. 1999a). Im Jahr 2007 gelang durch die Identifikation von Mutationen im Gen *STAT3* bei Patienten mit klassischem HIES die Aufklärung der ätiologischen Ursache dieses Krankheitsbildes, so dass heute eine molekulargenetische Sicherung der bisher klinisch gestellten Diagnose möglich ist (Holland et al. 2007; Minegishi et al. 2007).

Im Rahmen dieser Studie konnte das Spektrum der *STAT3*-Mutationen beim AD-HIES erweitert werden. Durch Genotyp-Phänotyp Analysen wurden die wichtigsten Symptome, welche Patienten mit *STAT3*-Mutation charakterisieren, definiert. Daraus resultierte ein diagnostischer Leitfaden, der Patienten für eine *STAT3*-Sequenzierung herausfiltert, so dass eine sichere und frühzeitige Diagnosestellung des *STAT3*-HIES ermöglicht wird.

4.1 Patientendaten und phänotypische Einteilung

In diese Studie wurden 78 Patienten mit der klinischen Diagnose „gesichertes-HIES“ bzw. „Verdacht auf HIES“ eingeschlossen. Die meisten Patienten wurden in der Infektions-immunologischen Abteilung des Haunerschen Kinderspitals betreut, viele schon über Jahre bis Jahrzehnte. Ein Drittel der Patienten kam durch Kooperationspartner hinzu. Die geographische Verteilung der Patienten erstreckte sich über ganz Deutschland und das Ausland, so dass es für einige der Patienten nicht möglich war, sich bei uns persönlich vorzustellen. Viele Patienten wurden bereits in früheren Studien klassifiziert, folglich kann bei der Einschätzung des klinischen Phänotyps eine gewisse Selektionsverzerrung vorgelegen haben. Zudem erfolgte die Datenerhebung zum Teil retrospektiv und beinhaltete die Beurteilung von lange zurückliegenden medizinischen Ereignissen, die zum Teil nicht ausreichend aufgezeichnet waren und somit auch mündliche Aussagen der Patienten gewertet werden mussten oder einige Angaben lückenhaft blieben. Trotz der daraus resultierenden leichten Abweichungen bei der Gesamtanzahl der Patienten in der entsprechenden Kohorte (vergl. Tabelle 5 (3.1.1) und Tabelle 6 (3.1.2)) konnte dennoch ein aussagekräftiges Ergebnis erzielt werden.

Die Einteilung der Patienten in eine „klinisch-gesicherte HIES“ Kohorte und eine „Verdacht auf HIES“ Kohorte erfolgte durch den NIH-Score (Grimbacher et al. 1999b), der für die Evaluation von HIES-Patienten in der Literatur besonders vor der molekulargenetischen Aufklärung des HIES häufig verwendet wurde (Eberting et al. 2004; Renner et al. 2005; Freeman et al. 2007b). Während die Häufigkeitsverteilung der Symptome in der „klinisch-gesicherten“ HIES Kohorte vergleichbar mit den Angaben zur Inzidenz von HIES-Symptomen in der Literatur sind (Grimbacher et al. 2005), zeichnete sich der mildere Phänotyp der „Verdacht auf HIES“ Kohorte durch insgesamt

weniger infektiologische und nicht-infektiologische Merkmale, die neben einem Ekzem, erhöhtem Serum-IgE und Eosinophilie auftraten, aus. Insgesamt waren jedoch alle Merkmale sowohl bei den gesicherten HIES-Patienten als auch bei denen mit milderem Phänotyp vorhanden, so dass von einer ausreichenden Übereinstimmung der beiden Kohorten ausgegangen werden konnte und der „Verdacht auf HIES“ bei unseren Patienten begründet war.

| klinisches Merkmal | Grimbacher et al. 2005 | eigenes Patientenkollektiv | |
|--|------------------------|---|----------------------------------|
| | | klinisch-gesicherte HIES Kohorte (n=49) | Verdacht auf HIES Kohorte (n=29) |
| Ekzem | 100% | 98% | 90% |
| erhöhtes Serum IgE (>10fach der altersspezifischen Norm) | 97% | 96% | 97% |
| Eosinophilie (> 2SD über der Norm) | 93% | 94% | 76% |
| Hautabszesse | 87% | 86% | 34% |
| vermehrte Pneumonien (≥3, durch x-ray bestätigt) | 87% | 96%* | 48%* |
| Pneumatoceken | 77% | 45% | 7% |
| mukokutane Candidiasis | 83% | 55% | 10% |
| charakteristisches Gesicht | 83% | 90% | 18% |
| breite Nase (> 2SD über der Norm) | 65% | 77% | 23% |
| Milchzahnpersistenz (>3 Zähne) | 72% | 79%* | 20%* |
| Hyperextensibilität | 68% | 60% | 21% |
| pathologische Frakturen | 57% | 59% | 3% |
| Skoliose (>10°) | 63% | 39% | 7% |

* die Angaben "durch x-ray bestätigt" bzw. ">3 Milchzähne" gelten für diese Kohorte nicht ausreichend

Tabelle 15: Verteilung von klinischen Merkmalen bei HIES-Patienten

4.2 Mutationsanalyse

2007 gelang Minegishi et al. die ätiologische Aufklärung des AD-HIES durch die Assoziation von Mutationen im Gen *STAT3* (Minegishi et al. 2007). In der Literatur gibt es acht Publikationen, die sich mit *STAT3*-Mutationen bei HIES-Patienten befassen (siehe Tabelle 16); parallel zu dieser Arbeit gibt es eine Studie, die eine vergleichbar große Kohorte untersuchte (Woellner et al. 2010). Das Gen *STAT3* – lokalisiert auf Chromosom 17 – setzt sich aus 24 Exons zusammen, die ein Protein kodieren, das aus sechs Hauptdomänen besteht: der N-terminalen-, coiled-coil-, DNA-bindungs- (DB), src homology 2- (SH2), linker- und Transaktivierungs- (TA) Domäne. Das Spektrum der bis heute identifizierten Mutationen erstreckt sich von der coiled-coil-Domäne (Woellner et al. 2010) bis zur TA-Domäne (de Beaucoudrey et al. 2008; Renner et al. 2008; Al Khatib et al. 2009). Die meisten Mutationen liegen jedoch in der DB- und SH2-Domäne liegen (Holland et al. 2007; Minegishi et al. 2007; Jiao et al. 2008; Ma et al. 2008; Milner et al. 2008) und bisher wurde nur eine Mutation in der linker-Domäne beschrieben (Kim et al. 2009). Zwei Punktmutationen (R382W/Q und V637M/L), die auch bei unseren Patienten gehäuft auftreten

(vergl. Tabelle 16), werden als Hotspot-Mutationen beschrieben (Holland et al. 2007; Minegishi et al. 2007).

Insgesamt konnten wir bei über der Hälfte der Patienten (62%, n=48/78) Mutationen in drei verschiedenen Bereichen (DB-, SH2- und TA-Domäne) des STAT3 Proteins identifizieren. Diese hohe Trefferquote kann möglicherweise durch die ursprüngliche Überweisung der Patienten an ein für primäre Immundefekte spezialisiertes Zentrum verzerrt sein, weist aber auch auf die Tatsache hin, dass bereits klinisch eine sehr gute Selektion dieser Patienten stattgefunden hat. Bei anderen Gruppen werden ähnlich hohe Mutationsraten beschrieben (Woellner et al. 2010). Eine Voraussage über die Beeinflussung der Proteinfunktion durch eine Mutation wurde anhand des Polymorphismus Phenotyping (PolyPhen) Algorithmus (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/>) geprüft und ergab für alle Mutationen dieser Kohorte eine signifikante Beeinträchtigung.

Bei allen bisher bekannten STAT3-Mutationen handelt es sich entweder um heterozygote Punktmutationen oder in-frame Deletionen, die in den meisten Fällen „de novo“ auftreten und autosomal-dominant vererbt werden (Holland et al. 2007; Minegishi et al. 2007; Ma et al. 2008; Milner et al. 2008; Kim et al. 2009; Woellner et al. 2010). Dieses galt auch für unsere Kohorte, in der 45 Patienten eine „de novo“ Mutation aufwiesen und zwei Familien mit STAT3-Mutation und autosomal-dominantem Erbgang vorhanden waren. Alle Mutationen erlauben die Expression eines veränderten STAT3 Proteins, das einen dominant-negativen Effekt auf die STAT3 Funktion ausübt. Dieser dominant-negative Effekt wurde von Minegishi et al. für Mutationen in der DB-Domäne (R382W, R382Q, T389I, H437Y und V463del) beschrieben, die eine verminderte DNA Bindungsaktivität aufweisen und in vitro in einer geringeren Aktivierung von STAT3 durch zytokininduzierte Stimuli (IL-6) resultieren (Minegishi et al. 2007). Auch wenn der dominant-negative Effekt in dieser Arbeit nicht direkt nachgewiesen wurde, unterstützen unsere Ergebnisse die Hypothese, dass Haploinsuffizienz, die durch den Verlust eines STAT3-Allels hervorgerufen wird, den vielfältigen HIES-Phänotyp nicht hinreichend erklärt. Untersuchungen an Stat3 knockout Mäusen zeigen außerdem, dass das vollständige Fehlen von Stat3 zu embryonaler Letalität führt und Mäuse mit haploidem Genotyp phänotypisch normal erscheinen (Takeda et al. 1997). Dadurch wird unsere These, dass STAT3-Mutationen eine qualitative Beeinträchtigung der STAT3 Funktion bewirken, unterstützt.

Ein wichtiger Schritt bei der Aktivierung von STAT3 ist die Phosphorylierung des Tyrosin705 und anschließende Dimerbildung, bei der die SH2 Domäne eine bedeutende Rolle spielt. Während Mutationen in der DB-Domäne eine intakte Tyrosin-Phosphorylierung nach Stimulation mit IL-6 zeigen (Holland et al. 2007; Minegishi et al. 2007; Renner et al. 2008; Al Khatib et al. 2009), fehlt diese bei Mutationen in der SH2-Domäne (V637M and S636F; Patienten ID# 70-76 und ID# 69) (Renner et al. 2008). Daraus ist zu erkennen, dass die in verschiedenen Bereichen des *STAT3* Gens liegenden Mutationen die Funktion des STAT3 Proteins in unterschiedlicher Weise beeinflussen.

Eine Korrelation zwischen Lokalisation der Mutation und klinischem Erscheinungsbild konnte bei unseren Patienten jedoch nicht beobachtet werden und wird auch bei anderen STAT3-HIES Patienten nicht beschrieben (Holland et al. 2007; Woellner et al. 2010). Vielmehr härtet sich der Verdacht, dass der molekulare Mechanismus, der für das Entstehen des komplexen HIES Phänotyps verantwortlich ist, einer gewissen Heterogenität unterliegt. Mögliche Erklärungen für die diversen Befunde bei HIES-Patienten lassen sich zum Teil bereits aus Untersuchungen an Mäusen erschließen, die zeigen, dass STAT3 unter anderem bei der Mediation pro- und antiinflammatorischer Reaktionen, der Wundheilung, Tumorgenese und Regulation der Knochenhomöostase beteiligt ist (Akira 2000; Levy and Lee 2002; Itoh et al. 2006).

| Domäne | Mutation in STAT3: | | | Publiziert von: | | | | | | | | | |
|----------|--------------------|---|-----------------------|------------------------|----------------------|---------------------|-------------------|-----------------|-----------------------------|------------------------|------------------|-----------------------|-------------------------------|
| | Exon | Nukleotid austausch | Aminosäuren austausch | Minegishi et al., 2007 | Holland et al., 2007 | Milner et al., 2008 | Jiao et al., 2008 | Ma et al., 2008 | deBeaucou drey et al., 2008 | Al Khatib et al., 2009 | Kim et al., 2009 | Woellner et al., 2010 | eigene Patienten ¹ |
| cc-D | 3 | c.172C>T | H58Y | | | | | | | | | 1 | |
| DNA | 10 | c.994C>T | H332Y | | | | 3 | | | | | | |
| | 10 | c.995A>T | H332L | | | | | | | | | | 1 |
| | 10 | c.1020_1023delGAC | K340,T341>N | | | | | | | | | | 1* |
| | 10 | c.1003C>T | R335W | | | | | | | | | | 2* |
| | 10 | c.1025G>A | G342D | | | | | | | | | 1 | |
| | 10 | c.1027G>C | V343L | | | | | | | | | | 1* |
| | 12 | c.1110-2a>g | D371_G380del | | | | | | | | | 2 | 1* |
| | 12 | 2.1110-1g>t | D371_G380del | | | | | | | | | 1 | |
| | 12 | c.1140+1g>t | D371_G380del | | | | | | | | | 1 | 2* |
| | 12 | c.1139+2insT | D371_G380del | | | | | | | | | 1 | |
| | 13 | c.1144C>T | R382W | 2 | 8 | 1 | 6 | | 4 | 1 | | 14 | 14* |
| | 13 | c.1145G>A | R382Q | 1 | 12 | 1 | | 2 | 1 | 1 | | 9 | 4* |
| | 13 | c.1145G>T | R382L | | 1 | 1 | | | | | | 2 | |
| | 13 | c.1150T>C | F384L | | | | | | | | | 2 | |
| | 13 | c.1151T>C | F384S | | 1 | | | | | | | | |
| | 13 | c.1152T>A | F384L | | 1 | | | | | | | | 1* |
| 13 | c.1175C>T | T389I | 1 | | | | | | | | 1 | | |
| 14 | c.1234A>C | T412S | | | | | | | 1 | | | | |
| 14 | c.1268G>A | R423Q | | 5 | 1 | | | | | | 1 | | |
| 14 | IVIS14 +1delG | Ex 14 del | | | | | | | | 1 | | | |
| 15 | c.1294G>A | V432M | | | | | 1 | | | | | | |
| 15 | c.1309C>T | H437Y | 1 | | | | | | | | | | |
| 15 | c.1310A>C | H437P | | | | | | 1 | | | | | |
| 16 | c.1387_1389delGTG | V463del | 3 | 3 | | 1 | | 6 | | | 1 | 1 | |
| 16 | c.1393T>G | S465A | | 1 | 1 | | | | | | | | |
| 16 | c.1396A>G | N466D | | | | | | | | | 1 | | |
| 16 | c.1397A>G/C | N466S/T | | | | | | | | | 2 | | |
| 16 | c.1398C>G | N466K | | | | | | | | | 1 | | |
| 16 | c.1406A>G | Q469R | | | | | | | | | | 1 | |
| 16 | c.1407G>T | Q469H | | | | | | | | | 1 | 1* | |
| 16 | c.1414A>G | N472D | | | | | | | 1 | | | | |
| linker-D | 17 | c.1591A>G | K531E | | | | | | | | 1 | | |
| SH2 | 20 | c.1771A>G | K591E | | | | | | | | | 1 | |
| | 20 | c.1832G>A | S611N | | 1 | | | | | | | | |
| | 20 | c.1850G>A | G617E | | | | | | | | | | 1 |
| | 20 | c.1858A>G | T620A | | | | | | | | | | 1* |
| | 20 | c.1861T>G | F621V | | 1 | 1 | | | | | | | |
| | 20 | c.1865C>T | T622I | | 2 | 2 | | | | | | 1 | |
| | 21 | c.1909G>A | V637M | | 8 | 1+2 | 2 | | | | | 10 | 7* |
| | 21 | c.1909G>T | V637L | | 1 | | | | | | | | |
| | 21 | c.1910T>C | V637A | | | | | | | | | 1 | |
| | 21 | c.1907C>T | S636F | | | | | | | | | | 1* |
| | 21 | c.1907C>A | S636Y | | | | | | | | | 1 | |
| | 21 | c.1913A>G | E638G | | | | | | | | | | 1* |
| | 21 | c.1915C>G | P639A | | 1 | | | | | | | | |
| | 21 | c.1915T>C | P639S | | | | | | | | | 1 | |
| | 21 | c.1924A>G | K624E | | | | | | 1 | | | | |
| | 21 | c.1930_1932del | Q644del | | 1 | | | | | | | | |
| 21 | c.1931A>C | Q644P | | | | | 1 | | | | | | |
| 21 | c.1939A>G | N647D | | 3 | | | | | | | | | |
| 21 | c.1954G>A | E652K | | 3 | | | | | | | | | |
| 21 | c.1970A>G | Y657C | | 2 | 2 | | | | 1 | | 1 | | |
| 21 | c.1979T>C | M660T | | | | | | | | | | 1 | |
| 21 | c.1994 T>A | I665N | | | | | | 1 | | | | | |
| 21 | c.2003C>T | S668F | | | | | | | 1 | | 1 | | |
| TADOMÄ | 21 | c.2068_2097del | E690-P699del | | | | | | | | | | 1* |
| | 22 | c.2114A>C | Y705C | | | | | | 1 | | | | 1 |
| | 22 | c.2124C>G | T708S | | | | | | | | | 1 | |
| | 22 | c.2125A>G | K709E | | | | | | 1 | | | | |
| | 22 | c.2129T>G | F710C | | | | | | | | | 1 | 1 |
| | 22 | c.2132T>C | I711T | | | | | | | | | | 1 |
| | 22 | c.2137G>C | V713L | | | | | | | | | | 1* |
| | 22 | c.2141C>G | T714A | | | | | | | | | 1 | |
| | 22 | c.2144+1G>A | p.? | | | | | | | | | 1 | |
| | del Ex 22+23 | c.2101+2332_oSTAT3 : c.2257+772del13933bp | Exon 22_23del | | | | | | | | | | |

Tabelle 16: Mutationen in STAT3 bei Patienten mit AD-HIES Phänotyp

Kursiv geschriebene Zahlen bei Milner et al. geben Patienten an, die bereits in der Arbeit von Holland et al. erfasst wurden. Die mit einem Stern markierten Zahlen zeigen Patienten dieser Arbeit, die in der Publikation von Renner et al. 2008 eingeschlossen waren. ¹(Schimke et al. 2010)

4.3 Korrelationsanalysen

4.3.1 Phänotyp-Genotyp Korrelation

Zur Klärung der Frage, wie sich Patienten mit STAT3-Mutation von Patienten mit ähnlichem Phänotyp ohne STAT3-Mutation genauer differenzieren lassen, erfolgte die Gegenüberstellung ausgewählter klinischer Merkmale von STAT3-wt und STAT3-mut Patienten dieser Studie. Fünf der unter 4.2 erwähnten Arbeiten stellen die klinischen Merkmale der Patienten mit Verdacht auf HIES, bei denen meistens STAT3-Mutationen identifiziert wurden, in ähnlicher Weise dar und werden mit den Ergebnissen dieser Arbeit verglichen (Tabelle 17).

Die Trias Ekzem, erhöhtes Serum-IgE und Eosinophilie, die zur klinischen Definition des HIES gehören, waren sowohl bei unseren STAT3-mut als auch bei den STAT3-wt Patienten mit ähnlich hoher Häufigkeit präsent (77-100%) und wurden vergleichbar häufig bei Patienten mit Verdacht auf HIES in der Literatur beschrieben (Minegishi et al. 2007; Jiao et al. 2008; Ma et al. 2008; Al Khatib et al. 2009; Woellner et al. 2010). Die hohe Prävalenz dieser Merkmale unter den STAT3-wt Patienten dieser Studie kann zum einen durch die Wahl der Einschlusskriterien erklärt werden, zum anderen wird dadurch bestätigt, dass diese Merkmale ein gemeinsames Kennzeichen von Patienten mit STAT3-HIES und phänotypisch ähnlichen Krankheitsbildern sind. Differentialdiagnostisch stehen bei unseren STAT3-wt Patienten andere HIES-Formen (AR-HIES) und die atopische Dermatitis im Vordergrund. Andere primäre Immundefekte, die mit Ekzem und erhöhtem Serum-IgE assoziiert sind, umfassen das Comel-Netherton-, Wiskott-Aldrich-, IPEX- oder Omenn-Syndrom (Notarangelo et al. 2009; Albert et al. 2010). Diese können jedoch aufgrund unterschiedlicher klinischer Präsentation deutlich vom HIES abgegrenzt werden und wurden bei den STAT3-wt Patienten dieser Studie ausgeschlossen.

Das bereits in den ersten Lebenswochen auftretende Ekzem (Neugeborenenekzem), das schon bei den Patienten von Davis et al. beschrieben wurde (Davis et al. 1966), war auch bei einem Großteil der STAT3-mut Patienten dieser Studie vorhanden (74%). Allerdings zeigten auch über ein Drittel unserer STAT3-wt Patienten (40%) schon kurz nach Geburt ein Ekzem, so dass dadurch keine klare Aussage über den STAT3 Genotyp möglich war. In einigen Studien werden sogar deutlich mehr STAT3-wt Patienten mit einem Neugeborenenekzem beschrieben, was unsere Vermutung dahingehend unterstützt, dass dieses Symptom andere Krankheitsbilder mit dem Leitsymptom Ekzem nicht eindeutig vom STAT3-HIES differenziert (Al Khatib et al. 2009; Woellner et al. 2010). Allerdings ist hierbei zu beachten, dass bei Al Khatib et al. die STAT3-wt Kohorte einige Patienten mit autosomal-rezessiver HIES Variante (acht Patienten) beinhaltet, bei denen ebenfalls ein frühes Auftreten des Ekzems beschrieben wird (Renner et al. 2004).

Auch über das Symptom rezidivierende Infektionen der oberen Atemwege (70% der STAT3-wt Patienten versus 89% der STAT3-mut Patienten) ist keine eindeutige Unterscheidung möglich, was aufgrund der Tatsache, dass bei allen Patienten primär der Verdacht auf einen Immundefekt vorlag,

der durch eine erhöhte Infektionsanfälligkeit charakterisiert wird (Stiehm et al. 2004), nicht verwunderlich erscheint. Allerdings muss dieses Merkmal in unserer Kohorte vorsichtig beurteilt werden, da die Angaben zum Teil auf der subjektiven Einschätzung der Patienten beruhen und Angaben zu Entzündungsparametern oder einer antibiotischen Therapie, die das Vorliegen einer Infektion bestätigten, oft nicht vorlagen. Die Infektionsrate bei STAT3-HIES Patienten in den anderen Arbeiten (4 Studien in Tabelle 14) fällt insgesamt etwas niedriger aus (MW 60,2%), wobei der Vergleich hier aufgrund fehlender Angaben über Häufigkeit und Art der Infektionen eingeschränkt ist. Woellner et al. beobachteten sogar bei ihren STAT3-mut Patienten weniger rezidivierende Infektionen als bei ihren STAT3-wt Patienten (59% und 64%), was zeigt das dieses Symptom ebenfalls nicht zur Differenzierung beider Kohorten geeignet ist (Woellner et al. 2010).

| Klinisches Merkmal | Minegishi et al. 2007 | Ma et al. 2008 | Jiao et al. 2008 | Al Khatib et al. 2009 | | Woellner et al. 2010 | | eigene Patienten* | |
|---------------------------------|-----------------------|----------------------|------------------------|-----------------------|------------------------|------------------------|------------------------|-----------------------|-----------------------|
| Patientenzahl (Genotyp) | 8 (STAT3-mut) | 5 (STAT3-mut) | 12 (STAT3-mut) | 6 (STAT3-mut) | 19 (STAT3-wt) | 64 (STAT3-mut) | 36 (STAT3-wt) | 48 (STAT3-mut) | 30 (STAT3-wt) |
| Mittleres Alter (Jahre) | 11,5 | 20,0 | 14,8 | 8,8 | 9,1 | 17,3 | 17,0 | 24,0 | 13,0 |
| [Altersspanne in Jahren] | [6-21] | [7-42] | [3-40] | [1,4-13,8] | [2,4-18,8] | [2-50] | [1-58] | [0,7-51] | [1-57] |
| Geschlecht [männlich:weiblich] | 4:4 | 3:2 | 6:6 | 2:4 | 9:10 | 38:26 | 23:13 | 31:17 | 19:11 |
| Ekzem | 100% (8/8) | k.A. | 100% (11/11) | 100% (6/6) | 100% (19/19) | 100% (64/64) | 97% (35/36) | 98% (47/48) | 90% (27/30) |
| erhöhtes Serum IgE | 100% (8/8) | 100% (5/5) | 91% (10/11) | 100% (6/6) | 95% (18/19) | 100% (64/64) | 100% (36/36) | 96% (46/48) | 97% (29/30) |
| Eosinophilie | 75% (6/8) | k.A. | k.A. | 83% (5/6) | 90% (17/19) | 72% (52/59) | 75% (27/36) | 93% (43/46) | 77% (23/30) |
| Neugeborenenekzem | 100% (8/8) | k.A. | 55% (6/11) | 67% (4/6) | 32% (6/19) | 65% (37/57) | 52% (15/29) | 74% (34/46) | 40% (12/30) |
| rezidivierende Infektionen | 63% (5/8) | 100% (5/5) | 45% (5/11) | k.A. | k.A. | 59% (35/59) | 64% (21/33) | 89% (42/47) | 70% (21/30) |
| Hautabszesse | 100% (8/8) | 100% (5/5) | 82% (9/11) | 83% (5/6) | 53% (10/19) | 92% (59/64) | 78% (28/36) | 85% (41/48) | 37% (11/30) |
| Organabszesse | k.A. | k.A. | k.A. | 1 Cerebralabszess | 1 Nierenabszess | k.A. | k.A. | 46% (22/48) | 0% (0/30) |
| schwere Infektionen | 13% (1/8) | 0% (0/5) | 9% (1/11) | 67% (4/6) | 63% (12/19) | 57% (34/60) | 38% (13/34) | 35% (16/46) | 0% (0/30) |
| Pneumonien | 88% (7/8) | 60% (3/5) | 100% (11/11) | 100% (6/6) | 84% (16/19) | 95% (61/64) | 67% (24/36) | 94% (45/48) | 53% (16/30) |
| Pneumantozelen | 63% (5/8) | 60% (3/5) | 27% (3/11) | 83% (5/6) | 11% (2/19) | 75% (47/63) | 41% (14/34) | 48% (23/48) | 3% (1/30) |
| Candidainfektionen | 63% (5/8) | 80% (4/5) | 64% (7/11) | 67% (4/6) | 74% (14/19) | 74% (43/58) | 55% (18/33) | 77% (37/48) | 27% (8/30) |
| Skoliose | 25% (2/8) | k.A. | 27% (3/11) | | | 26% (13/50) | 21% (7/33) | 42% (20/48) | 3% (1/30) |
| Frakturen ohne adäquates Trauma | 25% (2/8) | 60% (3/5) | 18% (2/11) | 67% (4/6) | 53% (10/19) | 46% (27/59) | 14% (5/35) | 60% (29/48) | 3% (1/30) |
| pathologischer Milchzahnwechsel | (60%) 3/5 | 100% (4/4) | 27% (3/11) | | | 82% (45/55) | 52% (16/31) | 79% (33/42) | 19% (3/16) |
| charakteristisches Gesicht | 100% (8/8) | 100% (5/5) | 100% (11/11) | 100% (6/6) | 68% (13/19) | 90% (58/64) | 69% (24/35) | 90% (43/48) | 17% (5/29) |
| Nasenbreite > 1SD | 100% (8/8) | k.A. | k.A. | k.A. | k.A. | 81% (42/52) | 58% (18/31) | 79% (34/43) | 22% (6/27) |
| hoher Gaumen | 25% (2/8) | k.A. | k.A. | 50% (3/6) | 63% (12/19) | 55% (29/53) | 39% (12/31) | 59% (27/46) | 22% (6/27) |
| atopische Merkmale außer Ekzem | k.A. | k.A. | 9% (1/11) | k.A. | k.A. | k.A. | k.A. | 57% (16/28) | 88% (23/26) |

Tabelle 17: Symptomverteilung in HIES-Patienten in fünf Studien im Vergleich zu Ergebnissen dieser Arbeit

Für jedes Symptom/Merkmal werden die Patienten, die dieses Symptom haben (Zähler an der Gesamtanzahl (Nenner) aller untersuchten Patienten einer Studie angegeben. Die relative Häufigkeit jedes Merkmals wird in Prozent angegeben. *(Schimke et al. 2010)

Die Symptome Abszesse an der Haut, Organabszesse, schwere Infektionen, Nagel/mukokutane Candidainfektionen und Pneumatozelenbildung nach Pneumonien zeigten dagegen deutliche Unterschiede in den Kohorten dieser Studie.

Hautabszesse wurden bei über 80% unserer STAT3-mut Patienten beschrieben, was vergleichbar mit den Angaben bei anderen STAT3-mut Patienten ist (82% bis 100%, vergl. Tabelle 17). Im Gegensatz dazu traten nur bei 11 unserer STAT3-wt Patienten (37%) Hautabszesse auf; ob es sich dabei um typische kalte Abszesse gehandelt hat, war in den meisten Fällen aufgrund fehlender Angaben nicht beurteilbar.

Eine ähnliche Verteilung ergab sich für die Candidainfektionen bei unseren Patienten, die fast dreimal so häufig bei STAT3-mut Patienten (77%) im Vergleich zu STAT3-wt Patienten (23%) vorkamen und auch in der Literatur in vergleichbarem Größenverhältnis bei STAT3-mut Patienten beobachtet wurden (63%-80%).

Das Entstehen von Abszessen in inneren Organen und schwere Infektionen sind laut unseren Untersuchungen sehr spezifisch für STAT3-HIES Patienten (46% und 35% der STAT3-mut Patienten versus 0% der STAT3-wt Patienten) und lassen somit deutlich eine Assoziation zum STAT3-HIES in unserer Patientenkohorte zu. Bei Al Khatib et al. und Woellner et al. werden bei den STAT3-wt Patienten ebenfalls schwere Infektionen und Organabszesse beschrieben, wobei acht der STAT3-wt Patienten bei Al Khatib et al. mit einem AR-HIES-like Phänotyp beschrieben werden und 13 STAT3-wt Patienten aus konsanguinen Familien kommen, so dass hier ein anderer monogenetischer Defekt als Ursache vermutet werden kann (Al Khatib et al. 2009; Woellner et al. 2010). Ob dieses auch für die STAT3-wt Patienten bei Woellner et al. zutrifft, kann aufgrund fehlender Angaben zu Art und Spektrum der schweren Infektionen nicht beurteilt werden.

Ein weiteres pathognomonisches Merkmal für HIES-Patienten ist die Entstehung von Pneumatozelen nach Pneumonien (Merten et al. 1979; Grimbacher et al. 2005), die bei fast der Hälfte der STAT3-mut Patienten (48%) dieser Arbeit nachgewiesen werden konnten und zum Teil sogar noch häufiger unter anderen STAT3-mut Patienten beobachtet wurden (bis zu 83% vergl. Tabelle 17). Die hohe Spezifität wird dadurch bekräftigt, dass nur bei einem STAT3-wt Patienten dieser Arbeit eine Pneumatozele im Kindesalter berichtet wurde, für die heute kein Äquivalent mehr nachgewiesen werden konnte. Auch bei Al Khatib et al. werden nur zwei Patienten ohne STAT3-Mutation mit Pneumatozele beschrieben was die Spezifität dieses Symptoms für ein STAT3-HIES unterstützt (Al Khatib et al. 2009). Die relativ hohe Anzahl von STAT3-wt Patienten mit Pneumatozele bei Woellner et al. lassen vermuten, dass diese Patienten möglicherweise eine andere HIES-Form mit monogenetischem Defekt haben (Woellner et al. 2010). Die relativ breite Streuung dieses Merkmals unter den STAT3-HIES Patienten in den verschiedenen Studien (27% bis 83%) zeigt jedoch auch, dass bei Fehlen einer Pneumatozele ein STAT3-HIES nicht automatisch ausgeschlossen werden kann.

Pneumonien selbst sind trotz der hohen Prävalenz unter STAT3-mut Patienten (94% bei Patienten dieser Studie und 60% bis 100% bei Patienten der anderen Arbeitsgruppen) weniger zur Differenzierung von ähnlichen Krankheitsbildern geeignet, da sie sowohl in unserer Kohorte (53%), als auch bei Al Khatib et al. (84%) und Woellner et al. (67%) ebenfalls bei einer großen Anzahl STAT3-wt Patienten vorkommen.

Allergische Manifestationen wie Rhinokonjunktivitis, allergisches Asthma, oder Nahrungsmittelallergien waren in unserem Patientenkollektiv häufiger bei STAT3-wt Patienten (88%) im Vergleich zu STAT3-mut Patienten (57%) vorhanden. Das heißt, dass STAT3-HIES Patienten zwar regelmäßig hohe Serum-IgE-Werte und Ekzem aufweisen, meistens aber klinisch keine Allergien zeigen, und sich dadurch deutlich von Patienten aus dem atopischen Formenkreis abgrenzen lassen.

Eine mögliche Ursache für die rezidivierenden Abszesse bei STAT3-HIES Patienten, die vor allem durch extrazelluläre Bakterien wie *Staphylokokkus aureus* verursacht werden, ist ein Defekt in der T_H17-Zelldifferenzierung, der durch STAT3-Mutationen hervorgerufen wird (Minegishi et al. 2007; Louten et al. 2009). Holland et al. beschreiben außerdem eine verminderte Defensinproduktion in Haut und Lunge bei STAT3-mut Patienten, was die Prädispositionsstellen der Abszesse in diesen Organen erklären könnte (Holland et al. 2007). Die hohe Korrelation von Abszessen in inneren Organen sowie die häufig vorhandenen systemischen Infektionen bei STAT3-mut Patienten weisen zudem auf einen generalisierten Abwehrdefekt hin, der bei unseren STAT3-wt Patienten nicht beobachtet wurde. Wahrscheinlicher ist, dass unsere STAT3-wt Patienten abszessähnliche Entzündungen an der Haut hatten, die durch Superinfektionen mit *Staphylokokkus aureus* auftreten und häufig bei Patienten mit atopischer Dermatitis beobachtet werden (Bieber 2008). Die erhöhte Infektionsanfälligkeit gegenüber *Candida albicans* bei STAT3-HIES Patienten wird ebenfalls durch die gestörte T_H17-Zellproduktion erklärt (Huang et al. 2004; Milner et al. 2008). Vor allem die hohe Rate an Nagel- und mukokutanen Candidainfektionen (50% unsere STAT3-mut Patienten) spricht dafür, dass die Patienten mit STAT3-Mutation einen generalisierten Defekt bei der Abwehr von Pilzen haben und es sich bei diesen Patienten weniger um Superinfektionen oder Antibiotikanebenwirkungen handelt. Eine mögliche Erklärung für den Zusammenhang von STAT3-Mutationen und der Zystenbildung nach Pneumonien bei STAT3-HIES Patienten sehen Holland et al. darin, dass in STAT3-defektem, pulmonalem Gewebe bei Mäusen nach Hyperoxie-Exposition eine verstärkte Entzündungsreaktion und Luftraumvergrößerung beobachtet werden konnte und STAT3 im Lungengewebe eine wichtige Rolle bei der Immunantwort auf Lipopolysaccharide von Bakterienmembranen spielt (Hokuto et al. 2004; Holland et al. 2007).

Zu den nicht-infektiologischen Merkmalen, die STAT3-mut Patienten von STAT3-wt Patienten gut unterscheiden, gehören Skoliose, Frakturen ohne adäquates Trauma, charakteristische Gesichtszüge und Milchzahnpersistenz.

Vor allem die Skoliose zeigte in unserer Arbeit eine deutliche Assoziation zum STAT3-HIES (42%). In den meisten Fällen entstand die Skoliose ähnlich wie die idiopathische Skoliose und trat nur bei einem Patient als Folge einer Lungenteilresektion auf. Dies bestätigt den Verdacht, dass eine intrinsische Prädisposition für die Entwicklung einer Skoliose bei STAT3-HIES Patienten vorliegt (Grimbacher et al. 1999a). Nur ein Patient (3%) aus der STAT3-wt Kohorte dieser Arbeit hatte eine Skoliose, was der Prävalenz einer Normalbevölkerung (ca. 3%) entspricht (Wise et al. 2008). Eine vergleichsweise hohe Prävalenz von Skoliosen unter STAT3-mut Patienten der oben dargestellten Arbeiten (25% bis 63%) unterstützt unsere These, dass dieses Symptom primär durch eine Bindegewebsschwäche aufgrund einer STAT3-Mutation entsteht und nicht Folge einer Lungenteilresektion ist, wobei im Einzelfall eine mögliche Akkumulation dieser Befunde nicht ausgeschlossen werden kann.

Noch besser scheinen Frakturen ohne adäquates Trauma, die sowohl in dieser Arbeit sowie in der Literatur bei bis zu 60% der STAT3-mut Patienten vorkamen, zwischen den beiden Kohorten zu differenzieren. Nur bei einer Patientin ohne STAT3-Mutation wurde im Alter von drei Jahren eine Femurfraktur mit nicht klar zu definierendem Trauma angegeben.

Ein weiteres sehr charakteristisches Merkmal der STAT3-HIES Patienten sind die groben Gesichtszüge, die durch Asymmetrie, betonter Stirnpartie, milder Prognathie, Hypertelorismus und verbreitertem Nasenflügelabstand, sowie narbiger, grobporiger Haut beschrieben werden (Borges et al. 1998; Grimbacher et al. 1999a; Renner et al. 2002). Diese phänotypische Gemeinsamkeit wurde auch in dieser Arbeit bei den STAT3-HIES Patienten beobachtet, die zu 90% ein charakteristisches Gesicht in unterschiedlicher Ausprägung zeigten und bei denen meistens mehrere der beschriebenen Merkmale vorhanden waren. Ähnlich häufig wurde dieses Merkmal bei den STAT3-mut Patienten der anderen Arbeitsgruppen beschrieben (83 bis 100%). Allerdings zeigten auch relativ viele der STAT3-wt Patienten bei Al Khatib et al. (68%) und Woellner et al. (69%) ein charakteristisches Gesicht, einen verbreiterten Nasenflügelabstand oder einen hohen Gaumen (Al Khatib et al. 2009; Woellner et al. 2010), während diese drei Merkmale nur bei sechs unserer STAT3-wt Patienten (22%) vereinzelt vorkamen. Diese Diskrepanz kann durch eine gewisse Subjektivität der Beurteilung dieser Merkmale zustande kommen, schließt allerdings erneut die Möglichkeit nicht aus, dass einige STAT3-wt Patienten eine andere monogenetische Form des HIES haben.

Die bei Grimbacher et al. erstmals beschriebene Milchzahnpersistenz bei 72% der klinischen HIES-Patienten (Grimbacher et al. 1999a) trat vergleichsweise häufig bei den STAT3-mut Patienten unserer Studie auf (79%), wodurch eine starke Phänotyp-Genotyp Korrelation bestätigt werden konnte. Bei drei Patienten aus der STAT3-wt Kohorte wurde ebenfalls ein pathologischer

Milchzahnwechsel in Form von gezogenen Milchzähnen und Doppelreihenbildung gefunden. Ein Patient (ID# 39) zeigte wenig andere HIES-Symptome, so dass hier von einer Normvariante ausgegangen wird. Die beiden anderen Patienten (ID# 11 und ID# 32) hatten vereinzelt weitere HIES-Symptome (Skoliose, Hyperextensibilität, Pneumonie, einer die Pneumatozele im Kindesalter). Einer von ihnen (ID# 11) zeigte heute wenig infektiologische Symptome, so dass eine andere HIES-Form bei diesem Patienten unwahrscheinlich ist. Bei dem Zweiten (ID# 32) ist ein syndromales Krankheitsbild mit Immundefekt nicht sicher auszuschließen.

Aus der Literatur ist bekannt, dass Stat3 *in vitro*, über die IL-6 Zytokin-Signalkaskade aktiviert, eine wichtige Rolle bei der Differenzierung von Osteoklasten und Osteoblasten spielt (O'Brien et al. 1999). Mäuse mit Osteoblasten-spezifischem Stat3 knockout zeigen zudem einen osteoporotischen Phänotyp, der auf dem Boden einer verminderten Osteoblastenaktivität und dadurch verminderter Knochenbildungsrate begründet ist (Itoh et al. 2006). Diese Erkenntnis liefert eine mögliche Erklärung für die gehäuften Knochenbrüche, die bei STAT3-HIES Patienten assoziiert sind. Vereinbar mit dieser These sind zudem die Untersuchungen von Minegishi et al., die *in vitro* nach Aktivierung von Osteoklasten bei STAT3-HIES Patienten eine erhöhte Knochenresorption nachweisen konnten und darin eine mögliche Erklärung für die Entstehung der Skelett- und Bindegewebsymptome bei STAT3-HIES Patienten sehen (Minegishi et al. 2007). Die genauen Mechanismen, die der Entstehung der Skelett- und Bindegewebsymptome zugrunde liegen, sind jedoch noch unklar. Die Aufklärung der Genese dieser Symptome ermöglicht nicht nur die Entwicklung von neuen Therapieoptionen, sondern kann auch zu wichtigen Erkenntnissen über die Entstehung häufiger Erkrankungen wie der Osteoporose und der idiopathischen Skoliose beitragen.

Bei den meisten unserer STAT3-wt Patienten waren geringere Infektionsraten und keine schweren Infektionen vorhanden, weswegen das Vorliegen eines generalisierten Abwehrdefekts respektive eines primären Immundefektes aufgrund einer monogenetischen Genveränderung unwahrscheinlich ist. Diese Patienten erfüllen vielmehr die Kriterien einer atopischen Dermatitis multifaktorieller Genese. Jedoch können die Patienten ohne STAT3 Mutation, die zusätzlich durch Symptome wie atypische Mykobakteriose, rezidivierende virale Infektionen, zerebrale Hämorrhagien oder Gefäßanomalien auffallen, auch eine rezessive Variante des HIES mit Mutationen in DOCK8 oder TYK2 haben. Patienten mit DOCK8- oder TYK2-Mutation werden durch Ekzem, erhöhtes Serum-IgE und einen kombinierten zellulären Immundefekt, der sich zum Teil durch schwere sinopulmonale Infektionen und viralen Infektionen der Haut, aber ohne Skelett- und Bindegewebsanomalien äußert, beschrieben (Minegishi et al. 2006; Zhang et al. 2009). Zusätzlich weisen DOCK8-HIES Patienten einen milden T-Zelldefekt, ein erhöhtes Risiko für Malignome und vaskuläre Komplikationen wie ZNS Vaskulitiden, Hämorrhagien und Hirninfarkte, auf (Renner et al. 2004; Engelhardt et al. 2009). Tatsächlich konnte bei zwei unserer STAT3-wt

Patienten, darunter die bereits klinisch als AR-HIES eingestufte Patientin, eine homozygote Mutation in DOCK8 nachgewiesen werden (ID# 1 und ID# 20) (Engelhardt et al. 2009; Langenbeck 2010). Sieben weitere Patienten ohne STAT3 Mutation (ID#: 8, 21, 23, 32, 36, 40, 44) zeigten entweder oben beschriebene spezifische STAT3-HIES Symptome, rezidivierende virale Infektionen oder einen milden T-Zelldefekt, was ungewöhnlich für eine atopische Dermatitis ist. Bei diesen Patienten könnte eine DOCK8-Defizienz oder möglicherweise ein Gendefekt in ähnlichen Signalwegen vorliegen, was weiter untersucht werden sollte. Auch bei den STAT3-wt Patienten mit schweren Infektionen, Haut- und Organabszessen, oder Pneumatozelen bei Al Khatib et al. und Woellner et al. kann ein Gendefekt in DOCK8 oder STAT3-ähnlichen Signalwegen vermutet werden; genaue Angaben dazu waren zum derzeitigen Zeitpunkt jedoch nicht vorhanden (Al Khatib et al. 2009; Woellner et al. 2010).

Keiner unserer STAT3-wt Patienten zeigte Infektionen mit atypischen Mykobakterien oder Salmonellen, die bei dem einzigen Patienten mit TYK2-Mutation beschrieben wurden (Minegishi et al. 2006).

Zusammenfassend bestätigen unsere Ergebnisse die klinische Definition des autosomal-dominanten HIES als Multisystemerkrankung - wie bereits 1999 von Grimbacher et al. beschrieben - durch den Nachweis von STAT3-Mutationen bei über 90% der Patienten mit klinisch-gesichertem HIES (Grimbacher et al. 1999a). Die Ausprägung des Ekzems, Höhe der Serum-IgE-Werte oder die Eosinophilie spielen für die klinische Einschätzung jedoch eine geringere Rolle. Vielmehr sind zusätzliche Symptome wie Abszesse an Haut und inneren Organen, Pneumonien mit Pneumatozelenbildung, Nagel/mukokutane Candidiasis, Skoliose, Frakturen ohne adäquates Trauma, charakteristische Gesichtszüge und Milchzahnpersistenz, die in der Ausprägung allerdings auch unter STAT3-HIES Patienten durch Umwelteinflüsse, Therapie und Compliance der Patienten stark variieren können, für die Diagnose entscheidend. Auch wenn es bereits gelungen ist, das AD-HIES ätiologisch einzuordnen, gilt es, die Pathomechanismen, die hinter den einzelnen Symptomen stecken noch weiter zu erforschen, sowie die Entstehung von Erkrankungen mit Defekten in ähnlichen Signalwegen weiter aufzuklären.

4.3.2 Korrelation von Genotyp und NIH-Score Punkten

Für die Beurteilung des klinischen Phänotyps wurde in dieser Studie, sowie bei einigen der oben bereits aufgeführten Arbeiten, der NIH-Score verwendet. Die Ergebnisse unsere Studie zeigten eine vergleichbar hohe Korrelation von NIH-Score-Punkten und STAT3-Genotyp (88%), was auch bei anderen Arbeitsgruppen beschrieben wurde (siehe Tabelle 15).

| | Minegishi et al., 2007 | Ma et al., 2008 | Al Khatib et al., 2009 | | Woellner et al., 2010 | | eigene Patienten | |
|----------------------------|------------------------|-----------------|------------------------|---------------|-----------------------|---------------|------------------|---------------|
| Patientenanzahl (Genotyp) | 8 (STAT3-mut) | 5 (STAT3-mut) | 6 (STAT3-mut) | 19 (STAT3-wt) | 64 (STAT3-mut) | 36 (STAT3-wt) | 48 (STAT3-mut) | 30 (STAT3-wt) |
| NIH-Score \geq 40 Punkte | 8 (41-68) | 4 (50-71) | 5 (47-78) | 15 (40-66) | 59 (41-83) | 20 (40-72) | 46 (40-89) | 3 (43-52) |
| NIH-Score < 40 Punkte | 0 | 1 (26) | 1 (37) | 4 (28-36) | 5 (29-37) | 16 (19-39) | 2 (34-37) | 27 (12-39) |

Tabelle 18: NIH-Score-Punkte von STAT3-mut und STAT3-wt Patienten

Die Zahlen in jeder Spalte repräsentieren die Patientenanzahl der jeweiligen Studie, die die entsprechende NIH-Score-Punkte erreichten. Hinter jeder Patientenanzahl ist die Spanne der NIH-Score-Punkte bzw. die Score-Punkte eines einzelnen Patienten in Klammern angegeben.

In unserer Studie erreichten der acht Monate alte Säugling (ID# 53) und der 19-jährige Patient mit mildem Phänotyp (ID# 26) mit STAT3-Mutation die 40 Punkte nicht. Zwei Patienten mit STAT3 Mutation aus der Publikation von Woellner et al. waren unter 10 Jahren und drei weitere (14-21 Jahre) hatten ähnlich wie unser 19-jähriger Patient einen milderen Phänotyp (keine Pneumatozelen, wenig rezidivierende Infektionen, keine Skoliose oder pathologische Frakturen) (Woellner et al. 2010). Die STAT3-mut Patienten bei Ma et al., die einen Score von 26 Punkten erreichte, war ebenfalls erst 7 Jahre alt (Ma et al. 2008). Dies bestätigt die Annahme, dass Patienten aufgrund wenig vorhandener Symptome niedrige NIH-Score Punkten haben können und mit dem klinischen Score nicht erkannt werden. Besonders junge Patienten unter 10 Jahren sind davon betroffen.

Drei STAT3-wt Patienten unserer Studie hatten ebenfalls einen NIH-Score über 40 Punkten. Bei zwei dieser Patienten konnte eine Mutation in DOCK8 nachgewiesen werden, demnach handelt es sich bei diesen um die AR-HIES-Form. Die andere Patientin gehört zu der Kohorte von STAT3-wt Patienten, bei denen möglicherweise eine weitere HIES-Variante mit monogenetischer Ursache vorliegt, was weiter analysiert werden sollte. Die Patienten, die bei Al Khatib et al. bereits klinisch als AR-HIES eingestuft wurden, hatten ebenfalls hohe NIH-Score-Punkte, und auch bei Woellner et al. wurden viele STAT3-wt Patienten mit hohen NIH-Score-Punkten beschrieben (Al Khatib et al. 2009; Woellner et al. 2010). Wenn auch bei den Patienten bei Woellner et al eine rezessive HIES Variante mit DOCK8-Mutation unwahrscheinlich ist, könnte bei diesen Patienten ein HIES bisher unbekannter genetischer Ursache vorhanden sein. Demnach ist es nicht negativ zu bewerten, wenn diese Patienten ebenfalls anhand des NIH-Scores als positiv erkannt werden.

Generell wird die in der Weltliteratur beschriebene hohe Korrelationsrate zwischen einem NIH-Score \geq 40 Punkten und einem STAT3-assoziierten HIES in dieser Arbeit bestätigt. Es ist

allerdings auch zu beachten, dass der Verdacht auf ein HIES bei Patienten zwischen 20-40 Punkten vorsichtig abgewogen werden muss und der NIH-Score primär nur eine Hilfe zur klinischen Einschätzung bietet.

4.3.3 Korrelation von Genotyp und T_H17-Zellzahlen

Die T_H17-Zellen sind beim HIES von Interesse, da sie eine wichtige Funktion bei der Abwehr von extrazellulären Bakterien und Pilzen spielen, und die Differenzierung von naiven T-Zellen zu IL-17 produzierenden Helferzellen durch STAT3 Signalwege gesteuert wird (Bettelli et al. 2007; Mathur et al. 2007; McGeachy and Cua 2008). Die Vermutung, dass die T_H17-Zelldifferenzierung bei HIES-Patienten mit einem mutiertem STAT3-Allel beeinträchtigt ist, konnten wir durch den Nachweis von signifikant niedrigeren T_H17-Zellzahlen bei STAT3-mut Patienten im Vergleich zu STAT3-wt Patienten und gesunden Kontrollen belegen.

Studien an kleineren HIES Kohorten zeigten ebenfalls niedrige T_H17-Zellzahlen bei STAT3-HIES Patienten, wobei die Grenze zwischen normalen und pathologischen T_H17-Zellzahlen in den einzelnen Studien variierte, jedoch immer ein signifikanter Unterschied im Vergleich zur jeweiligen gesunden Kontrollgruppe sowie HIES-like Patienten oder Patienten mit anderen Immundefekten gezeigt werden konnte (de Beaucoudrey et al. 2008; Ma et al. 2008; Milner et al. 2008). Leichte individuelle Abweichungen in der Absolutzahl der T_H17-Zellen können zum einen durch die Methode selbst (Durchflusszytometrie/FACS) bedingt sein, die bisher nur laborintern standardisiert ist und auch nur den in vitro-Status der IL-17-Antwort auf verschiedene Stimuli darstellt, und es sich um prozentual kleine Anteile an CD4⁺-T-Zellen handelt. Zum anderen spiegelt es aber auch eine gewisse genetische Heterogenität unter den STAT3-HIES Patienten wieder, die wahrscheinlich durch eine individuelle Beeinflussung der STAT3-Signalwege bedingt ist (de Beaucoudrey et al. 2008). Dies stellt möglicherweise auch eine Erklärung für die im unteren Normbereich liegenden T_H17-Zellen bei drei STAT3-mut Patienten dieser Studie dar. Zudem wird bei Neugeborenen und Säuglingen von einer verminderten Immunantwort durch T_H17-Zellen ausgegangen, die sich erst im Laufe der ersten zwei Lebensjahre normalisiert, so dass Patienten in diesem Alter deutlich niedrigere T_H17-Zellzahlen im Vergleich zu erwachsenen Patienten aufweisen, und eine Aussage über den STAT3-Status in diesem Alter anhand der T_H17-Zellzahlen nicht verlässlich ist (Schaub et al. 2008; Islander et al. 2010). Diese Beobachtung stellt möglicherweise auch eine Erklärung für die niedrigen T_H17-Zellzahlen (0,11%) eines zum Zeitpunkt der Untersuchung 19-monate alten Jungen aus der STAT3-wt Kohorte dieser Arbeit dar, bei dem ein HIES klinisch eher unwahrscheinlich ist.

In der Literatur werden auch bei AR-HIES Patienten mit DOCK8-Mutation niedrige T_H17-Zellzahlen beschrieben; über die genaue Funktion von DOCK8 bei der Differenzierung von T_H17-Zellen ist jedoch noch wenig bekannt (Engelhardt et al. 2009; Zhang et al. 2009). Unsere AR-HIES

Patientin mit DOCK8-Mutation zeigte ähnlich wie STAT3-HIES Patienten niedrige T_H17-Zellen (0,11%). Der andere Patient, bei dem eine DOCK8-Mutation nachgewiesen wurde, hatte jedoch in mehreren Messungen normale bis hohe T_H17-Zellzahlen, was eine größere Variabilität der T_H17-Zellzahlen bei DOCK8-HIES Patienten vermuten lässt. Weitere Untersuchungen sind nötig, um eine sichere Einschätzung dieses immunologischen Parameters bei DOCK8-HIES Patienten treffen zu können und die Rolle von DOCK8 bei der T_H17-Zelldifferenzierung weiter aufzuklären.

Eine andere Erkrankung, die mit ähnlich stark verminderten T_H17-Zellzahlen assoziiert wird, ist die chronische-mukokutane-Candidiasis (CMC) (Eyerich et al. 2008). Die von dieser Krankheit betroffenen Patienten zeigen neben rezidivierenden und persistierenden Infektionen mit *Candida* Spezies jedoch keine weiteren HIES-Symptome und können durch den deutlich unterschiedlichen klinischen Phänotyp von Patienten mit STAT3-HIES differenziert werden (Puel et al. 2010).

Patienten mit atopischer Dermatitis ohne rezidivierende pulmonale Infektionen oder Zeichen für ein HIES haben normale bis erhöhte T_H17-Zellzahlen, die zum Teil mit der Schwere des Ekzems korrelieren (Guttman-Yassky et al. 2008; Koga et al. 2008). Bei unseren STAT3-wt Patienten die klinisch wenig zusätzliche HIES-Symptome zeigten waren die T_H17-Zellzahlen zwar nicht erhöht, lagen aber im Mittel im Normbereich, so dass wir am ehesten von der Diagnose atopische Dermatitis ausgehen. Ob die T_H17-Zellen mit der Schwere des Ekzems korrelieren wurde in dieser Studie nicht untersucht.

Einige Patienten, die jedoch klinisch Hinweise für eine Form der HIES haben (z.B. rezidivierende virale Infektionen, einen T-Zelldefekt, vermehrte Abszesse und Infektionen mit den Pathogenen wie *Staphylokokkus aureus* und *Candida albicans*) und niedrige oder im unteren Normbereich liegende T_H17-Zellen aufweisen, sollten weiter auf Defekte in IL-6/STAT3-Signalwegen untersucht werden. Dies trifft in unserer Kohorte für die unter 4.3.1 erwähnten sieben Patienten zu, die T_H17-Zellzahlen zwischen 0,2% und 1,93% aufweisen und bei denen ein Immundefekt nicht sicher ausgeschlossen werden konnte. Dieser Verdacht wird durch Untersuchungen von HIES-Patienten mit milderem Phänotyp und fehlender signifikanter Mutation in STAT3 unterstützt, die im Vergleich zu klassischen STAT3-HIES Patienten eine weniger beeinträchtigte IL-17-Immunantwort zeigen und bei denen die Ursache dafür an anderer Stelle des STAT3-Signalwegs vermutet wird (van de Veerdonk et al. 2010).

Auch wenn die Bedeutung der TH17-Zellen in Bezug auf den infektiologischen Phänotyp innerhalb der STAT3-HIES Patienten noch genauer analysiert und die Regulation der STAT3 abhängigen T_H17-Zelldifferenzierung weiter aufgeklärt werden muss, liefern die Ergebnisse dieser Arbeit deutliche Hinweise darauf, dass STAT3-HIES Patienten insbesondere von Patienten mit atopischer Dermatitis über diese T-Helferzellpopulation deutlich unterschieden werden können.

4.4 Vereinfachtes Diagnoseschema zum Hyper-IgE-Syndrom

4.4.1 Der 5-Punkt-Score

Die Möglichkeit, das HIES molekulargenetisch zu sichern, veranlasste uns die bestmöglichen klinischen Kriterien zu suchen, die eine Abgrenzung von ähnlichen Erkrankungen ermöglichen und HIES-Patienten für die Sequenzierung von STAT3 herausfiltern. Bisher gab es für die klinische Beurteilung des HIES den NIH-Score, der – wie auch in dieser Arbeit bestätigt wurde (vergl. 4.3.2) – eine recht gute Charakterisierung der STAT3-HIES Patienten ermöglicht. In Anbetracht dieser relativ komplexen Datenerhebung erfolgten Überlegungen zur Vereinfachung dieses Scores, woraus ein ähnlicher diagnostischer Algorithmus, der 5-Punkt-Score, resultierte. Die wichtigste Erkenntnis der molekulargenetischen Untersuchung von 78 Patienten mit dem Angangsverdacht auf ein HIES war, dass die Trias Ekzem, stark erhöhte Serum-IgE-Werte (über das 10fache der Normwerte) und Eosinophilie zwar häufig den Erstverdacht auf ein HIES bedingen (Leung and Geha 1988), aber keine Aussage über den STAT3-Genotyp ermöglichen. Schon vor der molekulargenetischen Aufklärung des HIES war bekannt, dass die Höhe des IgE nicht mit der Ausprägung des klinischen Phänotyps korreliert und bei einigen HIES-Patienten die Serum-IgE-Werte im Alter sogar wieder in den Normbereich fallen können (Grimbacher_1999a). Auch das Ekzem und die Eosinophilie sind zwar wichtige Erkennungsmerkmale der HIES-Patienten, ermöglichen aber lediglich eine Selektion von potentiellen HIES-Patienten aus einer gesunden Allgemeinbevölkerung. Allerdings zeigten unsere sowie auch die STAT3-HIES Patienten bei Holland et al. und Woellner et al. nicht immer alle drei Kriterien und die Kombination der drei Symptome variierte stark (vergl. Kap. 3.1, Tabelle 5 und Tabelle 6), so dass bereits das Vorhandensein eines dieser Merkmale für eine weitere Beurteilung gerechtfertigt erscheint (Holland et al. 2007; Woellner et al. 2010).

Die genauere Charakterisierung des HIES erfolgte über die Beurteilung von 16 Nebenkriterien (vergl. Tabelle 10 Kap. 3.4.1), die basierend auf den Daten unserer Patientenkohorte in unterschiedlicher Stärke gewichtet wurden. Zu den besonders spezifischen Symptomen gehören laut unseren Daten **Organabszesse, schwere Infektionen, Pneumatozelen, Frakturen ohne adäquates Trauma, Skoliose und Nagel/mukokutane Candidiasis**, die folglich mit einer höheren Gewichtung zur Gesamtsumme beitragen.

Da der vereinfachte Score eine zuverlässige Einschätzung in allen Altersstufen ermöglichen sollte, wurden auch die weniger spezifischen Merkmale, die aber vor allem bereits bei Säuglingen und Kleinkindern auftreten können (z.B. Neugeborenenekzem, orale Candidiasis, erhöhte Infektionsanfälligkeit oder Hyperextensibilität der Gelenke) mit in die Beurteilung aufgenommen. Die Bewertung der HIES-Familienanamnese, sowie eine zusätzliche Einschätzung über die T_H17-Zellzahlen, scheinen aufgrund des bereits 1999 postulierten Vererbungsmodus und der signifikant beeinträchtigten T_H17-Zelldifferenzierung bei STAT3-HIES Patienten zusätzlich sinnvoll zu sein,

und fließen in ähnlicher Form auch in anderen Studien bei der Beurteilung der HIES-Patienten ein (Milner et al. 2008; van de Veerdonk et al. 2010; Woellner et al. 2010). Die Arbeitsgruppe von Woellner et al. beschreiben ebenfalls einen diagnostischen Leitfaden für das STAT3-HIES, der eine zu unserem Score vergleichbare, wenn auch geringere Auswahl von klinischen Symptomen umfasst, die eine Aussage über das Vorliegen eines STAT3-HIES ermöglichen sollen (Pneumonien, Neugeborenenekzem, Frakturen ohne adäquates Trauma, charakteristisches Gesicht und hoher Gaumen) (Woellner et al. 2010).

Mit der Beurteilung der 16 Nebenkriterien und der Grenze von 5 Punkten für die Entscheidung STAT3-HIES/kein STAT3-HIES konnte in dieser Kohorte ein zuverlässiges Ergebnis in nahezu allen Altersstufen erreicht werden. Natürlich gab es, wie bei allen klinischen Scores, einige Ausnahmen und Patienten, die mit dem 5-Punkt Score nicht richtig kategorisiert wurden. Zu diesen Ausreißern gehörte unter den STAT3-mut Patienten, der bereits aufgrund seines milden Phänotyps erwähnte 19-jährige Junge. Bei den STAT3-wt Patienten wurden 5 Patienten in die Kategorie „HIES sehr wahrscheinlich“ eingestuft. Bei einem dieser Patienten vermuten wir am ehesten eine atopische Dermatitis, da die Symptome, die den Verdacht auf HIES begründeten (8 Punkte im 5-Punkt-Score) heute nicht mehr bestanden und bei ihm erhöhte T_H17-Zellen (0,92 %) vorlagen. Die anderen vier Patienten hatten entweder ein AR-HIES mit DOCK8-Mutation oder gehörten zu der Gruppe, bei denen möglicherweise ein monogenetischer Immundefekt mit allergischer Komponente zugrunde liegen kann (vergl. oben). Auch wenn bei diesen Patienten wahrscheinlich kein STAT3-HIES vorliegt, ist die falsch-positive Einteilung zunächst nicht negativ zu bewerten, da hier möglicherweise andere monogenetische Erkrankungen oder HIES-Varianten vorliegen können.

Für Rückschlüsse auf die Allgemeingültigkeit des vereinfachten 5-Punkt-Scores unter HIES-Patienten mit und ohne STAT3-Mutation wäre eine Auswertung in einer vergleichbaren Kohorte, die nicht als Grundlage für die Erhebung des Algorithmus diene, interessant. Außerdem wäre eine Erhebung des Scores in einer allgemeinpädiatrischen Ambulanz im Vergleich zu einer Ambulanz mit Schwerpunkt Allergologie/Dermatologie und einer Immundefektambulanz für eine objektive Beurteilung der Aussagekraft nötig.

Des Weiteren gibt es einige Symptome, die nicht im 5-Punkt-Score aufgelistet sind, aber dennoch an ein HIES denken lassen.

Dazu gehören Malignome und vor allem Hodgkin- und Non-Hodgkin-Lymphome, für die das Risiko bei HIES-Patienten erhöht ist (Kumanovics et al. 2010). Vereinzelt können aber auch andere maligne Erkrankungen wie Leukämien, Lungen- und Leberkarzinome auftreten. Weitere optionale Befunde sind Gefäßanomalien in Form von Koronararterienaneurysmen (Ling et al. 2007) und ZNS-Anomalien (Freeman et al. 2007a). Diese Merkmale geben in Zusammenhang mit anderen infektiologischen und nicht-infektiologischen HIES-Symptomen weitere wichtige differentialdiagnostische Hinweise. Auch die im 5-Punkt-Score nicht explizit aufgeführten viralen

Haut-Infektionen mit Herpesviren und *Molluscum contagiosum*, die vor allem für die AR-HIES-Variante sprechen, sowie Infektionen mit atypischen Erregern, sollten differentialdiagnostisch eine der HIES-Varianten weiter eingrenzen.

Der 5-Punkt-Score wurde in dieser Arbeit primär jedoch für die Beurteilung eines STAT3-HIES generiert und eine Ausweitung/Übertragung auf andere HIES-Formen könnte ein Ansatzpunkt für weitere Studien darstellen.

4.4.2 Vergleich von NIH-Score und 5-Punkt-Score

Die endgültige Diagnose bei 78 Patienten mit unterschiedlich ausgeprägtem HIES Phänotyp wurde durch die molekulargenetische Analyse von *STAT3* gestellt. Der klinische Phänotyp dieser Patienten mit und ohne *STAT3*-Mutation wurde anhand von zwei Score-Systemen kategorisiert, die eine bestmögliche Einschätzung über den *STAT3*-Status eines Patienten auf klinischer Ebene ermöglichen sollten. Anhand von Vierfeldertafeln wurden die Ergebnisse beider Score-Systeme schematisch gegenübergestellt und Sensitivität und Spezifität beider Score-Systeme berechnet (vergl. Tabelle 14).

Statistisch gesehen unterscheiden sich die Ergebnisse der beiden Score-Systeme nicht wesentlich voneinander. Die Trefferquote richtig-positive (Sensitivität) sowie richtig-negative (Spezifität) *STAT3*-HIES Patienten zu erkennen, lag beim NIH-Score bei 90% und 96%; beim 5-Punkt-Score bei 98% und 83% (vergl. Tabelle 13 Kap. 3.4.3).

Aus klinischer Sicht zeigt der 5-Punkt-Score allerdings einen Vorteil. Zum Beispiel hatte der acht Monate alte Säugling im NIH-Score 34 Punkte. Die Klinik dieses Patienten zeigte jedoch eindeutig Hinweise auf ein HIES, begründet durch das Ekzem, ein hohes IgE, Pneumonien mit Empyembildung sowie eine positive HIES-Familienanamnese (Vater und Großmutter väterlicherseits mit klassischem *STAT3*-HIES). Mit dem 5-Punkt-Score erreichte dieser Patient acht Punkte und wurde trotz seines jungen Alters in die richtige Kategorie „HIES wahrscheinlich, Molekulardiagnostik empfohlen“ eingestuft. Der andere *STAT3*-mut Patient, der aufgrund seines mildereren klinischen Phänotyps knapp unter der 40 Punktgrenze lag, fiel auch mit dem 5-Punkt-Score nicht in die richtige Kategorie, zeigte jedoch niedrige T_H17 -Zellzahlen (0,18%), so dass hier die Empfehlung zur Durchführung der Molekulardiagnostik wieder gegeben war.

Zwar hat der 5-Punkt Score, absolut betrachtet, eine etwas höhere falsch-positiv Rate (fünf *STAT3*-wt Patienten mit ≥ 5 Punkten) im Vergleich zum NIH-Score (drei *STAT3*-wt Patienten mit ≥ 40 Punkten), dies scheint jedoch aus klinischer Sicht nicht von Nachteil. Die Mehrzahl dieser „falsch“ zugeordneten Patienten zeigt einen auffälligen Phänotyp. Bei zwei der Patienten mit >40 NIH-Score-Punkten konnte bereits ein AR-HIES mit Mutation in *DOCK8* bestätigt werden, drei weitere Patienten, die im 5-Punkt-Score als „HIES sehr wahrscheinlich“ eingestuft wurden, haben einen milden T-Zelldefekt oder rezidivierende Herpes-Infektionen und möglicherweise andere HIES-

Formen. In diesen Fällen können die T_H17-Zellzahlen bei differentialdiagnostischen Überlegungen herangezogen werden.

Dieser Vergleich ist durch die Tatsache, dass der NIH-Score bereits vor der molekulargenetischen Aufklärung des HIES entstand und der 5-Punkt-Score aus dem Wissen über den STAT3-Status der Patienten resultierte, und deswegen eine bessere Quote bei der Erkennung der STAT3-HIES Patienten erzielte, möglicherweise limitiert.

Die Grenzen für die Beurteilung des STAT3-HIES im NIH-Score könnten laut unserer Daten etwas modifiziert werden und wie folgt lauten: ≥ 40 Punkte ist ein HIES sehr wahrscheinlich, zwischen 30-40 Punkten sollte eine individuelle Beurteilung in Bezug auf die spezifischen HIES-Symptome sowie die Untersuchung der T_H17-Zellen erfolgen, und bei <30 Punkten ist ein HIES eher unwahrscheinlich. Für den 5-Punkt-Score liegt der Bereich in dem eine individuelle Beurteilung für weitere diagnostische Schritte erfolgen sollte zwischen 4-8 Punkten.

Mit dem Bewusstsein, dass sich Symptome bei HIES-Patienten erst im Verlauf der Erkrankung entwickeln können und durch aggressive Antibiotikatherapien einige Symptome vielleicht auch unterdrückt werden, stellen somit beide Score-Versionen eine gute Hilfestellung für die Diagnose STAT3-HIES dar. Kein HIES-Scoring-System sollte jedoch einen guten Kliniker ersetzen und ihn davon abhalten, bei begründetem Verdacht die molekulargenetische Diagnostik durchzuführen.

Durch die weitere Aufklärung von molekulargenetischen Ursachen des HIES ist in Zukunft eine immer genauere Abgrenzung der einzelnen Varianten zu erwarten, so dass jeder klinische Score dahingehend weiter zu optimieren ist.

5 Zusammenfassung

Das autosomal-dominante Hyper-IgE-Syndrom (AD-HIES) gehört zu den angeborenen Immundefekten und wird durch Ekzem, erhöhtes Serum-IgE, Eosinophilie, rezidivierende Abszesse und Lungeninfektionen sowie assoziierte Skelett- und Bindegewebssymptome charakterisiert. Durch die Assoziation von Mutationen im Gen *STAT3* bei Patienten mit AD-HIES gelang es 2007 die ätiologische Ursache dieses Krankheitsbildes aufzuklären, wodurch die Diagnose heute molekulargenetisch bestätigt werden kann (Holland et al. 2007; Minegishi et al. 2007). Ziel der vorgelegten Arbeit war es, den klassischen AD-HIES-Phänotyp mit dem *STAT3*-Genotyp zu korrelieren und die bestmöglichen Kriterien zu definieren, die Patienten mit *STAT3*-HIES charakterisieren und eine Abgrenzung zu ähnlichen Erkrankungen (z.B. atopische Dermatitis) sowie eine frühzeitige Diagnose ermöglichen.

Hierfür wurden 78 Patienten mit unterschiedlich ausgeprägtem HIES-Phänotyp auf eine Mutation in *STAT3* untersucht. Der Phänotyp der Patienten wurde anhand des NIH-Scores quantitativ beurteilt, der die Wahrscheinlichkeit für ein HIES bestimmt (≥ 40 Punkte entsprechen der klinischen Diagnose HIES) (Grimbacher et al. 1999b). Bei 48 der untersuchten Patienten konnte eine heterozygote Mutation in *STAT3* identifiziert werden. Es handelte sich um 24 verschiedene Mutationen, darunter 19 Erstbeschreibungen, die in drei funktionellen Domänen des *STAT3* Proteins auftraten. Alle Mutationen erlauben die Expression eines veränderten *STAT3* Proteins, das einen dominant-negativen Effekt auf die *STAT3* Funktion ausübt (Minegishi et al. 2007; Renner et al. 2008). 96% der Patienten mit *STAT3* Mutation (*STAT3*-mut Patienten) hatten ≥ 40 Punkte im NIH-Score und dementsprechend die klinisch-gesicherte Diagnose eines HIES. Bei 30 Patienten wurde auf genomischer DNA-Ebene keine Mutation in *STAT3* gefunden (*STAT3*-wt Patienten); 90% gehörten der Gruppe der „Verdacht auf HIES“-Patienten an (< 40 NIH-Score Punkte). Nur zwei *STAT3*-mut Patienten hatten einen NIH-Score unter 40 Punkten und bei drei Patienten mit ≥ 40 NIH-Score-Punkten konnte keine Mutation in *STAT3* identifiziert werden.

Klinische Merkmale, die eine Differenzierung von *STAT3*-mut und *STAT3*-wt Patienten zulassen, wurden durch Sensitivitäts- und Spezifitätsberechnungen ermittelt (vergl. Tabelle 10). Während die Trias Ekzem, erhöhtes Serum-IgE und Eosinophilie keinen Unterschied in den beiden Kohorten zeigten, sprachen folgende Symptome besonders für ein *STAT3*-HIES ($> 85\%$ Spezifität): **Organabszesse, schwere Infektionen (Sepsis, Meningitis, Osteomyelitis), Pneumatozelen, Frakturen ohne adäquates Trauma, Skoliose und Nagel/mukokutane Candidiasis.**

Funktionell spielt *STAT3* eine wichtige Rolle bei der Differenzierung von IL-17 produzierenden $CD4^+$ -T-Zellen (T_H17 -Zellen), die bei der Abwehr von extrazellulären Bakterien und Pilzen beteiligt sind (Yang et al. 2007; Ochs et al. 2009). Diese Arbeit konnte bestätigen, dass *STAT3*-mut Patienten signifikant erniedrigte T_H17 -Zellen im Vergleich zu *STAT3*-wt Patienten und normalen Kontrollen haben. Zum einen kann hiermit die Abwehrschwäche gegenüber

Staphylococcus aureus und *Candida albicans* erklärt werden, zum anderen stellen die T_H17-Zellen einen sehr sensitiven und spezifischen diagnostischen Marker für ein STAT3-HIES dar.

Aus der Literatur ist außerdem bekannt, dass STAT3-Signalwege eine wichtige Rolle bei der Differenzierung von Osteoblasten und Osteoklasten spielen, und für die Aufrechterhaltung der Knochenhomöostase von Bedeutung sind (O'Brien et al. 1999; Itoh et al. 2006). Daraus ergibt sich eine mögliche Erklärung für die Skelett- und Bindegewebsanomalien bei STAT3-HIES Patienten, die aufgrund einer verminderten STAT3-Proteinfunktion entstehen können.

Basierend auf den klinischen und immunologischen Korrelationsanalysen wurde der NIH-Score in den vereinfachten 5-Punkt-Score weiter entwickelt, der keine qualitative Wertung der Ausprägung und Häufigkeit der Symptome enthält (vergl. Tabelle 12). Die retrospektive Erhebung des 5-Punkt-Scores erzielte in dieser Studie eine vergleichbar hohe Korrelationsrate wie der NIH-Score (vergl. Tabelle 13). Zusammen mit der T_H17-Zellzahlbestimmung stellt der 5-Punkt-Score ein diagnostisches Hilfsmittel für STAT3-HIES dar, ohne dem NIH-Score überlegen zu sein.

Die Erkenntnisse dieser Studie liefern einen wichtigen Beitrag zur klinisch-genetischen Definition des STAT3-assoziierten HIES und stellen wesentliche Kriterien, die zur Diagnosefindung und Abgrenzung klinisch ähnlicher Erkrankungen führen, dar. Durch eine frühzeitige Diagnosestellung wird schließlich die Einleitung einer adäquaten Therapie ermöglicht, durch die Komplikationen vermieden und die Lebensqualität sowie Prognose der Patienten deutlich verbessert werden können.

Weitere Untersuchungen von Zusammenhängen zwischen STAT3-Mutationen, der STAT3-Proteinfunktion und der Entstehung der einzelnen Symptome können in Zukunft neue Therapieansätze generieren und wichtige Erkenntnisse über die Entstehung von eigenständigen Erkrankungen wie der Osteoporose, der idiopathischen Skoliose oder Erkrankungen aus dem atopischen Formenkreis liefern.

6 Literaturverzeichnis

- Akira, S. (2000).** "Roles of STAT3 defined by tissue-specific gene targeting." *Oncogene* 19(21): 2607-2611.
- Akira, S. and K. Takeda (2004).** "Toll-like receptor signalling." *Nat Rev Immunol* 4(7): 499-511.
- Al Khatib, S., S. Keles, M. Garcia-Lloret, et al. (2009).** "Defects along the T(H)17 differentiation pathway underlie genetically distinct forms of the hyper IgE syndrome." *J Allergy Clin Immunol* 124(2): 342-348, 348 e341-345.
- Albert, M. H., L. J. Kohl, N. Rieber, et al. (2010).** "Erhöhtes Serum-IgE und Ekzem - eine allergische Erkrankung oder ein angeborener Immundefekt?" *Pädiatrische Allergologie* 1/2010(13): 32-37.
- Bauer, A., S. Solinas-Toldo and J. D. Hoheisel.** "Gendiagnostik, Methodische Grundlagen". *Grundlagen der Molekularen Medizin*. D. Ganten and K. Ruckpaul. Springer Medizin Verlag, Heidelberg, 3. Auflage (2008): p.347-362.
- Belohradsky, B. H., S. Daumling, W. Kiess, et al. (1987).** "[The hyper-IgE-syndrome (Buckley- or Job-syndrome)]." *Ergeb Inn Med Kinderheilkd* 55: 1-39.
- Bettelli, E., T. Korn and V. K. Kuchroo (2007).** "Th17: the third member of the effector T cell trilogy." *Curr Opin Immunol* 19(6): 652-657.
- Bieber, T. (2008).** "Atopic dermatitis." *N Engl J Med* 358(14): 1483-1494.
- Bilora, F., F. Petrobelli, V. Boccioletti, et al. (2000).** "Moderate-dose intravenous immunoglobulin treatment of Job's syndrome. Case report." *Minerva Med* 91(5-6): 113-116.
- Bittner, T. C., U. Pannicke, E. D. Renner, et al. (2010).** "Successful long-term correction of autosomal recessive hyper-IgE syndrome due to DOCK8 deficiency by hematopoietic stem cell transplantation." *Klin Padiatr* 222(6): 351-355.
- Blum, R., G. Geller and L. A. Fish (1977).** "Recurrent severe staphylococcal infections, eczematoid rash, extreme elevations of IgE, eosinophilia, and divergent chemotactic responses in two generations." *J Pediatr* 90(4): 607-609.
- Borges, W. G., N. H. Augustine and H. R. Hill (2000).** "Defective interleukin-12/interferon-gamma pathway in patients with hyperimmunoglobulinemia E syndrome." *J Pediatr* 136(2): 176-180.
- Borges, W. G., T. Hensley, J. C. Carey, et al. (1998).** "The face of Job." *J Pediatr* 133(2): 303-305.
- Buckley, R. H. (2001).** "The hyper-IgE syndrome." *Clin Rev Allergy Immunol* 20(1): 139-154.
- Buckley, R. H. and W. G. Becker (1978).** "Abnormalities in the regulation of human IgE synthesis." *Immunol Rev* 41: 288-314.
- Buckley, R. H., B. B. Wray and E. Z. Belmaker (1972).** "Extreme hyperimmunoglobulinemia E and undue susceptibility to infection." *Pediatrics* 49(1): 59-70.

- Chehimi, J., M. Elder, J. Greene, et al. (2001).** "Cytokine and chemokine dysregulation in hyper-IgE syndrome." *Clin Immunol* 100(1): 49-56.
- Daumling, S., D. Buriot, P. H. Trung, et al. (1980).** "[The Buckley syndrome: recurring, severe staphylococcal infections, eczema and hyperimmunoglobulinemia E. (author's transl)]." *Infection* 8 Suppl 3: 248-254.
- Davis, S. D., J. Schaller and R. J. Wedgwood (1966).** "Job's Syndrome. Recurrent, "cold", staphylococcal abscesses." *Lancet* 1(7445): 1013-1015.
- de Beaucoudrey, L., A. Puel, O. Filipe-Santos, et al. (2008).** "Mutations in STAT3 and IL12RB1 impair the development of human IL-17-producing T cells." *J Exp Med* 205(7): 1543-1550.
- Del Prete, G., A. Tiri, E. Maggi, et al. (1989).** "Defective in vitro production of gamma-interferon and tumor necrosis factor-alpha by circulating T cells from patients with the hyper-immunoglobulin E syndrome." *J Clin Invest* 84(6): 1830-1835.
- Donabedian, H. and J. I. Gallin (1983a).** "The hyperimmunoglobulin E recurrent-infection (Job's) syndrome. A review of the NIH experience and the literature." *Medicine (Baltimore)* 62(4): 195-208.
- Donabedian, H. and J. I. Gallin (1983b).** "Two inhibitors of neutrophil chemotaxis are produced by hyperimmunoglobulin E recurrent infection syndrome mononuclear cells exposed to heat-killed staphylococci." *Infect Immun* 40(3): 1030-1037.
- Dovichi, N. J. and J. Zhang (2000).** "Wie die Kapillarelektrophorese das menschliche Genom sequenzierte." *Angewandte Chemie* 112(24): 4635-4640.
- Dreskin, S. C., P. K. Goldsmith, W. Strober, et al. (1987).** "Metabolism of immunoglobulin E in patients with markedly elevated serum immunoglobulin E levels." *J Clin Invest* 79(6): 1764-1772.
- Eberting, C. L., J. Davis, J. M. Puck, et al. (2004).** "Dermatitis and the newborn rash of hyper-IgE syndrome." *Arch Dermatol* 140(9): 1119-1125.
- Engelhardt, K. R., S. McGhee, S. Winkler, et al. (2009).** "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* 124(6): 1289-1302 e1284.
- Etzioni, A., N. Shehadeh, A. Brecher, et al. (1997).** "Cyclosporin A in hyperimmunoglobulin E syndrome." *Ann Allergy Asthma Immunol* 78(4): 413-414.
- Eyerich, K., S. Foerster, S. Rombold, et al. (2008).** "Patients with chronic mucocutaneous candidiasis exhibit reduced production of Th17-associated cytokines IL-17 and IL-22." *J Invest Dermatol* 128(11): 2640-2645.
- Farkas, L. G.** Anthropometry of the head and face in medicine. Raven Press, New York, New York, 2. Auflage (1994): p. 242-346.
- Fischer, A. (2007).** "Human primary immunodeficiency diseases." *Immunity* 27(6): 835-845.
- Freeman, A. F., C. J. Collura-Burke, N. J. Patronas, et al. (2007a).** "Brain abnormalities in patients with hyperimmunoglobulin E syndrome." *Pediatrics* 119(5): e1121-1125.

- Freeman, A. F., D. E. Kleiner, H. Nadiminti, et al. (2007b).** "Causes of death in hyper-IgE syndrome Coronary artery aneurysms in patients with hyper IgE recurrent infection syndrome." *J Allergy Clin Immunol* 119(5): 1234-1240.
- Gatz, S. A., U. Benninghoff, C. Schutz, et al. (2010).** "Curative treatment of autosomal-recessive hyper-IgE syndrome by hematopoietic cell transplantation." *Bone Marrow Transplant*.
- Gennery, A. R., T. J. Flood, M. Abinun, et al. (2000).** "Bone marrow transplantation does not correct the hyper IgE syndrome." *Bone Marrow Transplant* 25(12): 1303-1305.
- Goussetis, E., I. Peristeri, V. Kitra, et al. (2010).** "Successful long-term immunologic reconstitution by allogeneic hematopoietic stem cell transplantation cures patients with autosomal dominant hyper-IgE syndrome." *J Allergy Clin Immunol* 126(2): 392-394.
- Grimbacher, B., S. M. Holland, J. I. Gallin, et al. (1999a).** "Hyper-IgE syndrome with recurrent infections--an autosomal dominant multisystem disorder." *N Engl J Med* 340(9): 692-702.
- Grimbacher, B., S. M. Holland and J. M. Puck (2005).** "Hyper-IgE syndromes." *Immunol Rev* 203: 244-250.
- Grimbacher, B., A. A. Schaffer, S. M. Holland, et al. (1999b).** "Genetic linkage of hyper-IgE syndrome to chromosome 4." *Am J Hum Genet* 65(3): 735-744.
- Guttman-Yassky, E., M. A. Lowes, J. Fuentes-Duculan, et al. (2008).** "Low expression of the IL-23/Th17 pathway in atopic dermatitis compared to psoriasis." *J Immunol* 181(10): 7420-7427.
- Hawn, T. R., A. Ozinsky, L. M. Williams, et al. (2005).** "Hyper-IgE syndrome is not associated with defects in several candidate toll-like receptor pathway genes." *Hum Immunol* 66(7): 842-847.
- Hill, H. R. and P. G. Quie (1974).** "Raised serum-IgE levels and defective neutrophil chemotaxis in three children with eczema and recurrent bacterial infections." *Lancet* 1(7850): 183-187.
- Hirano, T., K. Ishihara and M. Hibi (2000).** "Roles of STAT3 in mediating the cell growth, differentiation and survival signals relayed through the IL-6 family of cytokine receptors." *Oncogene* 19(21): 2548-2556.
- Hokuto, I., M. Ikegami, M. Yoshida, et al. (2004).** "Stat-3 is required for pulmonary homeostasis during hyperoxia." *J Clin Invest* 113(1): 28-37.
- Holland, S. M., F. R. DeLeo, H. Z. Elloumi, et al. (2007).** "STAT3 mutations in the hyper-IgE syndrome." *N Engl J Med* 357(16): 1608-1619.
- Huang, W., L. Na, P. L. Fidel, et al. (2004).** "Requirement of interleukin-17A for systemic anti-Candida albicans host defense in mice." *J Infect Dis* 190(3): 624-631.
- Islander, U., A. Andersson, E. Lindberg, et al. (2010).** "Superantigenic Staphylococcus aureus stimulates production of interleukin-17 from memory but not naive T cells." *Infect Immun* 78(1): 381-386.
- Ito, R., M. Mori, S. Katakura, et al. (2003).** "Selective insufficiency of IFN-gamma secretion in patients with hyper-IgE syndrome." *Allergy* 58(4): 329-336.

- Itoh, S., N. Udagawa, N. Takahashi, et al. (2006).** "A critical role for interleukin-6 family-mediated Stat3 activation in osteoblast differentiation and bone formation." *Bone* 39(3): 505-512.
- Jiao, H., B. Toth, M. Erdos, et al. (2008).** "Novel and recurrent STAT3 mutations in hyper-IgE syndrome patients from different ethnic groups." *Mol Immunol* 46(1): 202-206.
- Kim, H. J., J. H. Kim, Y. K. Shin, et al. (2009).** "A novel mutation in the linker domain of the signal transducer and activator of transcription 3 gene, p.Lys531Glu, in hyper-IgE syndrome." *J Allergy Clin Immunol* 123(4): 956-958.
- King, C. L., J. I. Gallin, H. L. Malech, et al. (1989).** "Regulation of immunoglobulin production in hyperimmunoglobulin E recurrent-infection syndrome by interferon gamma." *Proc Natl Acad Sci U S A* 86(24): 10085-10089.
- Koga, C., K. Kabashima, N. Shiraishi, et al. (2008).** "Possible pathogenic role of Th17 cells for atopic dermatitis." *J Invest Dermatol* 128(11): 2625-2630.
- Kumanovics, A., S. L. Perkins, H. Gilbert, et al. (2010).** "Diffuse Large B Cell Lymphoma in Hyper-IgE Syndrome Due To STAT3 Mutation." *J Clin Immunol*.
- Langenbeck, A. (2010).** "Genetische, immunologische und phänotypische Abgrenzung von Patienten mit schwerem extrinischen atopischen Ekzem und Hyper-IgE-Syndromen" *Medizinische Fakultät München, Ludwig-Maximilians Universität*. Dissertation (in Vorbereitung)
- Leung, D. Y. and T. Bieber (2003).** "Atopic dermatitis." *Lancet* 361(9352): 151-160.
- Leung, D. Y. and R. S. Geha (1988).** "Clinical and immunologic aspects of the hyperimmunoglobulin E syndrome." *Hematol Oncol Clin North Am* 2(1): 81-100.
- Levy, D. E. and C. K. Lee (2002).** "What does Stat3 do?" *J Clin Invest* 109(9): 1143-1148.
- Levy, D. E. and C. A. Loomis (2007).** "STAT3 signaling and the hyper-IgE syndrome." *N Engl J Med* 357(16): 1655-1658.
- Ling, J. C., A. F. Freeman, A. M. Gharib, et al. (2007).** "Coronary artery aneurysms in patients with hyper IgE recurrent infection syndrome." *Clin Immunol* 122(3): 255-258.
- Louten, J., K. Boniface and R. de Waal Malefyt (2009).** "Development and function of TH17 cells in health and disease." *J Allergy Clin Immunol* 123(5): 1004-1011.
- Ma, C. S., G. Y. Chew, N. Simpson, et al. (2008).** "Deficiency of Th17 cells in hyper IgE syndrome due to mutations in STAT3." *J Exp Med* 205(7): 1551-1557.
- Mathur, A. N., H. C. Chang, D. G. Zisoulis, et al. (2007).** "Stat3 and Stat4 direct development of IL-17-secreting Th cells." *J Immunol* 178(8): 4901-4907.
- McGeachy, M. J. and D. J. Cua (2008).** "Th17 cell differentiation: the long and winding road." *Immunity* 28(4): 445-453.
- Merten, D. F., R. H. Buckley, P. C. Pratt, et al. (1979).** "Hyperimmunoglobulinemia E syndrome: radiographic observations." *Radiology* 132(1): 71-78.

- Milner, J. D., J. M. Brenchley, A. Laurence, et al. (2008).** "Impaired T(H)17 cell differentiation in subjects with autosomal dominant hyper-IgE syndrome." *Nature* 452(7188): 773-776.
- Minegishi, Y., M. Saito, T. Morio, et al. (2006).** "Human tyrosine kinase 2 deficiency reveals its requisite roles in multiple cytokine signals involved in innate and acquired immunity." *Immunity* 25(5): 745-755.
- Minegishi, Y., M. Saito, S. Tsuchiya, et al. (2007).** "Dominant-negative mutations in the DNA-binding domain of STAT3 cause hyper-IgE syndrome." *Nature* 448(7157): 1058-1062.
- Mullis, K. B. and F. A. Faloon (1987).** "Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction." *Methods Enzymol* 155: 335-350.
- Nester, T. A., A. H. Wagnon, W. F. Reilly, et al. (1998).** "Effects of allogeneic peripheral stem cell transplantation in a patient with job syndrome of hyperimmunoglobulinemia E and recurrent infections." *Am J Med* 105(2): 162-164.
- Netea, M. G., P. M. Schneeberger, E. de Vries, et al. (2002).** "Th1/Th2 cytokine imbalance in a family with hyper-IgE syndrome." *Neth J Med* 60(9): 349-353.
- Notarangelo, L. D., A. Fischer, R. S. Geha, et al. (2009).** "Primary immunodeficiencies: 2009 update. International Union of Immunological Societies Expert Committee on Primary Immunodeficiencies." *J Allergy Clin Immunol* 124(6): 1161-1178.
- O'Brien, C. A., I. Gubrij, S. C. Lin, et al. (1999).** "STAT3 activation in stromal/osteoblastic cells is required for induction of the receptor activator of NF-kappaB ligand and stimulation of osteoclastogenesis by gp130-utilizing cytokines or interleukin-1 but not 1,25-dihydroxyvitamin D3 or parathyroid hormone." *J Biol Chem* 274(27): 19301-19308.
- Ochs, H. D., M. Oukka and T. R. Torgerson (2009).** "TH17 cells and regulatory T cells in primary immunodeficiency diseases." *J Allergy Clin Immunol* 123(5): 977-983; quiz 984-975.
- Paganelli, R., E. Scala, M. R. Capobianchi, et al. (1991).** "Selective deficiency of interferon-gamma production in the hyper-IgE syndrome. Relationship to in vitro IgE synthesis." *Clin Exp Immunol* 84(1): 28-33.
- Puel, A., C. Picard, S. Cypowyj, et al. (2010).** "Inborn errors of mucocutaneous immunity to *Candida albicans* in humans: a role for IL-17 cytokines?" *Curr Opin Immunol* 22(4): 467-474.
- Renner, E. D. (2002).** "Klinisch-genetische Definition des Hyper-IgE-Syndroms (HIES), Analyse von 68 Patienten mit dem Anfangsverdacht auf ein HIES und Beschreibung eines neuen Krankheitsbildes (HIES-Variante)." *Kinderklinik und Poliklinik im Dr. von Haunerschen Kinderspital, München, Ludwig-Maximilians-Universität*. Dissertation zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin Seite 1-90
- Renner, E. D., B. H. Belohradsky and B. Grimbacher (2002).** "Hyper-IgE Syndrome." *Monatsschr Kinderheilkd* 10 2002(150): 1168-1179.
- Renner, E. D., I. Pawlita, F. Hoffmann, et al. (2005).** "No indication for a defect in toll-like receptor signaling in patients with hyper-IgE syndrome." *J Clin Immunol* 25(4): 321-328.

- Renner, E. D., J. M. Puck, S. M. Holland, et al. (2004).** "Autosomal recessive hyperimmunoglobulin E syndrome: a distinct disease entity." *J Pediatr* 144(1): 93-99.
- Renner, E. D., S. Rylaarsdam, S. Anover-Sombke, et al. (2008).** "Novel signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) mutations, reduced T(H)17 cell numbers, and variably defective STAT3 phosphorylation in hyper-IgE syndrome." *J Allergy Clin Immunol* 122(1): 181-187.
- Rousset, F., J. Robert, M. Andary, et al. (1991).** "Shifts in interleukin-4 and interferon-gamma production by T cells of patients with elevated serum IgE levels and the modulatory effects of these lymphokines on spontaneous IgE synthesis." *J Allergy Clin Immunol* 87(1 Pt 1): 58-69.
- Saiki, R. K., S. Scharf, F. Faloona, et al. (1985).** "Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia." *Science* 230(4732): 1350-1354.
- Sanger, F., S. Nicklen and A. R. Coulson (1977).** "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors." *Proc Natl Acad Sci U S A* 74(12): 5463-5467.
- Schaub, B., J. Liu, I. Schleich, et al. (2008).** "Impairment of T helper and T regulatory cell responses at birth." *Allergy* 63(11): 1438-1447.
- Schimke, L. F., J. Sawalle-Belohradsky, J. Roesler, et al. (2010).** "Diagnostic approach to the hyper-IgE syndromes: immunologic and clinical key findings to differentiate hyper-IgE syndromes from atopic dermatitis." *J Allergy Clin Immunol* 126(3): 611-617 e611.
- Shirafuji, Y., H. Matsuura, A. Sato, et al. (1999).** "Hyperimmunoglobulin E syndrome: a sign of TH1/TH2 imbalance?" *Eur J Dermatol* 9(2): 129-131.
- Stiehm, E. R., Ochs H.D. and J. A. Winkelstein.** "Immunodeficiency Disorders: General Considerations". *Immunologic Disorders in Infants & Childrens*. E. R. Stiehm, Ochs H.D. and J. A. Winkelstein. Elsevier Saunders, Philadelphia, Pennsylvania, 5. Auflage (2004): p.289-355.
- Takeda, K., K. Noguchi, W. Shi, et al. (1997).** "Targeted disruption of the mouse Stat3 gene leads to early embryonic lethality." *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(8): 3801-3804.
- Tesmer, L. A., S. K. Lundy, S. Sarkar, et al. (2008).** "Th17 cells in human disease." *Immunol Rev* 223: 87-113.
- van de Veerdonk, F. L., R. Marijnissen, L. A. Joosten, et al. (2010).** "Milder clinical hyperimmunoglobulin E syndrome phenotype is associated with partial interleukin-17 deficiency." *Clin Exp Immunol* 159(1): 57-64.
- Van Scoy, R. E., H. R. Hill, R. E. Ritts, et al. (1975).** "Familial neutrophil chemotaxis defect, recurrent bacterial infections, mucocutaneous candidiasis, and hyperimmunoglobulinemia E." *Ann Intern Med* 82(6): 766-771.
- Vercelli, D., H. H. Jabara, C. Cunningham-Rundles, et al. (1990).** "Regulation of immunoglobulin (Ig)E synthesis in the hyper-IgE syndrome." *J Clin Invest* 85(5): 1666-1671.
- Wakim, M., M. Alazard, A. Yajima, et al. (1998).** "High dose intravenous immunoglobulin in atopic dermatitis and hyper-IgE syndrome." *Ann Allergy Asthma Immunol* 81(2): 153-158.

- Waldfahrer, F., S. Pahl, P. A. Federspil, et al. (1999).** "[Hyper-IgE syndrome with ENT manifestations. Overview and case report of successful therapy with high dosage i.v. immunoglobulin]." *HNO* 47(12): 1063-1068.
- Wise, C. A., X. Gao, S. Shoemaker, et al. (2008).** "Understanding genetic factors in idiopathic scoliosis, a complex disease of childhood." *Curr Genomics* 9(1): 51-59.
- Woellner, C., E. M. Gertz, A. A. Schaffer, et al. (2010).** "Mutations in STAT3 and diagnostic guidelines for hyper-IgE syndrome." *J Allergy Clin Immunol* 125(2): 424-432 e428.
- Woellner, C., A. A. Schaffer, J. M. Puck, et al. (2007).** "The hyper IgE syndrome and mutations in TYK2." *Immunity* 26(5): 535; author reply 536.
- Wollenberg, A. and E. Klein (2007).** "Current aspects of innate and adaptive immunity in atopic dermatitis." *Clin Rev Allergy Immunol* 33(1-2): 35-44.
- Yang, X. O., A. D. Panopoulos, R. Nurieva, et al. (2007).** "STAT3 regulates cytokine-mediated generation of inflammatory helper T cells." *J Biol Chem* 282(13): 9358-9363.
- Zhang, Q., J. C. Davis, I. T. Lamborn, et al. (2009).** "Combined immunodeficiency associated with DOCK8 mutations." *N Engl J Med* 361(21): 2046-2055.

7 Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

| | | |
|--------------|----------------------------|---|
| A | AD-HIES | autosomal dominantes Hyper-IgE Syndrom |
| | AR-HIES | autosomal rezessives Hyper-IgE Syndrom |
| B | bp | base pairs (Basenpaare) |
| C | cDNA | coding DNA |
| | CD | cluster of differentiation |
| D | DB- | DNA-bindungs- |
| | dest. | destilliert |
| | DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| | dNTPs | Desoxynukleotidtriphosphate |
| | ddNTPs | Didesoxynukleotidtriphosphate |
| | dsDNA | doppelstrang DNA |
| DOCK8 | dedicator of cytokinesis 8 | |
| E | EDTA | Ethylendiamintetraacetat |
| F | FACS | fluorescence-associated cell sorting |
| | FBS | fetales bovines (Kälber) Serum |
| | FITC | Fluoreszeinisothiocyanat |
| G | gDNA | genomische DNA |
| H | HIES | Hyper-IgE Syndrom |
| | HSCT | haematopoetic stem cell transplantation |
| I | ID# | Identifikationsnummer |
| | IL | Interleukin |
| | INF | Interferon |
| | IVIG | intravenous immunoglobulin |
| | IU | international Units |
| J | JAK | Janus Kinase |
| M | M | Molar |
| N | NaCl | Natriumchlorid |
| | NIH | National Institutes of Health |
| O | OD | optische Dichte |
| P | PBMC | peripheral blood mononuclear cell |
| | PBS | phosphat puffered saline (Phosphat gepufferte Salzlösung) |
| | PCR | Polymerase-Kettenreaktion |
| | PID | primärer Immundefekt |
| | PMA | phorbol myristate acetate |

| | | |
|----------|-----------------------|--|
| R | rpm | round(s) per minute (Umdrehung(en) pro Minute) |
| S | SH2 | scr homology region 2 |
| | STAT | Signal Transducer and Activator of Transcription |
| | STAT3-mut | STAT3-mutiert |
| | STAT3-wt | STAT3-Wildtyp |
| T | TA- | Transaktivierungs- |
| | T _H 1/2/17 | T-Helferzelle 1/2/17 |
| | TLR | Toll-like-Rezeptor |
| | tRNA | transfer Ribonukleinsäure |
| | TYK | Tyrosinkinase |

7.2 **Abbildungsverzeichnis**

| | |
|--|----|
| Abbildung 1: Schematische Darstellung des STAT3-Signalweges [modifiziert nach (Levy and Loomis 2007)] | 7 |
| Abbildung 2: Gelelektrophorese | 19 |
| Abbildung 3: Symptome von Patienten mit klinisch-gesichertem HIES | 25 |
| Abbildung 4: Symptome von Patienten mit „Verdacht auf HIES“ | 26 |
| Abbildung 5: Sequenzchromatogramme der <i>STAT3</i> -Exon 12 Punktmutation eines Patienten sowie einer Kontrollperson..... | 31 |
| Abbildung 6: Sequenzchromatogramm des <i>STAT3</i> -Exon 16 eines Patienten mit Deletion von drei Basenpaaren..... | 31 |
| Abbildung 7: Darstellung der <i>STAT3</i> -Exon 22-23 Deletion | 32 |
| Abbildung 8: Mutationsgraphik | 33 |
| Abbildung 9: Darstellung der CD4 ⁺ -T-Lymphozyten (rot) anhand Zytokin-Positivität für IL-17 (x-Achse) und INF γ (y-Achse) nach Stimulation mit PMA/Ionomycin und daraus ermittelte Dot-plot Quadratstatistiken eines Patienten mit <i>STAT3</i> Mutation (0,02% IL-17-Positivität) im Vergleich zu einer gesunden Kontrolle (1,3% IL-17-Positivität). | 37 |
| Abbildung 10: Darstellung der CD4 ⁺ -T-Lymphozyten (rot) anhand Zytokin-Positivität für IL-17 (x-Achse) und INF γ (y-Achse) nach Stimulation mit PMA/Ionomycin und daraus ermittelte Dot-plot Quadratstatistiken eines <i>STAT3</i> -wt Patienten (0,73% IL-17-Positivität) im Vergleich zu einer gesunden Kontrolle (0,86% IL-17-Positivität)..... | 38 |
| Abbildung 11: T _H 17-Zellzahlen von <i>STAT3</i> -mut und <i>STAT3</i> -wt Patienten sowie normalen Kontrollpersonen | 39 |
| Abbildung 12: Korrelation von <i>STAT3</i> -Genotyp und klinischer Diagnose (NIH-Score \geq 40 und < 40 Punkte) im Pfaddiagramm..... | 42 |
| Abbildung 13: Korrelation von <i>STAT3</i> -Genotyp und T _H 17- Zellzahlen (>0,2% und < 0,2%) im Pfaddiagramm. (Die Zahlen in den grau markierten Kästchen stehen für Patientenanzahl n=x) | 43 |
| Abbildung 14: Korrelation von Phänotyp (NIH-Score), Genotyp (<i>STAT3</i> -Status) und immunologischem Merkmal (T _H 17-Zellzahl in % der gesamt CD4 ⁺ -T-Zellen) in 53 Patienten | 45 |
| Abbildung 15: Schematische Darstellung der Ergebnisse der Score-Versionen A-D in 78 Patienten. In den grau markierten Kästchen ist die Patientenanzahl n=x angegeben. P=Scorepunkte..... | 49 |
| Abbildung 16: Korrelation von Phänotyp (5-Punkt-Score), immunologischen Daten (T _H 17-Zellen) und <i>STAT3</i> -Genotyp in 53 untersuchten Patienten. | 52 |
| Abbildung 17: Ergebnisse des NIH-Scores (x-Achse) zu Ergebnissen des 5-Punkt-Scores (y-Achse) in <i>STAT3</i> -wt und <i>STAT3</i> -mut Patienten | 53 |
| Abbildung 18: NIH-Score (y-Achse) gegen 5-Punkt-Score (x-Achse) von Patienten unter sechs Jahren..... | 55 |

7.3 Tabellenverzeichnis

| | |
|--|----|
| Tabelle 1: Scoringsystem zum Hyper-IgE-Syndrom | 13 |
| Tabelle 2: Geräte | 14 |
| Tabelle 3: Reagenzien | 15 |
| Tabelle 4: Primer-Sequenzen | 18 |
| Tabelle 5: Klinische Daten von gesicherten HIES-Patienten (NIH-Score Punkte \geq 40) | 27 |
| Tabelle 6: Klinische Daten von Verdacht auf HIES-Patienten (NIH-Score Punkte $<$ 40)..... | 29 |
| Tabelle 7: Auflistung der in Abbildung 8 symbolisch dargestellten Mutationen im Protein STAT3 | 34 |
| Tabelle 8: NIH-Score-Punkte und Mutation von STAT3-mut (links) und STAT3-wt (rechts) Patienten | 35 |
| Tabelle 9: Charakteristische klinische Merkmale von STAT3-mut Patienten im Vergleich zu STAT3-wt Patienten | 41 |
| Tabelle 10: Sensitivität und Spezifität von 20 klinischen Merkmalen zur Charakterisierung des STAT3-HIES | 46 |
| Tabelle 11: Verteilung der Score-Punkte für 16 Nebenkriterien in vier verschiedene Versionen zur Vereinfachung der klinischen Evaluation von Patienten mit Verdacht auf HIES | 48 |
| Tabelle 12: Vereinfachtes klinisches Diagnoseschema zum STAT3-HIES: 5-Punkt-Score | 50 |
| Tabelle 13: Vergleich von Phänotyp und STAT3-Genotyp mit dem NIH-Score (A) und dem 5- Punkt-Score (B) | 54 |
| Tabelle 14: Korrelationsvergleich von klinischem Score, T _H 17-Zellzahlen und STAT3-Genotyp mit dem NIH-Score (A) und dem 5-Punkt-Score (B) in 53 Patienten..... | 56 |
| Tabelle 15: Verteilung von klinischen Merkmalen bei HIES-Patienten | 58 |
| Tabelle 16: Mutationen in <i>STAT3</i> bei Patienten mit AD-HIES Phänotyp | 61 |
| Tabelle 17: Symptomverteilung in HIES-Patienten in fünf Studien im Vergleich zu Ergebnissen dieser Arbeit | 63 |
| Tabelle 18: NIH-Score-Punkte von STAT3-mut und STAT3-wt Patienten | 69 |

7.4 **Danksagung**

Bei Herrn Professor Dr. med. B.H. Belohradsky bedanke ich mich herzlich für die Überlassung des Themas, die Bereitstellung von wichtigem Patienten- und Labormaterial, seine konstruktiven Gespräche und die stetige Unterstützung, Patienten und Ärzte für diese Studie zu gewinnen.

Besonders möchte ich Frau Priv.-Doz. Dr. med. Ellen Renner für die ausgezeichnete, freundschaftliche und kontinuierliche Betreuung danken. Sie konnte mich immer wieder motivieren und für das Gebiet der primären Immundefekte begeistern und ermöglichte mir, Ergebnisse dieser Arbeit auf internationalen Kongressen vorzustellen sowie in wissenschaftlichen Zeitschriften zu veröffentlichen.

Herrn Professor Dr. med. H.D. Ochs danke ich für die Ermöglichung eines Aufenthaltes in seinem Labor und für viele hilfreiche Ideen und Denkanstöße. Aus seinem Team gilt mein besonderer Dank Stacey Rylaarsdam für die Einführung in die labortechnischen Methoden.

Des Weiteren bedanke ich mich für die freundliche Unterstützung und Hilfe bei der Durchführung der molekulargenetischen Analysen bei Herrn Professor Dr. med. P. Lohse und seinen Mitarbeitern des molekularbiologischen Labors im Institut für Klinische Chemie im Klinikum Großhadern.

Besonderer Dank gilt auch den Mitarbeitern des Infektionsimmunologischen Labors im Dr. von Haunerschen Kinderspital Dipl.-Biol. Julie Sawalle-Belohradsky, Irmgard Eckerlein, Mayumi Hoffmann, Evi Eisl, Frau Bieberle und Monika Senn, die mich für das Gelingen dieser Arbeit tatkräftig unterstützten.

Bei allen einweisenden Ärzten, den Patienten und deren Familien, durch deren Teilnahme diese Studie erst ermöglicht wurde, möchte ich mich herzlich bedanken.

Nicht zuletzt gilt mein außerordentlicher Dank meinen Eltern, die mir dieses Studium ermöglichten, und Michael Volkmann für die unermüdliche, nicht nur computertechnische Unterstützung und den immerwährenden Rückhalt während der letzten Jahre.

7.5 Veröffentlichungen

Originalarbeiten:

Ellen D Renner, Stacey Rylaarsdam, Stephanie Añover-Sombke, Anita L Rack, Janine Reichenbach, John C. Carey, Qili Zhu, Annette F Jansson, Julia Barboza, **Lena F Schimke**, Mark F. Leppert, Melissa M. Getz, Reinhard A Seger, Harry R Hill, Bernd H Belohradsky, Troy R Torgerson, and Hans D Ochs. *Novel STAT3 mutations, reduced TH17 cell numbers, and variably defective STAT3 phosphorylation in Hyper-IgE syndrome*. J Allergy Clin Immunol. 2008 Jul;122(1):181-7.

Lena F Schimke, Julie Sawalle-Belohradsky, Joachim Roesler, Andreas Wollenberg, Anita Rack, Michael Borte, Nikolaus Rieber, Reinhold Cremer, Eberhart Maaß, Roland Dopfer, Janine Reichenbach, Volker Wahn, Manfred Hoenig, Annette F Jansson, Angela Roesen-Wolff, Reinhard Seger, Harry R Hill, Hans D Ochs, Troy R Torgerson, Bernd H Belohradsky and Ellen D Renner. *Diagnostic approach to the hyper-IgE syndromes (HIES): Immunological and clinical key findings to differentiate HIES from atopic dermatitis*. J Allergy Clin Immunol. 2010 Sep;126(3):611-7.

Abstracts und Poster:

Ellen D Renner, Troy R Torgerson, Stacey Rylaarsdam, **Lena F Schimke**, Stephanie Añover- Sombke, Anita L Rack, Janine Reichenbach, Qili Zhu, Annette F Jansson, Julia Barboza, Melissa M. Getz, Julie Sawalle, Michael Borte, Joachim Roesler, Reinhard A Seger, Harry R Hill⁵, Peter Lohse, Bernd H Belohradsky, and Hans D Ochs, *Neue Diagnostikmöglichkeiten beim Hyper-IgE Syndrom: Spektrum von STAT3-Mutationen und reduzierte zirkulierende TH17-Zellen*. DGKJ Jahrestagung, München, Deutschland, 09/2008

Ellen D Renner, Stacey Rylaarsdam, **Lena Schimke**, Stephanie Anover-Sombke, Anita Rack, Qili Zhu, Janine Reichenbach, Julie Sawalle, Michael Borte, Annette Jansson, Joachim Roesler, Volker Wahn, Harry R Hill, Peter Lohse, Troy R Torgerson, Bernd H Belohradsky, and Hans D Ochs, *Defects in STAT3 phosphorylation, reduced TH17 cell numbers, and a high NIH score define the Hyper-IgE syndrome associated with hypomorphic STAT3 mutation*. ESID Biennial meeting, s'Hertogenbosch, Holland, 10/2008

LF Schimke, J Sawalle, A Rack, J Roesler, J Reichenbach, HR Hill, M Borte, E Maass, R Cremer, N Rieber, V Wahn, TR Torgerson, R Seger, P Lohse, HD Ochs, BH Belohradsky, and ED Renner, *Novel mutations and new diagnostic approach in Hyper-IgE syndrome: Revised clinical score combined with quantification of TH17 cell numbers identifies patients with and without STAT3 mutations*. Annual meeting of the API, Ittingen, Schweiz, 05/2009

LF Schimke, J Sawalle, T Kusuma, J Roesler, M Senn, A Langenbeck, A Jansson, A Rack, J Reichenbach, R Seger, V Wahn, M Borte, HR Hill, M Albert, TR Torgerson, HD Ochs, BH Belohradsky, and **ED Renner**, *The Hyper-IgE syndromes: genotype, immunity, and clinical phenotype in 80 patients with eczema and elevated serum IgE*. CIS First North American PID National Conference, Philadelphia, USA, 05/2010

Schimke, Lena, Sawalle-Belohradsky, Julie; Langenbeck, Anne; Wollenberg, Andreas; Kusuma, Theresia; Roesler, Joachim; Senn, Monika; Hagl, Beate; Jansson, Annette; Notheis, Gundula; Reichenbach, Janine; Niehues, Tim; Seger, Reinhard; Wahn, Volker; Borte, Michael; Hill, Harry; Albert, Michael; Torgerson, Troy; Ochs, Hans; Belohradsky, Bernd; Renner, Ellen. *Hyper-IgE Syndrome: PHÄNOTYP, IMMUNOLOGIE UND GENOTYP BEI 80 PATIENTEN MIT EKZEM UND ERHÖHTEM SERUM IGE*. DGKJ-Jahrestagung, Potsdam, Deutschland, 09/2010

Schimke, Lena, Sawalle, Julie, Langenbeck, Anne, Roesler, Joachim, Beate Hagl, Wollenberg, Andreas, Niehues, Tim, Reichenbach, Janine, Seger, Reinhard, Wahn, Volker, Borte, Michael, Hill, Harry, Torgerson, Troy, Ochs, Hans, Belohradsky, Bernd H, Renner, Ellen. *The genetic basis and* Monika; Reichenbach, Janine; Roesler, Joachim; Borte, Michael; Torgerson, Troy; Ochs, Hans; Rothenfusser, Simon; Belohradsky, Bernd H.; Albert, Michael. *DECREASED TH17 CELL COUNTS IN PATIENTS WITH CHRONIC CANDIDA ALBICANS INFECTIONS*. ESID Biennial meeting, Istanbul, Türkei, 10/2010

7.6 Lebenslauf

Persönliche Daten

| | |
|---------------|-------------------------|
| Name | Lena-Friederike Schimke |
| Geburtsdatum | 07.01.1983 |
| Geburtsort | Hannover |
| Nationalität | deutsch |
| Familienstand | ledig |

Schulische Ausbildung

| | |
|-----------|---|
| 1989-1993 | Grundschule, Beckedorf |
| 1993-1995 | Orientierungsstufe, Lindhorst |
| 1995-2002 | Wilhelm-Busch Gymnasium, Stadthagen |
| 1999-2000 | Kootney High School, Harrison, Idaho, USA |
| 2002 | Abitur (Note 1,5) |

Universitäre Ausbildung

| | |
|----------------------|--|
| Okt. 2003 – Mai 2010 | Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München |
| Sept. 2005 | Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note 2,5) |
| April – Mai 2010 | Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note 2,0) |

Praktisches Jahr

| | |
|-----------------------|---|
| Dez. 2008 – März 2009 | Chirurgie, Addington Hospital, Durban, Südafrika |
| April 2009 – Mai 2009 | Innere Medizin, Medizinische Klinik Ziemssenstraße, LMU München |
| Juni 2009 – Juli 2009 | Innere Medizin, Inselspital, Universitätsklinikum Bern, Schweiz |
| Aug. 2009 – Dez. 2009 | Pädiatrie, Dr. von Haunersches Kinderspital, LMU München |

Auslandsaufenthalte

| | |
|-----------------------|--|
| Sept. 2007 – Okt.2007 | Seattle Children's Research Institute for Immunology and Immunotherapy, University of Washington, Seattle, WA, USA |
|-----------------------|--|

Stipendium

| | |
|------|--------------------------------|
| 2010 | ESID Long-Term-Fellowship 2010 |
|------|--------------------------------|

Beruf

| | |
|--------------|---|
| seit 10/2010 | wissenschaftliche Mitarbeiterin im Infektionsimmunologischen Forschungslabor im Dr. von Haunerschen Kinderspital, LMU München |
|--------------|---|