

AUTOSOMAL-REZESSIVES HYPER-IGE-SYNDROM (DOCK8-DEFIZIENZ):
KLINISCHE UND IMMUNOLOGISCHE SCHLÜSSELBEFUNDE



VALERIE HEINZ

AUS DER KINDERKLINIK UND KINDERPOLIKLINIK IM DR. VON HAUNERSCHEN KINDERSPITAL

DIREKTOR: PROF. DR. DR. KLEIN

AUTOSOMAL-REZESSIVES HYPER-IGE-SYNDROM (DOCK8-DEFIZIENZ):
KLINISCHE UND IMMUNOLOGISCHE SCHLÜSSELBEFUNDE

DISSERTATION
ZUM ERWERB DES DOKTORGRADES DER MEDIZIN
AN DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT DER
LUDWIG-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT ZU MÜNCHEN

VORGELEGT VON
VALERIE HEINZ
AUS WIEN

2016

MIT GENEHMIGUNG DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN

BERICHTERSTATTERIN: PD. DR. E. RENNER

MITBERICHTERSTATTER: PROF. DR. SIMON ROTHENFUßER
PROF. DR. LUDGER KLEIN

MITBETREUUNG DURCH DEN
PROMOVIERTEN MITARBEITER:

DEKAN: PROF. DR. MED. DENT. REINHARD HICKEL

TAG DER MÜNDLICHEN PRÜFUNG: 10.11.2016

EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

Heinz, Valerie

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Autosomal-rezessives Hyper-IgE-Syndrom (DOCK8-Defizienz):
Klinische und immunologische Schlüsselbefunde

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 14.März 2016

Ort, Datum

Unterschrift Doktorandin/Doktorand

INHALTSVERZEICHNIS

1. Einleitung und Fragestellung	3
1.1 Hyper-IgE-Syndrome im Kontext der primären Immundefekte	3
1.2 Fragestellung.....	7
2. Patienten und Methoden.....	8
2.1 Patientendaten	8
2.1.1 Patientenakquise, Ein- und Ausschlusskriterien	8
2.1.2 Untersuchungsablauf	10
2.2 Molekulargenetische Diagnostik	12
2.2.1 gDNA.....	12
2.2.2 cDNA.....	13
2.2.3 Gelelektrophorese, DNA Aufreinigung, Sequenzierung.....	15
2.2.4 Westernblot.....	18
2.3 Immunologische Untersuchungen und klinische Chemie	19
2.3.1 Quantitative Lymphozytendiagnostik	19
2.3.2 Qualitative Lymphozytendiagnostik	21
2.3.3 Granulozytenfunktionsuntersuchung	22
2.4 Statistische Methoden	23
3. Ergebnisse	24
3.1 Mutationsanalyse	24
3.2 Darstellung und Erörterung des klinischen Phänotyps	29
3.4.1 Klinik DOCK8-HIES-Patienten	29
3.4.2 Klinik DOCK8-Wildtyp-Patienten	36
3.4.3 Vergleich Klinik DOCK8-HIES-Patienten vs. DOCK8-Wildtyp-Patienten.....	41
3.5 Laborchemische Definition eines immunologischen Phänotyps.....	42
3.5.1 Immunologische Ergebnisse	42
3.5.2 Klinische Chemie	56
4. Diskussion	57
4.1 Mutationsanalyse	57
4.2 Klinik.....	60
4.3 Immunologie.....	73
5. Zusammenfassung	80
6. Literaturverzeichnis	82
7. Anhang	89
7.1 Abkürzungsverzeichnis	89
7.2 Abbildungsverzeichnis	91
7.3 Tabellenverzeichnis	91
7.3.1. Reagenzien	92
7.3.2 Primer	93
7.4 Danksagung.....	95
7.5 Veröffentlichungen	96

1. EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG

1.1 Hyper-IgE-Syndrome im Kontext der primären Immundefekte

Hyper-IgE-Syndrome (HIES) werden den „primären Immundefekten „(PID)“ zugeordnet [1, 2]. „Primär“ beschreibt die Tatsache, dass es sich hierbei um angeborene und somit um vererbte Erkrankungen handelt. Bei „Immundefekten“ wird von einer Krankheitsentität gesprochen, die mit einer Fehlfunktion der körpereigenen Abwehr einhergeht. Die Gruppe der PIDs beinhaltet eine stetig wachsende Zahl (momentan mindestens 176) eigenständige Krankheitsbilder, welche aus einer fehlerhaften Entwicklung des Immunsystems, dessen Funktion oder beidem hervorgehen [1, 2]. Die daraus resultierende Immunschwäche führt bei den betroffenen Patienten zu einer Prädisposition für hartnäckige Infektionen, die durch Standardtherapieverfahren oftmals nur schwer zu behandeln sind. PID können isoliert oder in Kombination als Syndrom auftreten sowie ursächlich für Autoimmunerkrankungen oder Neoplasien sein [3]. Primäre Immundefekte stellen eine heterogene Gruppe von Krankheitsbildern dar und lassen sich acht Subgruppen zuteilen: kombinierten Immundefekten, gut definierten Syndromen mit Immundefizienz, Antikörper Defizienzen, Erkrankungen mit Immundysregulation, kongenitalen Phagozytendefekten, Defekten des angeborenen Immunsystems, autoentzündlichen Funktionsstörungen und Erkrankungen des Komplementsystems [1]. Die Zahl an neu erkannten und definierten PIDs hat in den letzten 20 Jahren deutlich zugenommen [2, 4-7]. Das Zusammenspiel aus Fortschritten in der molekulargenetischen Diagnostik und das immer besser werdende Verständnis für die Signaltransduktion eröffnen kontinuierlich mehr Möglichkeiten zugrundeliegende Pathomechanismen verstehen und nachvollziehen zu können.

Hyper-IgE-Syndrome stellen eine heterogene Gruppe von Krankheitsbildern dar, die die Wissenschaft seit Mitte der 60er Jahre immer wieder vor neue Herausforderungen stellt. Erstbeschrieben wurde das klassische HIES 1966 in Anlehnung an die biblische Figur Hiob („So schlug Satan Hiob mit Geschwüren vom Scheitel seines Kopfes bis zu den Sohlen seiner Füße“ Hiob 2,7) als Hiob-Syndrom (Job's Syndrome) [8].

1972 wurde, aufgrund einer Assoziation mit erhöhtem Serum IgE, der Begriff „Hyper-IgE-Syndrom“ (HIES) geprägt [9]. Charakteristisch für alle HIES-Entitäten ist das Auftreten eines Ekzems, erhöhtes Serum IgE sowie rezidivierende Haut- und Atemwegsinfektionen [10].

Es wird eine autosomal-dominante Form (AD-HIES) von einer autosomal-rezessiven Form des HIES (AR-HIES) unterschieden. Neben Mutationen im *DOCK8-Gen* zählen Mutationen im Tyrosin-Kinase-2-(*TYK2*)-Gen wie auch die erst kürzlich beschriebenen Gendefekte im Phosphoglucomutase-3-(*PGM3*)-Gen zur autosomal rezessiven Gruppe der HIES [11-13].

Die verschiedenen HIES-Formen lassen sich einerseits durch die ihnen zu Grunde liegenden Gendefekte, andererseits durch charakteristische klinische Symptome und immunologische Parameter unterscheiden.

Die genetische Ursache des AD-HIES blieb lange ungeklärt, diagnostiziert wurde es daher zunächst nur anhand des klinischen Erscheinungsbildes sowie immunologischer Parameter und unter Ausschluss anderer Immundefekte [14-16]. Pneumatozelen als Folge von Pneumonien, skelettale Symptome wie Skoliose, Überstreckbarkeit der Gelenke und erhöhte Knochenbrüchigkeit sind neben einer Verminderung der T_H17 -Zellzahl kennzeichnend für das AD-HIES [17, 18]. Bereits früh hielten verschiedene Forschungsgruppen eine genetische Komponente auf chromosomaler Ebene für wahrscheinlich [14-16]. Grimbacher et al. vermuteten 1999, dass es sich hierbei um einen autosomal-dominanten Erbgang handeln könnte [19].

2004 gelang es eine HIES-Variante zu identifizieren, die sich einem autosomal rezessiven Vererbungsmuster zuordnen ließ [20]. Es wurden 13 Patienten von sechs konsanguinen Familien beschrieben, die die gleichen rezidivierenden Hautabszesse und Atemwegsinfektionen sowie ein erhöhtes Serum-IgE aufwiesen wie Patienten mit einem AD-HIES. Es fehlten ihnen jedoch entscheidende klinische Merkmale, wie skelettale und das Bindegewebe betreffende Symptome, zur Diagnosestellung eines „klassischen“ HIES. Aufgefallen im Rahmen dieser Studie waren hingegen rezidivierende Virusinfektionen, häufig hervorgerufen durch HHV (Humanes Herpes Virus) und Molluscum contagiosum. Ein schweres, meist von Geburt an bestehendes Ekzem, deutlich höhere Eosinophilenzellzahlen sowie eine Mitbeteiligung des zentralen Nervensystems waren weitere Indizien dafür, dass es sich hierbei um eine Variante der HIES handeln könnte [19, 20].

2006 gelang der erste Durchbruch in molekulargenetischer Hinsicht, als eine homozygote Mutation in *TYK2* – einer zur JAK-Familie gehörenden Tyrosin-Kinase – identifiziert und mit dem AR-HIES assoziiert wurde [11]. Weitere Studien konnten jedoch den Verdacht, dass Mutationen im *TYK2*-Gen ein AR-HIES hervorrufen, nicht bestätigen [21-23].

Der klinische Phänotyp des für die *TYK2*-Mutation beschriebenen Patienten entsprach demnach eher einer Variante des AR-HIES, lenkte jedoch die Aufmerksamkeit der Wissenschaft in Richtung der JAK/STAT-Signalwege als möglichen Ursprungsort für Hyper-IgE Syndrome. Weitere Analysen konnten 2007 schließlich dominant- negative Mutationen im „Signal Transducer and Activator of Transcription 3“ (*STAT3*)-Gen nachweisen [23-25]. *STAT3*-Mutationen wurden in den darauf folgenden Jahren als häufigste Ursache für das autosomal-dominante HIES beschrieben [18, 26].

Mittels „Next Generation Sequencing“ (NGS) war es 2009 schließlich möglich den vermutlich häufigsten Gendefekt als Ursache für die „klassische Form“ des autosomal-rezessiven HIES ausfindig zu machen: Mutationen im „dedicator of cytokinesis 8“ (*DOCK8*)-Gen [27, 28].

Das menschliche *DOCK8*-Gen, abhängig von der Isoform, bestehend aus 46-48 Exons, befindet sich auf Chromosom 9p24.3 und erstreckt sich über ca. 250 kb. *DOCK8* gehört neben elf weiteren Mitgliedern der DOCK180 „Proteinfamilie“ an. Es besitzt wie auch die anderen dieser Familie zugehörigen Proteine, zwei charakteristische Domänen: Dock Homology Region 1 (DHR 1) und DHR 2. DHR 1 wird zur Interaktion mit Zellmembranen benötigt, DHR 2 bindet an zur Rac-Rho-Familie gehörige GTPasen und dient diesen als Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor (GEF) [29, 30]. Dass *DOCK8* bzw. ein dysfunktionales *DOCK8* Protein essentielle Auswirkungen auf das Immunsystem hat, wurde anhand von Mausmodellen getestet und im Verlauf klinischer Studien bestätigt [31-34].

Die biologische Funktion von DOCK8 besteht in der Regulation von Zellmigration, -morphologie, -adhäsion und -wachstum [29, 30]. Die Verknüpfung einzelner Bestandteile der immunologischen Abwehr scheint durch ein dysfunktionales DOCK8-Protein beeinträchtigt zu sein. Dies führt zu einer reduzierten NK-Zell-Zytotoxizität auf Grund einer fehlerhaften Synapsenausbildung [35] sowie zu einem Mangel an T- und B-Gedächtniszellen [31]. Klinisch resultiert hieraus eine insuffiziente Abwehr gegenüber viralen, bakteriellen wie auch fungalen Erregern. Die Anfälligkeit für virale Infektionen bei DOCK8-HIES wird u.a. mit einem unzureichenden Verbleib von dendritischen Zellen im Lymphknotenparenchym und dem daraus resultierenden fehlerhaften T-Zell-Priming erklärt [36]. Zusätzlich wurde festgestellt, dass DOCK8 in B-Zellen über den Toll-like-Receptor (TLR) 9 eine STAT3-abhängige Proliferation und Differenzierung ermöglicht und dass diese Funktion bei DOCK8-defizienten B-Zellen fehlerhaft ist [37].

Für den Kliniker steht jedoch das klinische Erscheinungsbild sowie dessen unterschiedlichen Formen und Ausprägungsgrade im Vordergrund. Noch bevor man sich auf weitreichende diagnostische Maßnahmen konzentriert, ist es wichtig HIES von anderen, weitaus häufigeren Erkrankungen, wie beispielsweise einer stark ausgeprägten atopischen Dermatitis abzugrenzen. Auch andere PIDs, deren Symptome sich mit denen der HIES überschneiden können, sollten differentialdiagnostisch in Betracht gezogen werden. Beispiele hierfür sind das Wiskott-Aldrich-Syndrom (WAS), das Omenn-Syndrom sowie das „Immundysregulation polyendokrinopathy enteropathy X linked (IPEX)-Syndrom“ [38-40]. Bei all diesen kommt es, wie bei der HIES-Gruppe, zum Auftreten eines Ekzems in Kombination mit erhöhtem Serum IgE. Im klinischen Alltag ein Hyper-IgE-Syndrom zu erkennen, es einer Subform der HIES-Gruppe zuzuordnen und von anderen Erkrankungen abzugrenzen, stellt sich diese Arbeit zur Aufgabe.

1.2 Fragestellung

Nachdem 2009 Mutationen im *DOCK8*-Gen als Ursache für die 2004 klinisch beschriebene AR-HIES-Form entdeckt wurden, stellt sich die Frage, welche funktionellen Auswirkungen ein verändertes bzw. ein komplett fehlendes DOCK8-Protein mit sich bringt. In welcher Ausprägung sich eine DOCK8-Defizienz in klinischer und immunologischer Sicht präsentieren kann, soll diese Arbeit veranschaulichen.

Ziel ist es daher:

- auf klinischer und immunologischer Ebene Aspekte zu definieren, die an ein DOCK8-HIES denken lassen sollten und helfen dieses von Krankheiten mit ähnlichem klinischen und immunologischen Phänotyp abzugrenzen,
- einen möglichen Algorithmus für die Diagnosestellung zu finden und
- therapeutische Möglichkeiten aufzuzeigen.

2. PATIENTEN UND METHODEN

2.1 Patientendaten

2.1.1 Patientenakquise, Ein- und Ausschlusskriterien

Mit Hilfe der Datenbank des Infektionsimmunologischen Diagnostiklabors am Dr. von Haunerschen Kinderspital der Ludwig-Maximilians-Universität wurden Patienten mit Verdacht auf DOCK8-HIES ausgewählt. Ermittelt wurden diese anhand der Suchbegriffe: chronisches Ekzem, erhöhtes Serum-IgE oder Bluteosinophilie. Patienten mit dieser Trias und ggf. in Kombination mit rezidivierenden Herpes-Simplex- und Molluscum-contagiosum-Infektionen, Symptomen des atopischen Formenkreises und rezidivierenden Atemwegsinfektionen wurden ebenso in die Analyse der Datenbank mit einbezogen. Gleichmaßen wurden Patienten, die einen Minderwuchs aufwiesen, sich mit einer T-Zell Defizienz unklarer Genese präsentierten, oder Patienten der Kategorie „unklarer Immundefekt“ berücksichtigt. Patienten aus dieser Datenbank, für die eine molekulardiagnostisch gesicherte Diagnose vorlag, wurden ausgeschlossen.

Die Datenbank umfasste im Jahre 2010 15.913 Patienten, welche seit 1980 im Immunologischen Diagnostiklabor untersucht wurden. Mit der oben beschriebenen Stichwortsuche entstand schließlich eine Liste bestehend aus 155 Patienten, bei denen es zielführend erschien ihre klinischen und immunologischen Akten genauer einzusehen und darauf folgend zusätzliche diagnostische Maßnahmen durchzuführen (Abbildung 1).

Des Weiteren wurden Patienten mit Verdacht auf DOCK8-HIES ohne Hinweis auf einen anderen molekulargenetischen Immundefekt per Zuweisung von auswärtigen Kliniken und Kinderarztpraxen aus Deutschland, Österreich, der Schweiz und Italien im Zeitraum von September 2010 bis Juni 2011 in die Studie aufgenommen. 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.

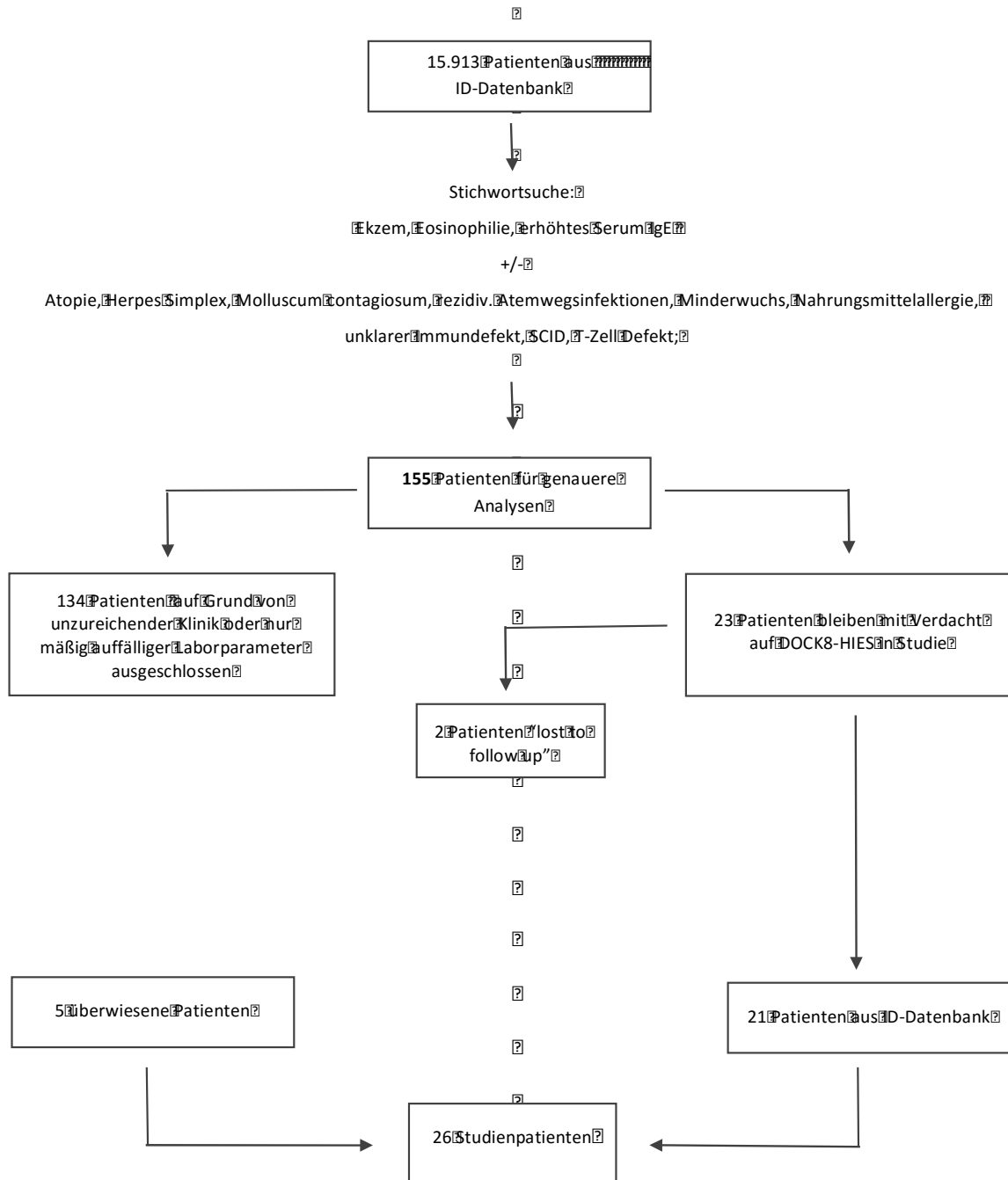


Abbildung 1: Darstellung Patientenakquise
 Ermittelt aus der Immundefekt (ID)-Datenbank des Dr. von Haunerschen Kinderspitals München.

2.1.2 Untersuchungsablauf

Das Aktenstudium der 155 Patienten, die im Zuge der Datenbankanalyse als potenzielle DOCK8-HIES-Kandidaten eingestuft wurden, ergab, dass bei 134 Patienten der Verdacht auf ein DOCK8-HIES aufgrund unzureichender klinischer Symptomatik oder nur mäßig veränderter laborchemisch ermittelter Werte nicht erhärtet werden konnte. Diese 134 Patienten wurden somit ausgeschlossen. Bei 23 Patienten blieb der Verdacht auf DOCK8-HIES bestehen, wovon zwei Patienten „lost to follow up“ waren. Zusätzlich wurden fünf weitere an das Haunersche Kinderspital überwiesene Patienten, welche die Einschlusskriterien erfüllten, mit in die Studie aufgenommen.

Es konnte schließlich eine Gruppe von 26 Patienten (21 anhand der ID-Datenbank ermittelt, 5 überwiesen aus Deutschland, Österreich, Italien und der Schweiz) herangezogen werden, darunter 13 männliche und 13 weibliche Patienten mit einem Durchschnittsalter von 14,11 Jahren (Altersspanne: 3-47 Jahre). Die Patienten und deren betreuende Ärzte wurden telefonisch, auf dem Postweg oder per E-Mail kontaktiert und der Ablauf sowie Zielsetzung der Studie erklärt. Vor Einschluss in die Studie wurde eine schriftliche Einverständniserklärung von den Patienten bzw. deren Erziehungsberechtigten bei positivem Votum der Ethikkommission eingeholt. Eine klinische Untersuchung im Rahmen der Studie fand bei der Mehrzahl der Patienten an der Haunerschen Kinderklinik statt.

Für jeden Patienten wurde zusätzlich der so genannte „NIH-Score“ (Abbildung 2) erhoben [41, 42]. Der NIH-Score fasst alle charakteristischen Symptome und Laborwerte der Hyper-IgE-Syndrome in einem Punktwert zusammen, bezieht sich jedoch vor allem auf das autosomal dominante HIES und diente in unserer Studie daher primär zur Orientierung. Per definitionem gilt ein Punktwert von ≥ 40 als sehr wahrscheinlich für ein HIES, bei Patienten mit Werten zwischen 20 und 40 Punkten besteht ein Verdacht auf HIES [42]. Die molekulargenetischen und immunologischen Untersuchungen erfolgten im infektionsimmunologischen Forschungslabor des Dr. von Haunerschen Kinderspitals.

NAME: _____ geb.: _____ Geschlecht: M W

Score erhoben am: _____

geb.: _____

Klinische Symptome	Punktwertung ¹										Punktzahl	
	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					Bronchiektasen			Pneumatozyten			
Zurückgehaltene 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/ml)	<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 Erfkrankung:							
Infektion mit tödlichem Ausgang	nein				vorhanden							
Gelenküberstreckbarkeit	nein				vorhanden							
Lymphom	nein				vorhanden							
Nasenbreite ³ (Nasenflügelabstand) Messwert: _____ mm	<1 SD	1-2 SD		>2 SD								
Hohler Gaumen	nein		vorhanden									
Alterskorrektur (zusätzliche Punkte bei jungem Alter)	> 5 Jahre			2-5 Jahre		1-2 Jahre				< 1 Jahr		
Originalabszesse (z.B. Lymphknoten ⁴ , Leber ⁵ , 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):											Momentane Interpretation: > 40 Pkt.: HIES 20-40 Pkt.: V.a. HIES < 20 Pkt.: kein HIES	Gesamtpunktzahl:

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

Abbildung 2: Hyper-IgE-Syndrom-Scoringssystem

2.2 Molekulargenetische Diagnostik

2.2.1 gDNA

Genomische DNA (gDNA) wurde aus EDTA oder Natrium-Heparin antikoaguliertem Blut unter Verwendung „QiaAmp DNA Blood Mini Kit“ (Qiagen, Heidelberg, Deutschland) isoliert. Aus jeweils 200 µl Blut wurde gemäß Herstellerangaben genomische DNA isoliert und die gDNA-Konzentration photometrisch bestimmt.

Polymerase-Kettenreaktion („polymerase chain reaction“, PCR)

Für die Polymerase-Kettenreaktion wurde das Quiagen HotStarTaq Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland) verwendet. Mittels der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurden die für *DOCK8* kodierenden DNA Abschnitte inklusive der Intron-Exon-Bereiche vervielfältigt [43].

Klassischerweise läuft die PCR in drei sich wiederholenden Schritten ab:

1. Denaturierung: Auftrennung der DNA in Einzelstränge
2. Hybridisation der Primer: Bindung der Primer an DNA Einzelstränge
3. Elongation: Mit Hilfe der DNA Polymerase erfolgt die Synthese von zum Einzelstrang komplementären DNA-Sequenzen und somit die Vervielfältigung des ursprünglich eingesetzten Materials [44, 45].

Für die Amplifikation von *DOCK8* wurde nach folgendem PCR-Protokoll für jedes Exon mit Intron-Exon-Bereich eine Gesamtlösung von 25,125 µl in ein 0,5 ml Eppendorf-Röhrchen pipettiert:

Puffer	2,5 µl
dNTPs	2,5 µl
Taq Polymerase	0,125 µl
H ₂ O	16 µl
Primer Forward 20 µM	0,5 µl
Primer Reverse 20 µM	0,5 µl
gDNA	3,0 µl
<hr/>	
Gesamtlösung	25,125 µl

Bei einer gDNA Konzentration von unter 10 µg/µl wurde für jede Probe die doppelte Menge gDNA eingesetzt, das Gesamtvolumen durch Einsatz von entsprechend weniger Wasser jedoch konstant gehalten.

Die PCR wurde im Cycler vom Typ Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler, Applied Biosystems, USA, durchgeführt und durchlief die Reaktionsschritte, wie folgt:

Programm für Exon 1-45, 47, 48:

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

Programm für Exon 46:

	Temperatur	Zeit	Zyklen
Denaturierung	95 °C	10 min	
Denaturierung	95 °C	20 sec] 40
Hybridisation/Annealing	57 °C	20 sec	
Synthese/Elongation	72 °C	30 sec	
Elongation	72 °C	40 min	
	8 °C	forever	

2.2.2 cDNA

Zusätzlich wurde im Verlauf der Studie die PCR mit complimentary DNA (cDNA) für die *DOCK8*-Sequenzierung etabliert [46]. Das Prinzip dieser Methode basiert darauf, dass messenger RNA (mRNA) in complimentary DNA (cDNA) mit Hilfe einer Reversen Transkriptase (RT) umgeschrieben und diese dann als Template für die PCR herangezogen wird.

Nach RNA-Extraktion folgte die cDNA-Synthese unter Verwendung des Qiagen Long Range 2Step RT-PCR Kit (Nr. 205920) nach Herstellerangaben (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland). Hierfür wurde nach folgendem Protokoll pipettiert:

Long Range RT-Buffer 5x	4 µl
dNTPs	2 µl
Long Range RNase Inhibitor	0,22 µl
Long Range Reverse Transcriptase	1 µl
RNA	11,8 µl
Oligo dT Primer	1 µl
<hr/>	
Gesamtlösung	20,02 µl

Die Gesamtlösung wurde für insgesamt 95 Minuten (90 min bei 42 °C, 5 min bei 85 °C) inkubiert. Die eigentliche PCR erfolgte nun nach folgendem Protokoll:

Long Range RT-Buffer 10x	5 µl
dNTPs	2,5 µl
Enzyme Mix	0,4 µl
RNase free water	35,1 µl
Primer DOCK8 1cF/FcF	1 µl
Primer DOCK8 4HcR/4acR	1 µl
cDNA	5 µl
<hr/>	
Gesamtlösung	50 µl

Die PCR der cDNA wurde im Cycler vom Typ Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler, Applied Biosystems, USA, durchgeführt und durchlief die Reaktionsschritte, wie folgt:

DNA Abschnitt	Primer DOCK8 1cF/HcR			Primer DOCK8 FcF/4ac		
	Temperatur	Zeit	Zyklen	Temperatur	Zeit	Zyklen
Denaturierung	93 °C	3 min] 35	93 °C	3 min] 35
Denaturierung	93 °C	15 sec				
Hybridisation/Annealing	60,5 °C	30 sec				
Synthese/Elongation	68 °C	4,5 min				
Elongation	4 °C	forever				

Eine Übersicht über die für gDNA und cDNA verwendeten Primer findet sich in den Tabellen 18 und 19 im Anhang.

2.2.3 Gelelektrophorese, DNA Aufreinigung, Sequenzierung

Um die synthetisierten PCR-Produkte nachzuweisen, wurden sie mittels Gelelektrophorese separiert. Hierfür wurden zuerst 200 ml eines 1,5%igen Agarosegels mit 4 µl GelRED (Biotium, Hayward, USA) hergestellt. Anschließend wurden je 10 µl der DNA-Amplifikate mit

2 µl Ladepuffer versetzt und anschließend in die Geltaschen pipettiert. Durch Anlegen einer Spannung von 130 V und einer Stromstärke von 80 mA für 90 Minuten wurden die DNA-Fragmente entsprechend ihrer Basenpaargröße aufgetrennt. Die Darstellung der DNA-Banden erfolgte mittels UV-Licht und Kamera (Abbildung 3). Die Größenbestimmung erfolgte durch einen Größenmarker [Gene Ruler™ DNA Ladder mix (Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) 0,5 µg/µl, 50 µg].

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

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

Agarosegel 1,5 %: 3,0 g Agarose auf 200 ml TBE-Puffer.

Agarosegel 1,0 %: 2,0 g Agarose auf 200 ml TBE-Puffer.

Die PCR Produkte wurden mittels Exo SAP-IT (usb, Staufen, Deutschland) aufgereinigt. Dazu wurden zu 10 µl PCR Produkt je 0,5 µl Exo SAP-IT zugegeben und nach folgendem Schema inkubiert:

Temperatur	Zeit	Zyklen
37 °C	15 min	
80 °C	15 min	
8 °C	∞	

Ziel der DNA-Sequenzierung ist es die Nukleotid-Abfolgen eines DNA-Abschnittes darzustellen, um somit eventuell vorhandene Mutationen zu detektieren. Dies erfolgte für den *DOCK8* kodierenden Abschnitt des menschlichen Genoms anhand der Kettenabbruchmethode von Sanger et al. und anschließender Kapillarelektrophorese [47]. Die Sequenzierreaktion erfolgte durch den Sequencing Service, LMU Biozentrum, Großhaderner Str. 2-4, 82152 Martinsried.

Für gDNA wurden die Exons in eine Richtung, entsprechend entweder der Vorwärts (Exon 1-19, 20-23, 25-45, 48) oder der Rückwärtsstrang (Exons 19, 24, 37, 46) sequenziert und in

separaten Reaktionsgefäßen angesetzt. Für Primerpaare, die für mehrere Exons synthetisiert wurden, erfolgte eine Sequenzierung sowohl für den Vorwärts- als auch den Rückwärtsstrang. Bei unregelmäßiger Sequenzabfolge sowie zur Verifizierung von Mutationen wurde ebenso immer in beide Richtungen sequenziert.

Zur Mutationsanalyse wurden die erhaltenen DNA-Sequenzen mit der DOCK8-Wildtypsequenz [48] verglichen.

Alle Angaben hinsichtlich der Mutationsanalyse dieser Arbeit beziehen sich auf das 2006 publizierte DOCK8-Transkript [49, 50].

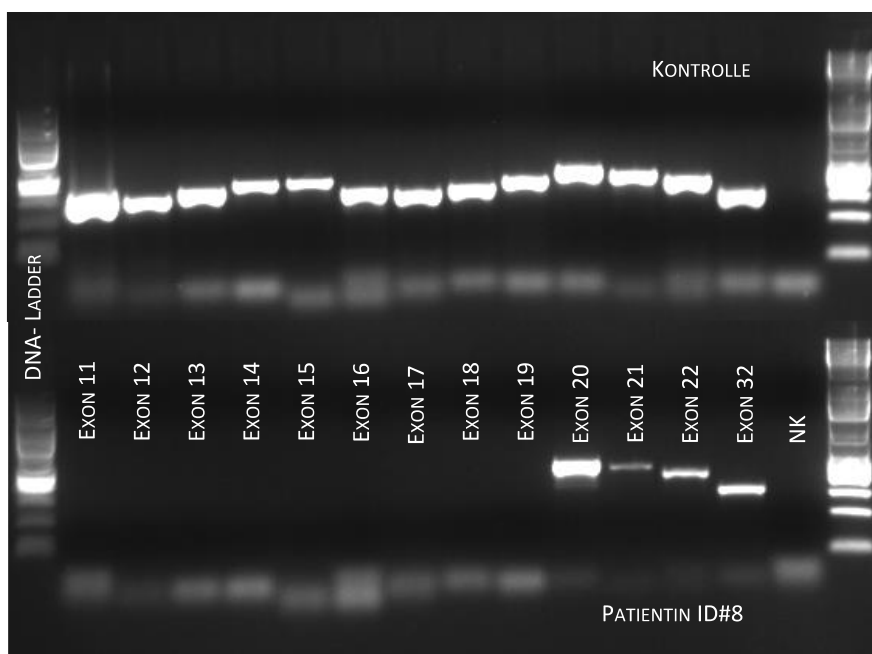


Abbildung 3: Gelelektrophorese

Die hier dargestellte Gelelektrophorese von Patientin ID #8 zeigt deutlich, dass Exon 11-18 fehlen und erst Exon 20 wieder nachzuweisen war. NK = Negativkontrolle;

2.2.4 Westernblot

Zum Nachweis, ob die Fähigkeit zur DOCK8 Proteinsynthese bei Patienten mit einer DOCK8-Mutation erhalten bleibt, wurde für einige DOCK8-HIES Patienten eine Westernblot Analyse durchgeführt. Zur Vorbereitung wurde hierfür mittels SDS-PAGE das aus PBMCs gewonnene Proteingemisch entsprechend den unterschiedlichen Proteingrößen in einem 3-8 % Tris Acetat Gel aufgetrennt.

Die aufgetrennten Proteine wurden nun mit Hilfe eines elektrischen Feldes auf eine Nitrocellulose-Membran (Nitrocellulose Membrane, 0,45 µm Pore Size, Invitrogen, Carlsbad, USA) übertragen und fixiert. Im nächsten Schritt erfolgte die Anfärbung der DOCK8-Proteine mittels spezifischer DOCK8-Antikörper. Hierfür wurden zuerst die freien Bindungsstellen der Nitrocellulosemembran mit einer 5%igen Milchpulverlösung für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte die Anfärbung der DOCK8-Proteine mittels anti-DOCK8-Antikörper (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) über Nacht bei 4 °C. Nach dreimaligem Waschen der Membran mit TBST am folgenden Tag wurde diese mit einem goat-anti-rabbit HRP (horseradish peroxidase) und einem Sekundärantikörper (Thermo Scientific, Rockford, USA) in 10%iger Milch für eine Stunde bei Raumtemperatur geschwenkt. Überschüssige Antikörper wurden mit Hilfe eines erneuten Waschvorgangs entfernt. Durch Inkubation der Membran in dem Chemolumineszenz-Reagenz West-Femto Super Signal (Thermo Scientific, Rockford, USA) konnte nun in einer Dunkelkammer ein Film belichtet und dadurch das Protein sichtbar gemacht werden. Es folgte eine zweite Färbung desselben Blots mit einem Anti-beta-Aktin-Antikörper (Cellsignaling Technology, Danvers, USA) um ein fehlerfreies Blot zu garantieren und die Bestimmung der relativen Menge zu ermöglichen.

2.3 Immunologische Untersuchungen und klinische Chemie

Blutbild und Differentialblutbild, sowie Immunglobulinkonzentrationen und Antinukleäre Antikörper (ANA) im Serum wurden im Routinelabor der klinischen Chemie der LMU bestimmt. Zusätzlich wurden Werte aus anderen Kliniken herangezogen.

Die Bestimmung der IgG Subklassenkonzentrationen sowie der spezifischen Impfantikörper gegen *Haemophilus influenzae*, Pneumokokken, Diphtherie und Tetanus erfolgte unter Verwendung von Kits der Firma The Binding Site, Birmingham, UK gemäß Herstellerangaben. IGF-1 und BP-3 wurden im endokrinologischen Labor des Dr. von Haunerschen Kinderspitals bestimmt.

Hinsichtlich der immunologischen Forschungsdiagnostik wurden parallel zu den Messungen an Patienten Werte gesunder Probanden bestimmt, um die Funktionalität des Tests bzw. der Messung sicherzustellen.

2.3.1 Quantitative Lymphozytendiagnostik

Die Lymphozyten wurden aus Vollblut oder PBMCs (peripheral blood mononuclear cells) isoliert. Die Isolation der PBMCs erfolgte aus Natrium-Heparinblut unter Verwendung von Ficoll-Paque Plus (Biochrom AG, Berlin, Deutschland). Mit Hilfe ihrer Oberflächenmerkmale, den sogenannten cluster of differentiation (CD), wurden die Lymphozyten wie folgt differenziert:

Zellen	CD-Klassifikation
Gesamt T-Zellen	CD3 ⁺
T-Helfer Zellen	CD3 ⁺ CD4 ⁺
Zytotoxische T-Zellen	CD3 ⁺ CD8 ⁺
Gesamt B-Zellen	CD19 ⁺
Memory-B-Zellen	CD19 ⁺ CD27 ⁺
Natürliche Killer-Zellen	CD16 ⁺ CD56 ⁺
Aktivierte Lymphozyten	HLA-DR ⁺
Aktivierte T-Zellen	CD3 ⁺ HLA-DR ⁺

Tabelle 1: Lymphozytensubpopulationen nach CD-Klassifikation

Die Bestimmung der Lymphozyten-Subgruppen erfolgte nach etablierten Protokollen des Infektionsimmunologischen Diagnostik- und Forschungslabors des Dr. von Haunerschen

Kinderspitäler an einem BD FACS Calibur (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Die Messungen wurden mit Hilfe der BD Cellquest™ Pro Software (BD Biosciences) ausgewertet. Absolutzellangaben beruhen auf der Berechnung parallel bestimmter absoluter Lymphozytenzellzahl des Patienten multipliziert mit dem Prozentsatz an positiv CD-klassifizierten Zellen.

2.3.1.2 STAT3-Phosphorylierung

Zur Überprüfung der STAT3-Phosphorylierung wurden PBMCs von DOCK8-HIES-Patienten und Kontrollen für 20 Minuten mit rekombinantem humanem Interleukin-6 und Interleukin-10 stimuliert und nach etabliertem Protokoll phosphoryliertes – und damit aktiviertes – STAT3 gemessen [51].

Hierzu wurden die PBMCs nach Stimulation mit BD Phosflow Perm Buffer III (BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland) permeabilisiert und nach wiederholtem Waschen pSTAT3 Antikörper (BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland) zugegeben und für 30 min auf Eis gestellt. Abschließend erfolgte die durchflusszytometrische Analyse.

2.3.1.3 Recent Thymic Emigrants

Zum Ausschluss einer möglichen Thymusdefizienz als Ursache für die T-Lymphopenie erfolgte die Bestimmung von Recent Thymic Emigrants. Naive CD31⁺-T-Zellen gelten als Marker für naive mit TRECs beladene T-Zellen, die erst kürzlich den Thymus verlassen haben und noch Antigen-unerfahren sind, sogenannte Recent thymic emigrants (RTE) [52]. Mittels Oberflächenfärbung wurde der Prozentsatz an CD31⁺CD45RA⁺CD4⁺ der CD3⁺-Zellen von Patienten und Tageskontrollen bestimmt. Hierfür verwendete Reagenzien und Antikörper finden sich in Tabelle 17. Die Normwerte wurden von Mayo Medical Laboratories übernommen [53].

Normwerte:

Alter	CD4 ⁺ RTE [%] weiblich	CD4 ⁺ RTE [Zellen/μl] weiblich	CD4 ⁺ RTE [%] männlich	CD4 ⁺ RTE [Zellen/μl] männlich
1 Monat–17 Jahre	25,8–68	170–1007	19,4–60,9	50–926
18 Jahre–25 Jahre	6,4–51	42–832	6,4–51	42–399
26 Jahre–55 Jahre	6,4–41,7	42–832	6,4–41,7	42–399
> oder = 56 Jahre	6,4–27,7	42–832	6,4–27,7	42–399

2.3.1.4 FOXP3-positive-T-Zellen

Untersuchungen hinsichtlich regulatorischer T-Zellen erfolgten über die Bestimmung von CD4⁺-CD25⁺-T-Zellen, die den Transkriptionsfaktor FOXP3 exprimieren. Hierzu verwendete Reagenzien und Antikörper finden sich in Tabelle 17.

Isolierte PBMCs wurden mittels etablierter nukleärer Färbung von FOXP3, sowie der Oberflächenmarker CD4 und CD25 markiert und durchflusszytometrisch der prozentuale Anteil von CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺-T-Zellen der CD4⁺-T-Zellen gemessen [54]. Mehr als 1% CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺-T-Zellen der CD4⁺-T-Zellen wurden als Normwert definiert [55].

2.3.1.5 T_H17-Zellen

Quantitative Bestimmung der T_H17-Zellen erfolgte durch Anfärbung von Interleukin-17 produzierenden CD4⁺-T-Zellen nach etabliertem Protokoll [18, 51, 54].

Hierzu wurden jeweils 3 x 10⁶ PBMCs eines Patienten und einer gesunden Kontrolle unter Hinzugabe von GolgiPug (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) sowohl unstimuliert als auch in einem weiteren Ansatz mit Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) und Inomycin (beide e Bioscience, San Diego, CA, USA) stimuliert bei 37 °C über Nacht inkubiert.

Am folgenden Tag wurden die Zellen mit einem spezifischen Antikörpermix (Permash-Puffer + Anti-17A oder Anti IFN γ + Anti CD4) permeabilisiert und markiert, um danach die durchflusszytometrische Messung vornehmen zu können. Es wurde der Prozentsatz an IL17⁺IFN γ ⁺CD4⁺-T-Zellen bestimmt. Der Normwert liegt bei > 0,2 % der CD4⁺-Zellen.

2.3.1.6 Perforin/Granzyme B

Unter Verwendung des BD Cytofix/Cytoperm Kit (BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland) wurden isolierte PBMCs permeabilisiert und mit Anti-Perforin-Antikörpern, Anti-Granzyme B-Antikörpern sowie dem Oberflächenmarker CD8 markiert und durchflusszytometrisch der Prozentsatz an Perforin⁺Granzyme B⁺CD8⁺-T-Zellen bestimmt.

2.3.2 Qualitative Lymphozytendiagnostik

2.3.2.1 Lymphozytenproliferation

Untersuchungen zur Lymphozytenproliferation wurden anhand von etablierten Protokollen im Infektionsimmunologischen Labor des Dr. von Haunerschen Kinderspitals durchgeführt [56]. Hierzu wurden zunächst PBMCs (peripheral blood mononuclear cells) aus frischem

Natrium-Heparinblut unter Verwendung von Ficoll-Paque Plus (Biochrom AG, Berlin, Deutschland) nach Vorgaben des Herstellers isoliert.

In eine Mikrotiterplatte wurden nun eine Lymphozytensuspension, entsprechend 1×10^5 Zellen und verschiedene Stimulanzen (PHA = Phytohämagglutinin, OKT3 = Anti-CD3⁺ Antikörper, ConA = Concavalin, PWM = Pokeweed, SAC = Staphylokokkus Aureus Cowan I) pipettiert, gemischt sowie für drei Tage bei 37 °C im CO₂-Brutschrank (5 % CO₂) inkubiert.

Für die Antigenstimulation wurde ein Mischantigen bestehend aus Tetanus-Toxoid-Antigen und Diphtherie-Toxoid-Antigen hergestellt, der Lymphozytensuspension zugegeben und für sieben Tage bei 37 °C im Brutschrank (5 % CO₂) inkubiert.

Sowohl für die Mitogen- als auch für die Atigenstimulation erfolgte nach entsprechender Inkubation eine 10-minütige Zentrifugation mit 1500 rpm.

Nach der Zugabe von 3-H-Thymidin als Marker für DNA-Synthese und Zellproliferation wurden die Zellen erneut unter denselben Bedingungen für vier Stunden inkubiert. Mittels eines Zell-Harvesters (Skatron, PerkinElmer, Waltham, USA) wurden die markierten Zellen auf einem Filterpapier aufgefangen, ausgewaschen und nach Lösung mit Lösungsmittel (Rotiszint) in einem β -Counter ausgezählt.

2.3.3 Granulozytenfunktionsuntersuchung

2.3.3.1 DHR Test

Zum Ausschluss einer septischen Granulomatose (CGD) wurde bei einem Großteil der Patienten ein Dihydrorhodamin-Test (DHR-Test) durchgeführt mit dem eine Aussage über die Aktivität der NADPH-Oxidase von Granulozyten, welche bei CGD defekt ist, getroffen werden kann. Die Durchführung des DHR-Tests erfolgte nach etabliertem Protokoll im infektionsimmunologischen Diagnostiklabor des Dr. von Hainerschen Kinderspitals.

2.3.3.2 Chemotaxis

Granulozyten wurden zusätzlich hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur Chemotaxis mittels Agarosetechnik untersucht. Bestimmt wurde deren Migration in Millimeter nach 2 Stunden. Die Durchführung erfolgte im Infektionsimmunologischen Diagnostiklabor des Dr. von Hainerschen Kinderspitals nach etabliertem Protokoll adaptiert nach Nelson et al. [57].

2.4 Statistische Methoden

Berechnungen zur Signifikanz wurden bei Patienten mit und ohne *DOCK8*-Mutation sowie bei den Normalkontrollen mit dem Student's T-test der Software Graph Pad Prism analysiert. Ein p-Wert $\leq 0,01$ wurde als signifikant definiert.

Zur Erstellung von Tabellen, Graphiken und Abbildungen wurden Microsoft Word, Excel und Power-Point sowie Graph Pad Prism verwendet.

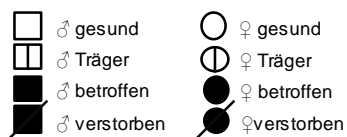
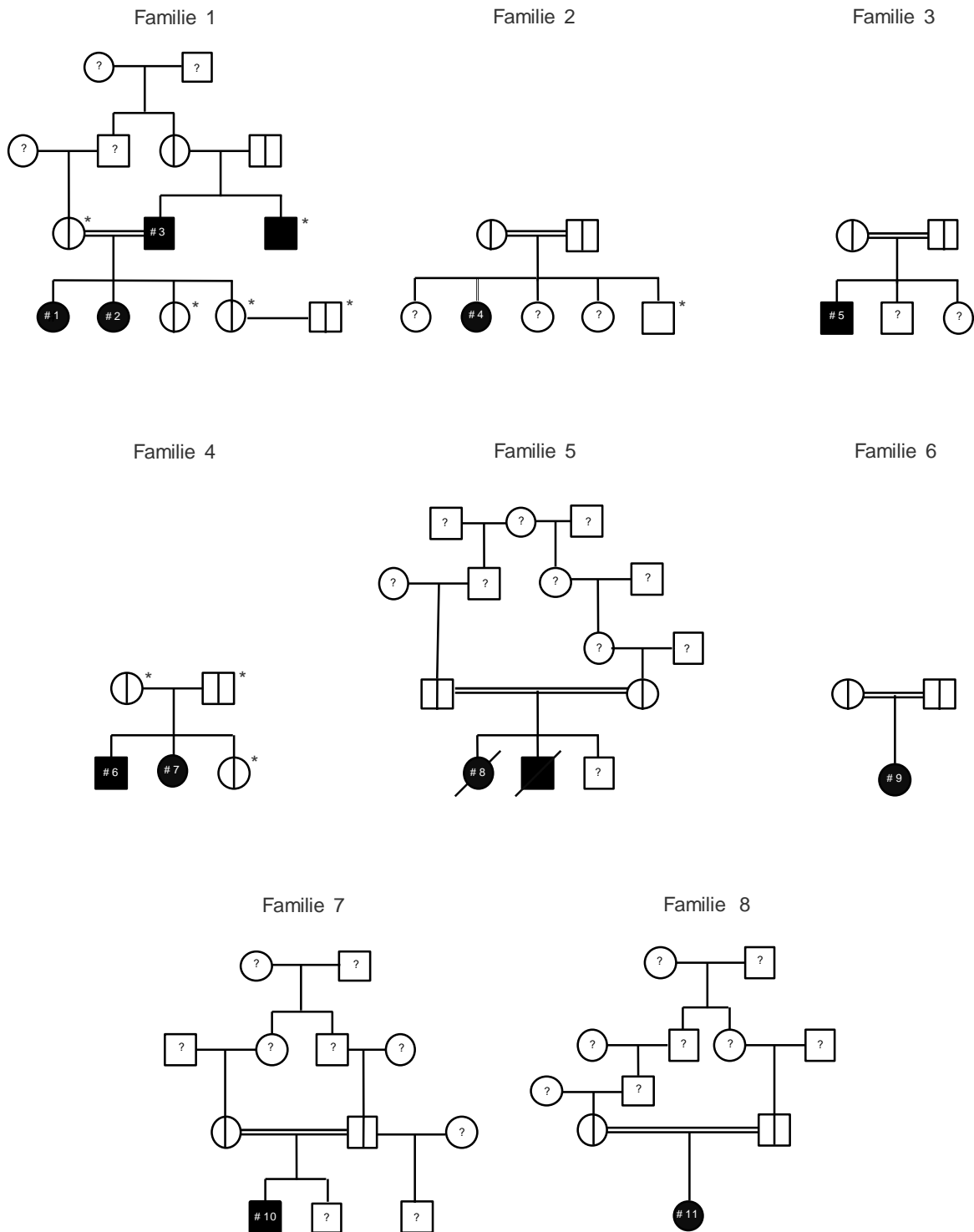
3. ERGEBNISSE

3.1 Mutationsanalyse

Molekulargenetische Untersuchungen mit dem Ziel, Mutationen im *DOCK8*-Gen zu detektieren, wurden bei 26 Patienten aus 23 nicht verwandten Familien unterschiedlicher ethnischer Herkunft vorgenommen. Bei 11 der 26 untersuchten Patienten wurden *DOCK8*-Mutationen gefunden (Tabelle 2, Abbildung 5) und der Gruppe der *DOCK8*-HIES-Patienten zugeordnet. Bei 15 Patienten wurde hingegen keine Veränderung im *DOCK8*-Gen identifiziert, sie werden im Folgenden als *DOCK8*-Wildtyp-Patienten bezeichnet.

Ein konsanguines Verwandtschaftsverhältnis der Eltern wurde bei neun von elf Patienten der *DOCK8*-HIES-Gruppe eruiert, dies entspricht 82 % bzw. 7 von 8 Familien. Bei Familie 4 (Patienten ID#6 und ID#7) handelt es sich um Geschwister deren Eltern nicht von einem verwandtschaftlichen Verhältnis wissen. Obgleich die Geschwister eine homozygote *DOCK8*-Veränderung tragen, wird daher die Konsanguinität für diese Familie als negativ definiert. Die Eltern von fünf der 11 Patienten mit *DOCK8*-Mutation sind Cousin und Cousine ersten Grades (Abbildung 4).

In der *DOCK8*-Wildtyp-Gruppe wurde bei einer Patientin (ID#18) ein konsanguines Verwandtschaftsverhältnis der Eltern festgestellt.



? Genetik nicht bekannt

* molekulargenetisch untersuchte Familienangehörige

Abbildung 4: Stammbäume DOCK8-HIES-Familien

ID#1-11 bezeichnet die molekulargenetisch nachgewiesenen DOCK-HIES-Kohorte. Familien 1-3, 5-6, 8 sind türkischer Herkunft, Familie 4 stammt ursprünglich aus Tschetschenien und Familie 7 aus Deutschland.

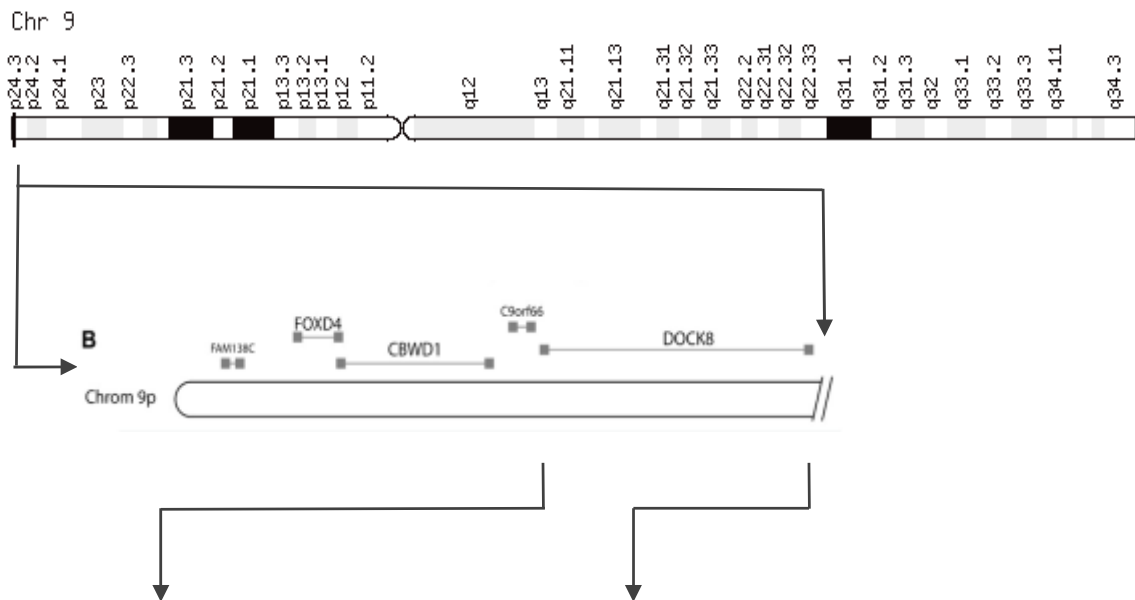
Detektiert wurden überwiegend homozygote Veränderungen im *DOCK8*-Gen. Alle identifizierten Mutationen führen entweder zu einem Verlust des kompletten oder zur Synthese eines nicht funktionellen DOCK8-Proteins und betreffen eine, keine oder, wie bei Patientin ID#4, beide DHR-Domänen (Abbildung 5). Es ließen sich fünf große Deletionen, die zu multiplen Exonverlusten führen (ID#5, ID#8-11), eine Deletion, die sich auf wenige Basenpaare beschränkt (ID#6-7) sowie zwei Punktmutationen (ID#1-4), eine davon mit Verlust eines einzelnen Exons (ID#1-3) feststellen.

Bei den Patienten ID#1, ID#2, ID#3 wurde eine homozygote Splice-Donor-Site-Mutation nach Exon 25 nachgewiesen (GTA→TTA). Die so entstandene Veränderung des an dieser Stelle stattfindenden Splicevorganges führt zu einem Verlust von Exon 25 auf cDNA-Ebene und somit zu einer Deletion von 50 Aminosäuren. Eine zweite Punktmutation konnte bei Patient ID#4 (C→A) in Exon 40 detektiert werden. Diese Veränderung führt dazu, dass das an dieser Stelle für die Aminosäure Serin codierende Basentriplet TCA zu dem Stopcodon TAA bzw. UAA verändert und die Transkription an dieser Stelle abgebrochen wird. Bei Patient ID#5 fanden sich normale PCR-Produkte für die Exons 1-10, ein kürzeres PCR-Produkt für Exon 11 und keine amplifizierbaren Produkte für Exons 12, 13, 15, 16, 26 sowie 46-48. Dies lässt auf eine große homozygote Deletion, beginnend in Exon 11 bis über das *DOCK8*-Gen hinaus, schließen. Bei den Patienten ID#6, ID#7 zeigt sich eine Deletion zweier Basenpaare in Exon 8 an den Positionen 850 und 851 auf cDNA-Ebene. Die daraus resultierende Frameshift-Mutation bewirkt eine Leserasterverschiebung, die mit der an dieser Stelle codierten Aminosäure Leucin beginnt und zu einer Veränderung der folgenden sieben Aminosäuren führt. Eine weitere große Deletion der Exons 1-26 zeigt sich bei Patient ID#9 mit einem homozygoten Verlust von mindestens 357.590 Nukleotiden. Ähnlich verhält es sich bei Patient ID#11, bei dem ebenso eine großen Deletion, beginnend vor Exon 1 bis inklusive Exon 26, gefunden wurde. Eine Deletion, beginnend vor Exon 1 bis inklusive Exon 2, konnte bei Patient ID#10 nachgewiesen werden. Für die Mehrzahl der DOCK8-HIES-Patienten dieser Studie konnte kein Protein nachgewiesen werden. Nur die Mutation der Patienten ID#1-3 führt nicht zu einem Verlust des DOCK8-Proteins.

ID#	Basenaustausch	Exon	Art der Mutation	Proteinveränderung	DHR1 betroffen	DHR2 betroffen	publiziert
1	c.3120+1G>T	25	homozygote Splice-Donor-Site Punktmutation mit Verlust von Exon 25	V990_K1040del	nein	nein	Engelhardt et al. 2009 Mizesko et al. 2013 Papan & Hagl et al. 2014 Boos & Hagl et al. 2014
2	c.3120+1G>T	25	homozygote Splice-Donor-Site Punktmutation mit Verlust von Exon 25	V990_K1040del	nein	nein	Engelhardt et al. 2009 Boos & Hagl et al. 2014
3	c.3120+1G>T	25	homozygote Splice-Donor-Site Punktmutation mit Verlust von Exon 25	V990_K1040del	nein	nein	Engelhardt et al. 2009 Boos & Hagl et al. 2014
4	c.5132C>A	40	homozygote Punktmutation ohne Exonverlust	p.Ser1711Stop Verlust	nein	ja	Bittner et al. 2010
5	Deletion	11-48	homozygote Deletion mit Verlust von Exon 11 bis inkl. 48+x	Verlust	ja	ja	Engelhardt et al. 2009
6	c.850_851delCT	8	homozygote Deletion von 2 Basenpaaren ohne Exonverlust	p.L284fsX292 Verlust	nein	nein	Mizesko et al. 2013 Boos & Hagl et al. 2014
7	c.850_851delCT	8	homozygote Deletion von 2 Basenpaaren ohne Exonverlust	p.L284fsX292 Verlust	nein	nein	Mizesko et al. 2013 Boos & Hagl et al. 2014
8	Deletion	1-19	große Deletion mit Verlust von Exon 1 bis inkl. 19	Verlust	ja	nein	Renner et al. 2004
9	chrom9 del 30910-388506	1-26	homozygote Deletion mit Verlust von Exon 1 bis inkl. 26	Verlust	ja	nein	Renner et al. 2004 Engelhardt et al. 2009 Gatz et al. 2011
10	Deletion	1-2	homozygote Deletion mit Verlust von Exon 1 und 2	Verlust	nein	nein	Mizesko et al. 2013 Boos & Hagl et al. 2014
11	Deletion	1-26	homozygote Deletion mit Verlust von Exon 1 bis 26	Verlust	ja	nein	Mizesko et al. 2013

Tabelle 2: Mutationen der DOCK8-HIES-Kohorte [20, 27, 54, 58-60]

A



C

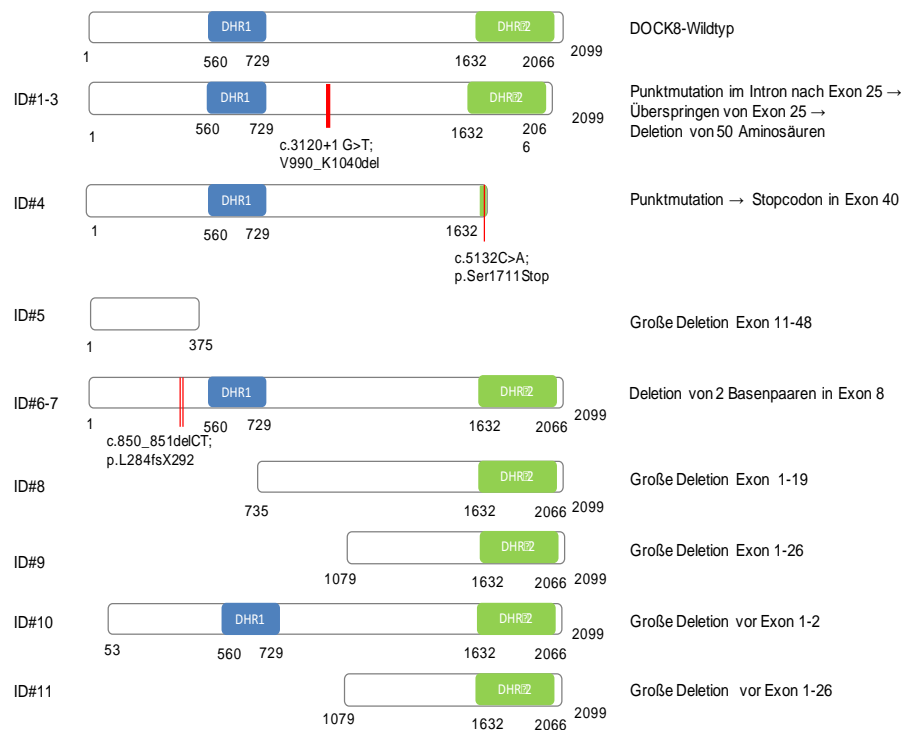


Abbildung 5: Darstellung DOCK8-HIES-Mutationen unserer Kohorte

A: Chromosom neun mit Kennzeichnung der *DOCK8*-Gen-Lokalisation [61] **B:** *DOCK8* und dessen benachbarte Gene [27]. **C:** *DOCK8*-Mutationen unserer Patienten schematisch dargestellt, Proteinsynthese nur bei ID#1-3; Nummerierung entspricht der Aminosäure;

3.2 Darstellung und Erörterung des klinischen Phänotyps

Anhand 26 klinischer Symptome sowie unter Berücksichtigung des NIH-Scores wurden die 26 Patienten dieser Studie phänotypisch charakterisiert. Jedes vorhandene Symptom wurde mit einem „Ja“ bezeichnet, vorerst unabhängig von Ausprägungsgrad, Häufigkeit bzw. Anzahl der Ereignisse sowie deren genauer Lokalisation. Die Verteilung der Symptome einzelner Patienten wird in Tabelle 5 für DOCK8-HIES-Patienten und in Tabelle 8 für DOCK8-Wildtyp-Patienten dargestellt, welche in der untersten Reihe die relativen Häufigkeiten angeben, sowie den NIH-Score in der letzten Spalte. AR-HIES-Erstverdachtssymptome werden an vorderer Stelle aufgeführt, gefolgt von weiteren klinischen Erscheinungsbildern.

3.4.1 Klinik DOCK8-HIES-Patienten

Alle Patienten ($n = 11$) mit gesicherter Mutation im *DOCK8*-Gen wiesen die charakteristischen HIES Erstverdachtssymptome Ekzem, Eosinophilie sowie ein IgE > 500 IU/ml auf.

Ein superinfiziertes Ekzem wurde bei allen (100 %) Patienten dieser Kohorte, Abszesse bei acht von elf Patienten (83 %) festgestellt.

Hinsichtlich der Atemwege wurden Infektionen des oberen und unteren Respirationstraktes differenziert. Mindestens eine Pneumonie als Erkrankung der unteren Atemwege zeigte sich bei allen Patienten der DOCK8-HIES-Kohorte ($n = 11$), rezidivierend trat diese bei 82 % der Patienten auf, ebenso viele präsentierten sich mit rezidivierenden Bronchitiden. Was Infektionen der oberen Atemwege betrifft, zeigten sich bei 55 % ($n = 6/11$) der Patienten mindestens einmal eine Otitis externa und bei 73 % ($n = 8/11$) mindestens einmal eine Otitis media. Rezidivierende Entzündungen des Mittelohres, welche auch auf Therapie schlecht ansprachen, wurden bei sechs von elf Patienten (55 %) dokumentiert. Eine Sinusitis als weitere „Infektion der oberen Atemwege“ wurde bei 36 % ($n = 4/11$) der DOCK8-HIES-Patienten mindestens einmal diagnostiziert.

46 % der Patienten ($n = 5/11$) stellten sich mit Keratitiden oder Konjunktivitiden vor, bei zwei dieser Patienten handelte es sich um allergische Rhinokonjunktivitiden, bei den anderen drei Patienten konnte eine Herpes-Simplex-Virus-getriggerte Infektion nachgewiesen werden. Das Symptom der „schweren ophthalmologischen Infektionen“ (Tabelle 5) steht für entzündliche Rekrudeszenzen von Keratokonjunktivitiden mit langwierigem Verlauf und

daraus resultierenden Folgeschäden und trat bei 55 % (n = 6) der Patienten auf. Bei den Patienten ID#1 und ID#5, zeigten sich auffällige Ähnlichkeiten dieser ophthalmologischen Infektionen sowohl hinsichtlich des klinischen Erscheinungsbildes als auch in Bezug auf den Entzündungsverlauf und das Erregerspektrum. Patienten ID#1 und ID#5 entwickelten eine, vermutlich Herpes-Simplex-Typ-1-getriggerte und bakteriell superinfizierte Blepharokonjunktivitis, die im Verlauf auf die Haut des äußeren Auges übergreifend zu pflaumengroßen tumorartigen Erscheinungen führte (Abbildung 6). Patient ID#10 entwickelte eine schwere peripher ulzerative Keratitis mit massiver Stromaausdünnung. Bei Patientin ID#6 wurden eitrige Konjunktivitiden, Hordeola bis hin zu mit HSV superinfizierten Läsionen der Augenwinkel und des Augenlides diagnostiziert.

Rezidivierende und ebenfalls durch Herpes-Simplex-Typ-1 hervorgerufene Keratitiden führten bei der Patientin ID#11 zu einer ausgeprägten Hornhautnarbe.

Eine Sepsis trat bei zwei von elf Patienten (18 %) auf. Patient ID#4 entwickelte eine Sepsis hervorgerufen durch nicht weiter klassifizierte Salmonellen.

Neben einer durch Klebsiellen verursachten Sepsis kam es bei Patient ID#5 zusätzlich zu einer Osteomyelitis der Tibia sowie zur Ausbildung eines Abszesses am Musculus iliopsoas.

Anhand von Tabelle 3 und Tabelle 4 wird das breite Spektrum sowohl viraler als auch bakterieller Erreger bei DOCK8-HIES-Patienten demonstriert. Virale Infektionen wurden hauptsächlich von Erregern der Herpes-Simplex-Gruppe verursacht und insgesamt bei 82 % der DOCK8-HIES-Patienten mindestens einmal kultiviert. Bei allen DOCK8-HIES-Patienten ließ sich *Staphylokokkus aureus* mindestens einmal im Rahmen einer Infektion nachweisen und war somit der am häufigsten nachgewiesene bakterielle Erreger. Bei 36 % unserer DOCK8-HIES-Patienten wurde zusätzlich ein MRSA (Methicillin-resistenter *Staphylokokkus aureus*) in Abstrichen der Haut sowie der Schleimhaut der oberen Atemwege nachgewiesen. Bei mehr als der Hälfte (54 %) unserer Patienten wurde *Pseudomonas aeruginosa* isoliert, primär in Abstrichen der Gehörgangsmukosa. Enterokokkus-Spezies wurden mit einer Häufigkeit von 45 % aus Abstrichen der Haut, Abszessen sowie der oberen Atemwege isoliert. *Streptokokkus pneumoniae* und *Haemophilus influenzae* wurden bei 27 % der DOCK8-HIES-Patienten aus Schleimhaut der oberen Atemwege und Sputum isoliert.

Pilzinfektionen wurden bei DOCK8-HIES-Patienten primär von *Candida albicans* hervorgerufen, der bei zehn von elf Patienten (91 %) nachgewiesen werden konnte.

PatientID#	DNA-Viren							RNA-Viren	Sprosspilze
	HHV1	HHV2	VZV	HZMV	HHV6	HPV	MCV	Rotavirus	Candida albicans
1	ja	nein	nein	nein	ja	nein	nein	nein	ja
2	nein	ja	nein	nein	nein	nein	nein	nein	ja
3	ja	nein	ja	nein	nein	nein	nein	nein	ja
4	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	ja	ja
5	ja	ja	ja	nein	nein	nein	ja	nein	ja
6	ja	nein	nein	ja	nein	nein	ja	nein	ja
7	ja	nein	ja	nein	nein	ja	ja	nein	ja
8	ja	nein	nein	nein	nein	nein	ja	nein	ja
9	ja	nein	ja	nein	ja	nein	ja	ja	ja
10	ja	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	ja
11	ja	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein
Anzahl Positive/ Gesamtzahl	9/11	2/11	4/11	1/11	2/11	1/11	5/11	2/11	10/11
relative Häufigkeit%	82	18	36	9	18	9	46	18	91

Tabelle 3: Virale Infektionen und Pilzinfektionen von DOCK8-HIES-Patienten

HHV 1 = Humaner Herpes Simplex Virus 1; HHV 2 = Humaner Herpes Simplex Virus 2; VZV = Varizella Zoster Virus;
 HZMV = Humaner Zytomegalie Virus; HHV6 = Humaner Herpes Virus 6 (Roseolovirus); HPV = Humaner Papilloma Virus,
 MCV = Molluscum Contagiosum Virus
 Erreger, welche nur in der DOCK8-HIES-Gruppe nachgewiesen wurden, sind grau hinterlegt dargestellt.

Neben der stark ausgeprägten atopischen Dermatitis traten zusätzlich Asthma bei 73 % (n = 7/11) und Allergien beispielsweise in Form einer Rhinitis allergica und / oder einer Hypersensibilität gegenüber Nahrungsmitteln und / oder Tierhaaren, Hausstaub sowie Latex bei 100 % (n = 11/11) der Patienten als Symptome des atopischen Formenkreises auf. Bei drei von elf Patienten (37 %) kam es zu neurologischer Symptomatik, welche als Hemiparesen, Infektionen, Krampfleiden oder intrazerebrale Blutungen in Erscheinung trat. Bei Patient ID#1 handelte es sich um einen zweimalig aufgetretenen tonisch-klonischen Krampfanfall mit computertomographisch nachgewiesenen Hirnödemenzeichen und kleineren Einblutungen. Des Weiteren entwickelte sich eine zunehmende muskuläre Hypotonie, die in eine linksseitige Hemiparese überging, welche sich im Verlauf vollständig zurückbildete. Im Schädel-MRT zeigte sich vor allem okzipital eine Leukenzephalopathie, vereinbar mit einer Vaskulitis.

Weitere das ZNS betreffende Auffälligkeiten fanden sich bei Patientin ID#9 und äußerten sich in einer rechtsseitig peripheren Fazialisparese, welche innerhalb von sechs Wochen in vollständige Remission überging. Einen Anhaltspunkt für eine intrazerebrale Genese gab es nicht, man vermutete einen Zusammenhang mit den bei der Patientin rezidivierend aufgetretenen Mittelohrentzündungen.

Bei Patientin ID#8 entwickelte sich eine armbetonte rechtsseitige Hemiparese inklusive einer zentralen Fazialisparese. Magnetresonanztomographisch wurde eine zerebrale Vaskulitis (A. cerebri media) als wahrscheinlichste Ursache angegeben. Im Alter von 16 Jahren wurde bei dieser Patientin zusätzlich ein Plattenepithelzellkarzinom im Genitalbereich festgestellt. 2008, ein halbes Jahr nach Diagnosestellung erlag das Mädchen dem schweren Verlauf ihrer Erkrankung. Sie war die einzige Patientin unserer Kohorte, bei der ein Malignom festgestellt wurde.

Bei 45 % der Patienten (n= 5/11) ließ sich eine benigne tumorartige Mukosaproliferation feststellen. Bei den Patienten ID#1, ID#5 und ID#6 hatte der Tumor seinen Ursprung an der Innenseite des Augenlides, bei den Patienten ID#7 und ID#11 an der Mundschleimhaut (Abbildung 6).

Autoimmunerkrankungen im weiteren Sinne wurden lediglich bei einer Patientin (ID#1) in Form einer autoimmunhämolytischen Anämie festgestellt. Über die Frage der möglicherweise autoimmunen Genese der zerebralen Vaskulitis von Patientin ID#8 lässt sich diskutieren.

Die Patienten entwickelten sich körperlich und geistig überwiegend normal. Allerdings zeigten 55 % der Patienten (n = 6/11) ein von der 3. Perzentile abweichendes vermindertes Wachstum.

Bei vier von elf Patienten wurde ein NIH-Score (Abbildung 2) von über 40 Punkten erreicht. Für sechs von elf der DOCK8-HIES-Patienten ließen sich Werte zwischen 32 und 39 Punkten errechnen. Daraus ergab sich ein Scoremittelwert von 39,7 Punkten.



Abbildung 6: Klinische Symptomatik DOCK8-HIES-Patienten

A₁-A₃: HSV-getriggerte, tumoröse Raumforderung in verschiedenen Stadien: A₁: Anfangsstadium, A₂: Exazerbation, A₃: nach IFN- α -(2b) Therapie; B: Mukosaproliferation unklarer Genese, Wangeninnenseite; C: MCV-typische Dellwarzen im Hals-, Thoraxbereich; D: typisches Erscheinungsbild der Haut hier beispielhaft am Handrücken dargestellt;

PatientenID#	Patientendaten		HIES		INFEKTILOGIE												Atopischer Formenkreis				ZNS Symptomatik		Minderwuchs		NIH Score								
	Alter (y) im 2011	Geschlecht	Konsanguinität	Erstverdachtssymptome	häufigste Erreger	Atemwege				Haut		Augen		Pepsis		Osteomyelitis		Abszesse innerer Organe		adenoide Vegetation		Lymphadenopathie		Asthma	Allergien gesamt	Nahrungsmittelallergien	Allergien ausgenommen Nahrungsmittel	ja	nein	ja	nein		
1	17	w	ja	Ekzem	Staphylokokkus aureus	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	42	41
2	18	w	ja	Ekzem	Herpes simplex-Virus typ 1/2	ja	nein	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	32	36
3	47	m	ja	Ekzem	Molluscum contagiosum-Virus	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	51	35
4	14	w	ja	Ekzem	Herpes simplex-Virus typ 1/2	ja	nein	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	34	36
5	18	m	ja	Ekzem	Staphylokokkus aureus	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	48	43
6	3	w	nein	Ekzem	Staphylokokkus aureus	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	39	
7	6	m	nein	Ekzem	Staphylokokkus aureus	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	37	55
8	16	w	ja	Ekzem	Staphylokokkus aureus	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	37	55
9	21	w	ja	Ekzem	Staphylokokkus aureus	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	37	55
10	12	m	ja	Ekzem	Staphylokokkus aureus	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	37	55
11	13	w	ja	Ekzem	Staphylokokkus aureus	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	37	55
		Anzahl Positive / Gesamtzahl		11/11		11/11		11/11		11/11		11/11		11/11		11/11		11/11		11/11		11/11		11/11		11/11		11/11		11/11		11/11	
		relative Häufigkeit %		100		100		100		100		100		100		100		100		100		100		100		100		100		100		100	

Tabelle 5: Klinische Daten DOCK8-HIES-Patienten

k. A.: keine Angaben

3.4.2 Klinik DOCK8-Wildtyp-Patienten

Als HIES-Erstverdachtssymptome zeigten sich bei 86 % der Patienten (n = 12/14) ein Ekzem, bei 100 % der Patienten (n = 14/14) eine Eosinophilie und ebenso bei 93 % der Patienten (n = 13/14) ein IgE > 500 IU/ml.

Mindestens eine Pneumonie ließ sich bei 64 % (n = 9/14), mehr als eine bei 50 % der Patienten feststellen. Acht von 14 Patienten (57 %) entwickelten rezidivierende Bronchitiden. Infektionen des oberen Respirationstraktes präsentierten sich bei 14 % der Patienten als Otitis externa, bei 57 % (n = 8/14) als einmalige, bei 43 % der Patienten als rezidivierende Otitis media. Bei zwei von 14 Patienten (14 %) wurde einmalig eine Sinusitis diagnostiziert.

Hinsichtlich der ophthalmologischen Befunde zeigten sich bei drei von 14 Patienten (21 %) Konjunktivitiden und Keratitiden in starker bis sehr starker Ausprägung. Patient ID#17 entwickelte rezidivierende Keratitiden, welche stationäre Aufenthalte notwendig machten, ebenso Patient ID#19, bei welchem einmalig eine die Situation komplizierende Orbitaphlegmone entstand. Bei Patientin ID#18 kam es auf Grund der Aggressivität der Infektionen sowie der häufigen Rezidive zu bleibenden Schäden in Form einer Hornhautnarbe des rechten Auges.

Die bei Patient ID#20 dokumentierte Sepsis wurde durch B-Streptokokken im Neugeborenenalter hervorgerufen.

Die Tabellen 6 und 7 zeigen die Erregerverteilung hinsichtlich viraler, bakterieller und fungaler Infektionen bei den DOCK8-Wildtyp-Patienten. Bei 58 % der DOCK8-Wildtyp-Gruppe ließen sich mindestens einmal Viren der Herpes-simplex-Gruppe nachweisen. Als häufigster bakterieller Erreger wurde, wie auch in der DOCK8-HIES-Gruppe, *Staphylokokkus aureus* identifiziert, der bei 64 % der DOCK8-Wildtyp-Patienten mindestens einmal ursächlich für eine Infektion war. Pilzinfektionen, hervorgerufen durch *Candida albicans* wurden bei fünf von 14 Patienten (36 %) nachgewiesen.

PatientID#	DNA-Viren						RNA-Viren				Sprossspitze
	HHV1	VZV	EBV	HHV6	HHV7	MCV	Norovirus	Parainfluenza	Influenzavirus	RSV	Candida albicans
12	ja	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	ja
13	ja	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein
14	nein	ja	ja	nein	nein	ja	nein	nein	nein	nein	nein
15	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein
16	nein	nein	nein	nein	nein	nein	ja	nein	nein	nein	ja
17	nein	ja	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein
18	ja	nein	ja	ja	nein	nein	nein	nein	nein	nein	ja
19	ja	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein
20	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein
21	ja	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein
22	ja	nein	nein	ja	ja	nein	ja	ja	ja	ja	ja
23	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.
24	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein
25	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	ja
26	ja	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein
Anzahl positive/ Gesamtzahl	7/14	2/14	2/14	2/14	1/14	1/14	2/14	1/14	1/14	1/14	5/14
relative Häufigkeit%	50	14	14	15	7	7	14	7	7	7	36

Tabelle 6: Virale Infektionen und Pilzinfektionen der DOCK8-Wildtyp-Patienten

HHV 1 = Humaner Herpes Simplex Virus 1; VZV = Varizella Zoster Virus; EBV = Epstein-Barr Virus;
 HZMV = Humaner Zytomegalie Virus; HHV6 = Humaner Herpes Virus 6 (Roseolovirus); HHV7 = Humaner Herpes Virus 7
 (Roseolovirus); MCV = Molluscum Contagiosum Virus; RSV = Respiratory Syncytical Virus
 Erreger, welche nur in der DOCK8-Wildtyp-Gruppe nachgewiesen wurden, sind grau hinterlegt dargestellt.

PatientID#	Staphylokokken		α-hämolisierende/vergrünende Streptokokken					β-hämolisierende Streptokokken		sonstige											
	<i>Staphylococcus aureus</i> (Koagulase+)	Staphylokokken (Koagulase-)	<i>Staphylococcus viridans</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Enterokokken (hämolysepieziesangabe) (D)	Enterokokkus faecalis (D)	<i>Streptococcus galactiae</i> (B)	<i>Streptococcus pyogenes</i> (A)	nicht-hämolysoerende Streptokokken	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Haemophilus influenzae</i>	<i>Bordetella</i> spp.	<i>Clostridium difficile</i>	<i>Camellia haemolyans</i>	<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	<i>Lebseilla xytoca</i>	<i>Lebseilla pneumoniae</i>	<i>Mikrokokkus luteus</i>	<i>Neisserie</i> species	<i>Serratia marcescens</i>
12	ja	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein
13	ja	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein
14	ja	nein	nein	ja	nein	nein	nein	ja	nein	nein	nein	ja	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein
15	ja	nein	nein	nein	ja	nein	nein	ja	nein	ja	ja	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein
16	ja	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein
17	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein
18	ja	ja	ja	ja	ja	nein	nein	nein	nein	ja	ja	nein	nein	nein	ja	nein	nein	ja	ja	nein	ja
19	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	ja	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein
20	ja	ja	nein	nein	nein	nein	ja	nein	nein	nein	nein	ja	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein
21	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein
22	nein	ja	ja	nein	nein	nein	nein	nein	ja	ja	nein	nein	nein	ja	nein	ja	ja	nein	nein	ja	nein
23	k.ä.	k.ä.	k.ä.	k.ä.	k.ä.	k.ä.	k.ä.	k.ä.	k.ä.	k.ä.	k.ä.	k.ä.	k.ä.	k.ä.	k.ä.	k.ä.	k.ä.	k.ä.	k.ä.	k.ä.	k.ä.
24	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein
25	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	ja	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein
26	ja	ja	nein	nein	nein	ja	nein	nein	nein	ja	ja	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein
Anzahl positive/ Gesamtzahl	8/14	4/14	2/14	2/14	2/14	1/14	1/14	3/14	1/14	4/14	3/14	2/14	1/14	1/14	1/14	1/14	1/14	1/14	1/14	1/14	1/14
relative Häufigkeit%	57	29	14	14	14	7	7	21	7	33	25	17	7	7	7	7	7	7	7	7	7

Tabelle 7: Bakterielle Infektionen DOCK8-Wildtyp-Patienten

spp. = species pluralis; Großbuchstaben in Klammern beschreiben die Lancefield-Klassifikation; Erreger, welche nur in der DOCK8-Wildtyp-Gruppe nachgewiesen wurden, sind grau hinterlegt dargestellt.

Die für Atopiker klassischen Symptome Asthma und Allergien zeigten sich bei 43 % (n = 6/14) und 85 % (n = 11/13) der Patienten der DOCK8-Wildtyp-Kohorte.

Ein superinfiziertes Ekzem wurde bei 50 %, Abszesse der Haut bei 14 % der Patienten diagnostiziert.

Als ZNS-spezifische Auffälligkeiten sind eine Post-Zoster-Neuralgie bei Patient ID#17 zu ergänzen sowie eine Meningitis bei Patient ID#20. Ebenso wurde bei diesem Patienten eine unklare Raumforderung kaudal des Chiasma opticum sowie eine Erweiterung der Hinterhörner beider Seitenventrikel ohne Hirndruckzeichen festgestellt.

Autoimmunerkrankungen bzw. Vaskulitiden wurden bei keinem der Patienten dieser Kohorte nachgewiesen.

Abgesehen von einer Verminderung des Wachstums (Abfall unterhalb der 3. Perzentile), welche bei 21 % der DOCK8-Wildtyp-Patienten dokumentiert wurde, entwickelten sich die Patienten körperlich und geistig überwiegend normal.

Es wurden in der Gruppe der DOCK8-Wildtyp-Patienten NIH-Score-Werte errechnet, die zwischen sechs und 46 Punkten lagen. Daraus ergab sich ein Mittelwert von 27,5 Punkten.

PatientID#	Patientendaten		HIES			INFEKTOLOGIE													Atopischer Formenkreis				ZNS Symptomatik	Minderwuchs	NIH Score						
	Alter (y) in 2011	Geschlecht	Konsanguinität	Erstverdachtssymptome	Erstverdachtssymptome	häufigste Erreger	Atemwege	Haut	Augen	Sepsis	Osteomyelitis	Abszesse innerer Organe	adenoid Vegetation	Lymphadenopathie	Asthma	Allergien gesamt	Nahrungsmittelallergien	Allergien ausgenommen Nahrungsmittel													
12	24	w	nein	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	nein	nein	25					
13	15	w	nein	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	nein	38				
14	18	w	nein	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	nein	30				
15	6	m	nein	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	nein	34				
16	7	w	nein	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	nein	18				
17	15	m	nein	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	nein	6				
18	6	w	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	nein	39				
19	18	m	nein	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	nein	18				
20	25	m	nein	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	nein	46				
21	11	w	nein	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	nein	44				
22	5	m	nein	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	nein	10				
23	18	m	k.A.	nein	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	nein	17				
24	5	m	nein	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	nein	19				
25	4	m	nein	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	nein	25				
26	5	m	nein	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	nein	33				
Anzahl Positive / Gesamtzahl			1/14	12/15	15/15	14/15	4/15	8/14	7/14	7/14	5/14	12/14	3/14	10/15	7/15	3/6	7/15	2/14	3/14	1/14	1/14	0/14	0/14	1/13	5/14	7/15	12/15	11/15	11/15	2/14	4/15
relativer Häufigkeit %			7	80	100	93	27	57	50	7	36	86	21	67	47	50	47	14	21	7	7	0	0	7	36	47	80	74	74	14	27

Tabelle 8: Klinische Daten DOCK8-Wildtyp-Patienten
k. A.: keine Angaben

3.4.3 Vergleich Klinik DOCK8-HIES-Patienten vs. DOCK8-Wildtyp-Patienten

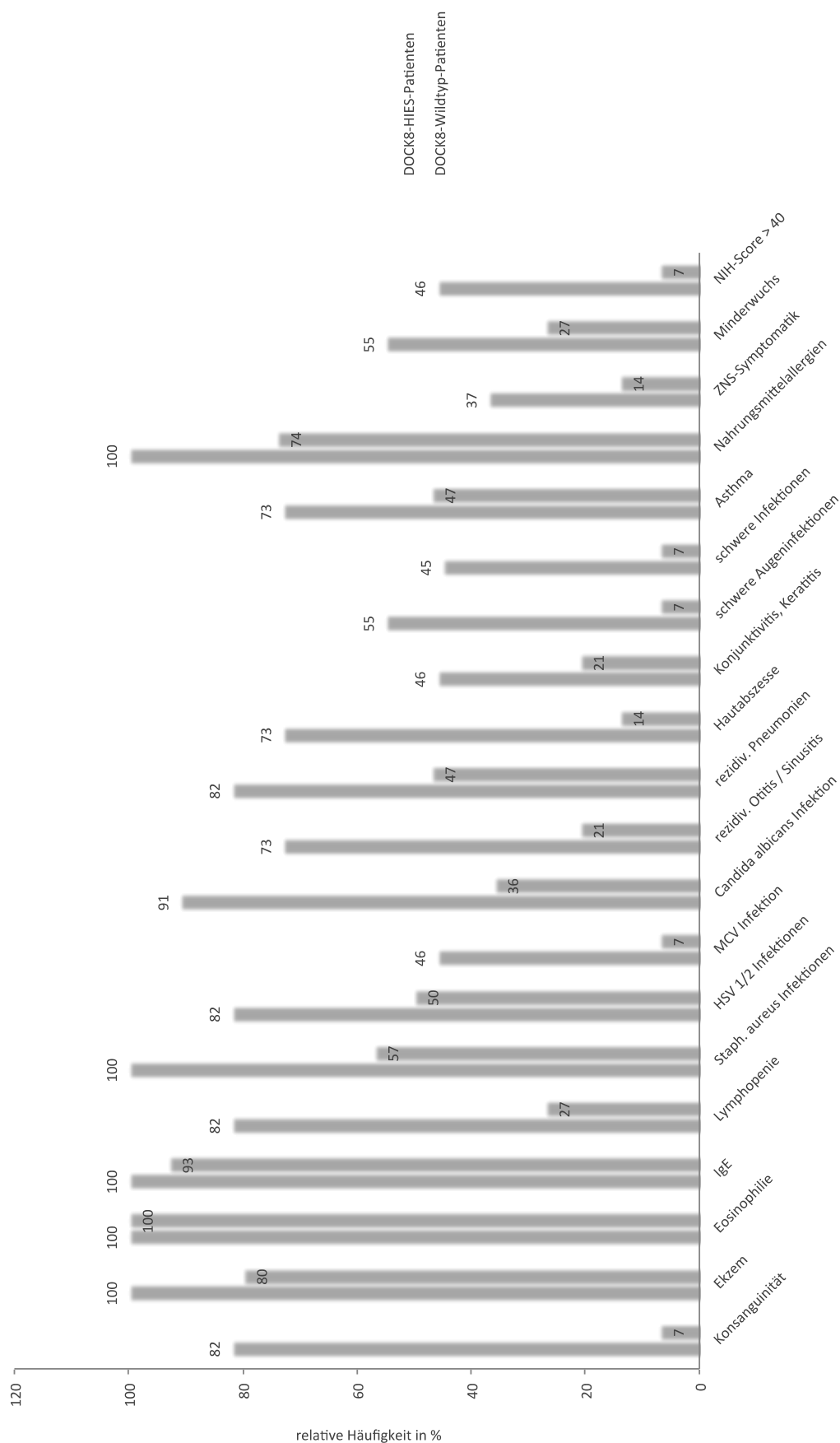


Abbildung 7: Symptomverteilung DOCK8-HIES-Patienten vs. DOCK8-Wildtyp-Patienten

3.5 Laborchemische Definition eines immunologischen Phänotyps

3.5.1 Immunologische Ergebnisse

3.5.1.1 Differentialblutbild

Zur Berechnung der Lymphozytenzellzahlen wurde jeweils die aktuellste Messung herangezogen. Abbildungen 8 sowie 11-13 zeigen neben den aktuellsten Messwerten zusätzliche Werte zu unterschiedlichen Zeitpunkten für DOCK8-HIES-Patienten.

Die Lymphozytengesamtzellzahl zeigte sich in der Gruppe der DOCK8-HIES-Patienten bei neun von elf Patienten (82 %) mit einem Mittelwert (MW) \pm Standardabweichung (SA) von $1,192 \pm 0,511 \times 10^3$ Zellen/ μ l signifikant vermindert. In der Gruppe der DOCK8-Wildtyp-Patienten traf dies für drei von 15 Patienten (20 %) zu, es konnte ein Mittelwert (\pm SA) von $2,860 (\pm 1,454) \times 10^3$ Zellen/ μ l ermittelt werden.

Eine Eosinophilie lag bei allen Patienten beider Gruppen vor. In der Kohorte der DOCK8-HIES-Patienten wurden Werte zwischen $0,693$ und $27,120 \times 10^3$ Zellen/ μ l gemessen was einen Mittelwert (\pm SA) von $7,446 (\pm 7,143) \times 10^3$ Zellen/ μ l ergab. DOCK8-Wildtyp-Patienten zeigten quantitative Messwerte eosinophiler Granulozyten in einem Bereich zwischen $0,305$ und $13,770 \times 10^3$ Zellen/ μ l, woraus sich ein Mittelwert (\pm SA) von $3,92 (\pm 4,263) \times 10^3$ Zellen/ μ l berechnen ließ (Tabelle 9, Seite 46; Abbildung 8).

Die Anzahl der basophilen und neutrophilen Granulozyten erwies sich in beiden Gruppen als unauffällig.

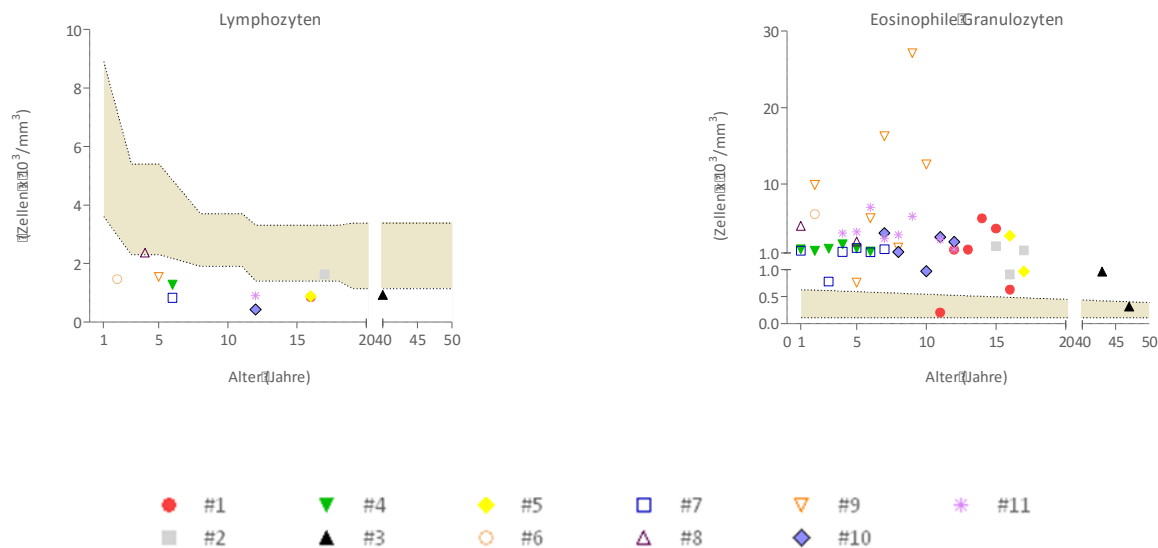


Abbildung 8: graphische Darstellung laborchemisch ermittelter Werte von DOCK8-HIES-Patienten

Leuko-, und Lymphozytensubgruppen der DOCK8-HIES-Kohorte (#1-10). Die gelblich unterlegten Bereiche stellen die Normwerte dar (0-19 Jahre: 10.-90. Perzentile [62], 19-25 Jahre 2,5.-97,5. Perzentile [63]).

Die Graphiken zeigen alle von uns erhobenen Werte bzw. Mehrfachmessungen zu verschiedenen Zeitpunkten.

3.5.1.2 Erweiterte Lymphozytendiagnostik: Differenzierung und Funktion

Bei den DOCK8-HIES-Patienten ließ sich eine Verminderung der gesamten T-Zellen ($\text{CD}3^+$) bei zehn von elf Patienten (91 %) feststellen. $\text{CD}4^+$ -T-Zellen und $\text{CD}8^+$ -T-Zellen zeigten bei neun von elf Patienten dieser Gruppe erniedrigte Werte. Die Zellzahlen dieser drei Subgruppen zeigten einen signifikanten Unterschied im Vergleich zu den Zellzahlen der Patienten der DOCK8-Wildtyp-Kohorte (Tabelle 9, Seite 46). Vier von 14 Patienten der DOCK8-Wildtyp-Kohorte zeigten für $\text{CD}3^+$ -T-Zellen Werte außerhalb des Normbereichs. Je zwei von 14 DOCK8-Wildtyp Patienten zeigten Verminderungen der T-Helfer ($\text{CD}4^+$ -), und der zytotoxischen T-Zellen ($\text{CD}8^+$).

Des Weiteren wurden $\text{CD}8^+$ -T-Lymphozyten hinsichtlich ihres Apoptose auslösenden Potentials untersucht. Neben dem prozentualen Anteil an $\text{CD}8^+$ -Zellen aus der Gesamtheit an Lymphozyten wurde bei Patienten und Kontrollen der Anteil an Perforin und Granzyme B exprimierenden Zellen gemessen. Ein signifikanter Unterschied zwischen DOCK8-HIES-Patienten und Kontrollen konnte jedoch unter anderem auf Grund der geringen Anzahl an Messungen nicht ermittelt werden (Abbildung 9).

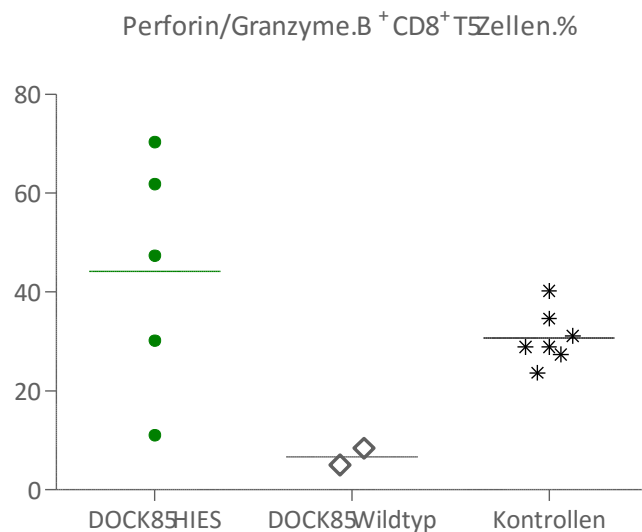


Abbildung 9: Perforin/Granzyme B positive CD8⁺-Zellen

Gezeigt wird der prozentuale Anteil Perforin/Granzyme B positiver CD8⁺-Zellen von DOCK8-HIES-Patienten, DOCK8-Wildtyp-Patienten und Kontrollen.

Zusätzlich wurden Lymphozyten in vitro mit Mitogenen unterschiedlicher Art und Dosierung sowie mit Antigenen stimuliert und deren Quantifizierung gemessen. Es zeigte sich bei 64 % (n = 7/11) der DOCK8-HIES-Patienten eine verminderte Reaktion auf mindestens eines der Mitogenstimulantien. 86 % dieser Patienten (n = 6/7) reagierten auf das Mitogen Staphylokokkus aureus Cowan I (SAC) 0,001 % im Vergleich zu gesunden Kontrollen reduziert, 71 % zeigten auf die Stimulation mit Phytohaemagglutinin (PHA) 0,1 µg/ml und 57 % auf Pokeweed mitogen (PWM = Kermesbeere) 10 µg/ml verminderte Reaktionen (Abbildung 10). Signifikante Unterschiede zwischen DOCK8-HIES-Patienten und Kontrollen ließen sich für die Mitogene PHA 0,1 µg/ml sowie für Concanavalin A (CON A) 5 µg/ml mit p-Werten ≤ 0,01 berechnen.

Eine reduzierte Antwort auf Stimulation mit einem Antigen, das sich aus Tetanus- und Diphtherie-Anteilen zusammensetzt, zeigte sich bei vier von elf und eine fehlende Antwort bei fünf von elf der DOCK8-HIES-Patienten. Insgesamt ließ sich hier ein signifikanter Unterschied (p-Werten ≤ 0,0001) zwischen Patienten und Kontrollen darstellen (Abbildung 10). Bei keinem der hinsichtlich Lymphozytenstimulationsfähigkeit untersuchten DOCK8-Wildtyp-Patienten (n = 11) erwies sich die Zellproliferation auf Mitogene als vermindert, bezüglich der Antigene wurde hier bei drei von elf Patienten (27 %) eine verminderte Reaktion festgestellt.

Des Weiteren zeigte sich bei mehr als der Hälfte (n = 7/10) der DOCK8-HIES-Patienten eine prozentual erhöhte Anzahl an HLA-DR⁺-Lymphozyten und aktivierten T-Lymphozyten (HLA-

DR⁺-CD3⁺-Zellen) (Abbildung 11). In der DOCK8-Wildtyp-Kohorte wurde dies nur bei 27 % (n = 3/11) der Patienten festgestellt. Mit einem Mittelwert (\pm SA) von $0,575 (\pm 0,268) \times 10^3$ Zellen/ μ l für HLA-DR⁺-Lymphozyten und einem Mittelwert (\pm SA) von $0,133 (\pm 0,087) \times 10^3$ Zellen/ μ l für HLA-DR⁺-CD3⁺-Zellen konnten jedoch für diese Zellsgruppen keine signifikanten Unterschiede ermittelt werden.

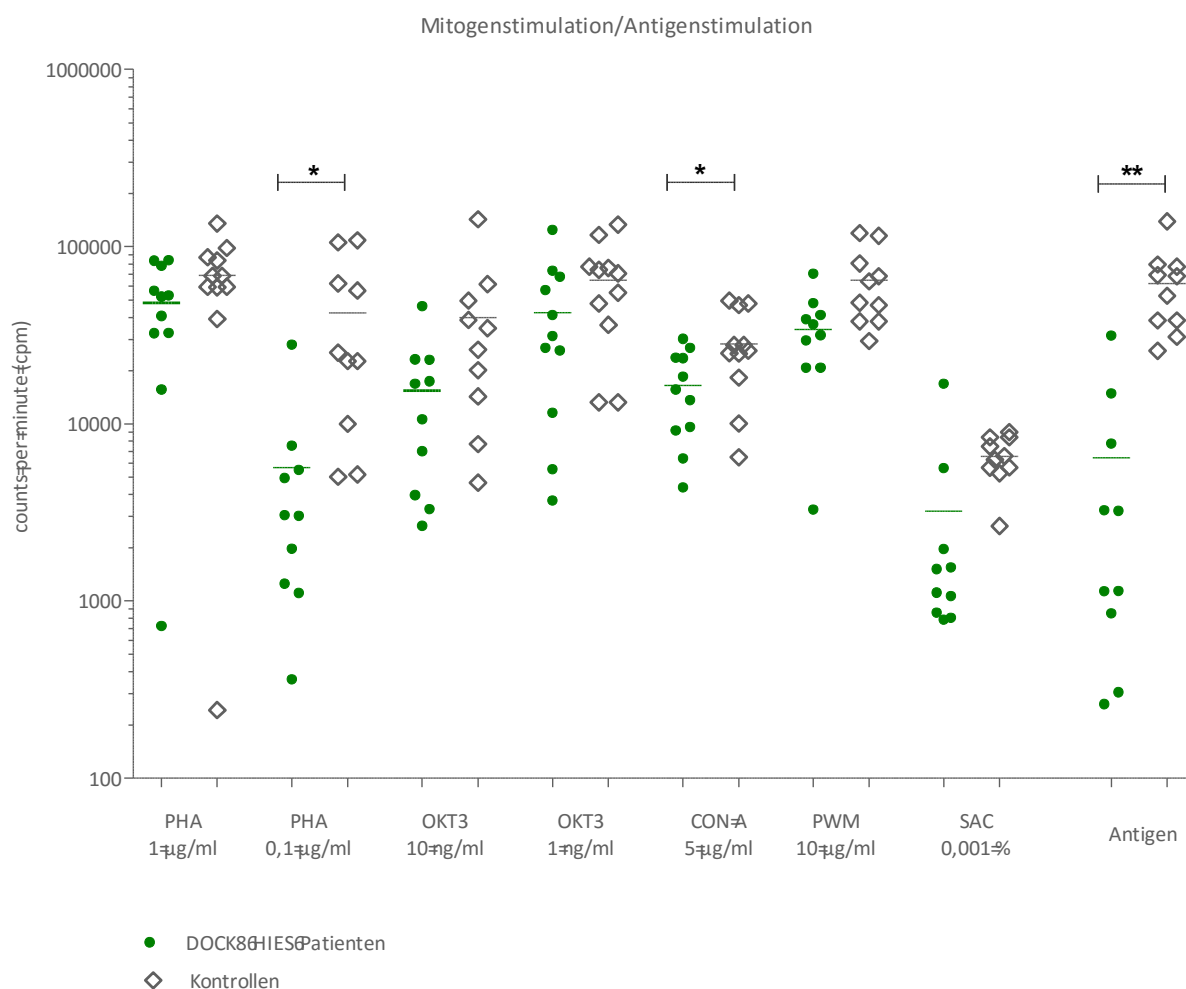


Abbildung 10: Darstellung Lymphozytenstimulation bei DOCK8-HIES-Patienten und Kontrollen

Bei der Quantifizierung der Lymphozyten nach Stimulation wird bei DOCK8-HIES-Patienten eine signifikant reduzierte Antwort auf die Mitogene PHA 0,1 μ g/ml und Concanavalin A (CON A) 5 μ g/ml mit p-Werten $\leq 0,01$ sowie auf das Antigen mit p-Werten $\leq 0,0001$ ersichtlich.

PHA = Phytohaemagglutinin, OKT3 = Muromonab CD3 Antikörper, CON A = Concanavalin A, PWM = Pokeweed mitogen, SAC = Staphylokokkus aureus Cowan I

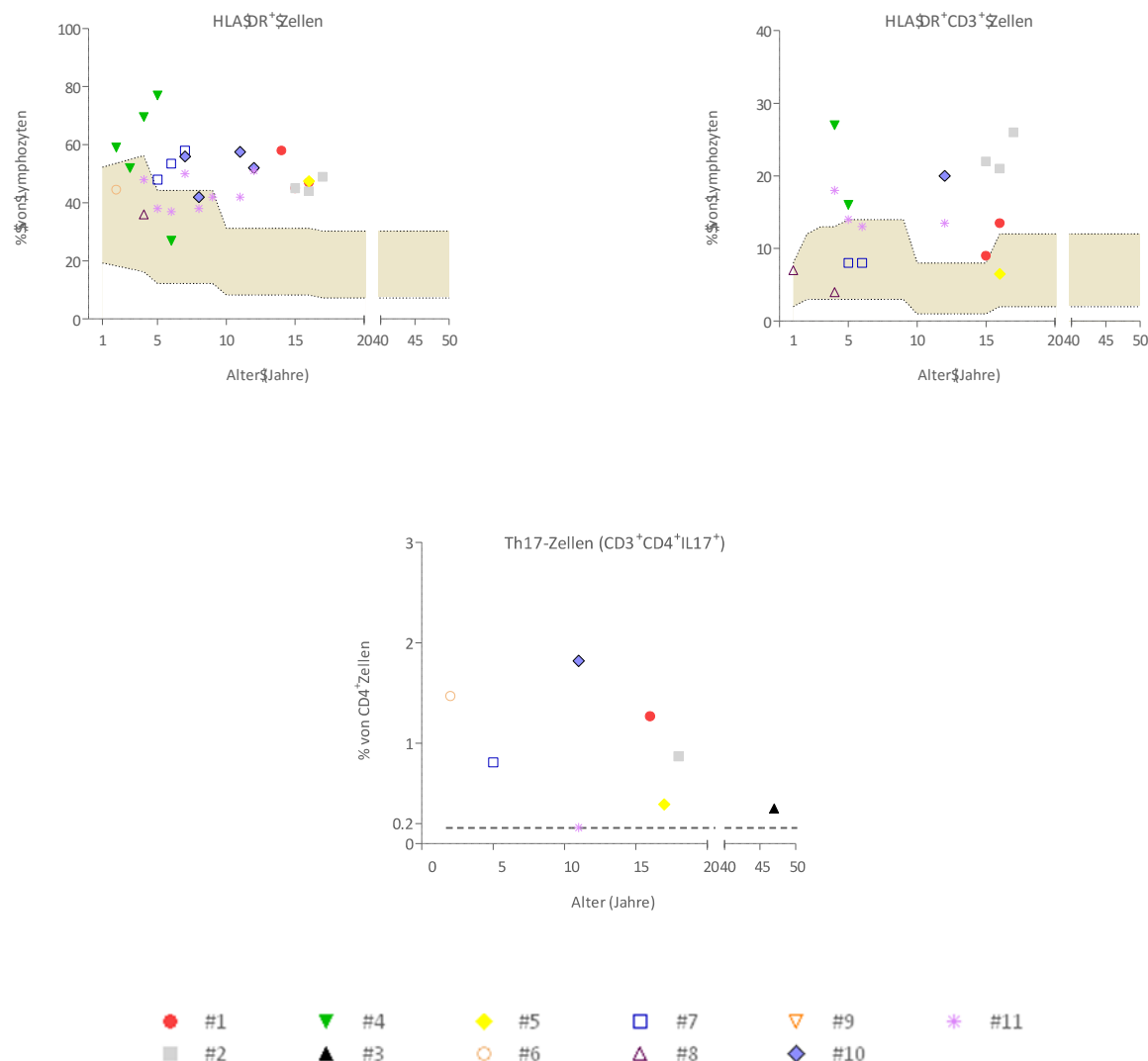


Abbildung 11: graphische Darstellung laborchemisch ermittelter Werte von DOCK8-HIES-Patienten

Leuko-, und Lymphozytensubgruppen der DOCK8-HIES-Kohorte (#1-10). Die gelblich unterlegten Bereiche stellen die Normwerte dar (0-19 Jahre: 10.-90. Perzentile [62], 19-25 Jahre 2,5.-97,5. Perzentile [63]). Die Graphiken zeigen alle erhobenen Werte bzw. Mehrfachmessungen zu verschiedenen Zeitpunkten.

Im Hinblick auf die vom Thymus abhängige T-Zell-Reifung wurde die Anzahl der Recent Thymic Emigrants (RTE) bestimmt, um somit eine quantitative Aussage bezüglich naiver T-Zellen machen und Rückschlüsse auf die Funktionsfähigkeit des Thymus ziehen zu können. Es zeigte sich hierbei eine Verminderung der Zellzahl bei drei von sieben Patienten der DOCK8-HIES-Kohorte und bei einem von sieben DOCK8-Wildtyp-Patienten.

Die Anzahl der regulatorischen T-Zellen, untersucht anhand CD4⁺CD25⁺FOXP3-Koexpression, ergab in der Gruppe der DOCK8-HIES-Patienten (n = 5) sowie in der Gruppe der DOCK8-Wildtyp-Patienten (n = 4) unauffällige Messwerte ohne signifikanten Unterschied zwischen beiden Kohorten und im Vergleich mit gesunden Kontrollen. Für die DOCK8-HIES-Patienten ließ sich ein Mittelwert (\pm SA) von 7,238 (\pm 2,847) % an CD4⁺ CD25⁺ FOXP3 koexprimierenden

Zellen ermitteln, in der DOCK8-Wildtyp-Gruppe ergab sich ein Mittelwert (\pm SA) von 6,417 (\pm 1,805) % bei einem Normwert von > 1 %.

Die B-Lymphozytengesamtzahl war bei zehn von elf Patienten der DOCK8-HIES-Gruppe und bei allen Patienten der DOCK8-Wildtyp-Gruppe innerhalb des Normbereichs, ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Kohorten konnte nicht festgestellt werden (Tabelle 9, Abbildung 12). Hinsichtlich der B-Lymphozyten-Subpopulationen zeigte sich in der DOCK8-HIES-Gruppe eine signifikante Verminderung der B-Gedächtniszellen (CD19⁺CD27⁺), vor allem die „Switched B-Gedächtniszellen“ waren deutlich unterhalb des Normbereiches (Tabelle 9).

Zellzahlen unterhalb der Norm zeigten sich bei den natürlichen Killer-Zellen (NK-Zellen) bei fünf von elf Patienten (45 %) der gesicherten AR-HIES Kohorte sowie bei einem von 14 Patienten (7 %) in der Wildtyp-Gruppe. Aus den erhobenen Werten ließ sich ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Kohorten ermitteln (Tabelle 9, Abbildung 12).

Zellen	CD-Klassifikation	DOCK8-HIES [mean \pm SD $\times 10^3$ Zellen/ μ l]	DOCK8-Wildtyp [mean \pm SD $\times 10^3$ Zellen/ μ l]	p-Werte	signifikanter Unterschied
T-Zellen	CD3 ⁺	0,670 \pm 0,329	2,157 \pm 1,163	0,000643	**
T-Helferzellen	CD3 ⁺ CD4 ⁺	0,401 \pm 0,244	1,272 \pm 0,760	0,001885	**
Zytotoxische T-Zellen	CD3 ⁺ CD8 ⁺	0,226 \pm 0,127	0,760 \pm 0,396	0,000412	**
NK-Zellen	CD16 ⁺ CD56 ⁺	0,123 \pm 0,082	0,302 \pm 0,194	0,011497	*
B-Zellen	CD19 ⁺	0,393 \pm 0,203	0,583 \pm 0,401	0,181360	-
B-Gedächtniszellen	CD19 ⁺ CD27 ⁺	0,011 \pm 0,005	0,043 \pm 0,031	0,010400	*
Switched B-Gedächtniszellen	CD19 ⁺ CD27 ⁺ IgM ⁻ IgD ⁻	0,003 \pm 0,002	0,012 \pm 0,007	0,009358	*
Eosinophile Granulozyten		7,446 \pm 1,143	3,70 \pm 2,263	0,122503	-

Tabelle 9: Zellzahlberechnung von DOCK8-HIES- und DOCK8-Wildtyp-Patienten

Dargestellt werden Mittelwerte (mean) und Standardabweichungen (SD) der Lymphozytensubgruppen sowie eosinophiler Granulozyten von DOCK8-HIES- und DOCK8-Wildtyp-Patienten. Ein p-Wert $\leq 0,01$ wurde als statistisch signifikant gewertet (*p $\leq 0,01$; **p $\leq 0,001$; *** p $\leq 0,0001$).

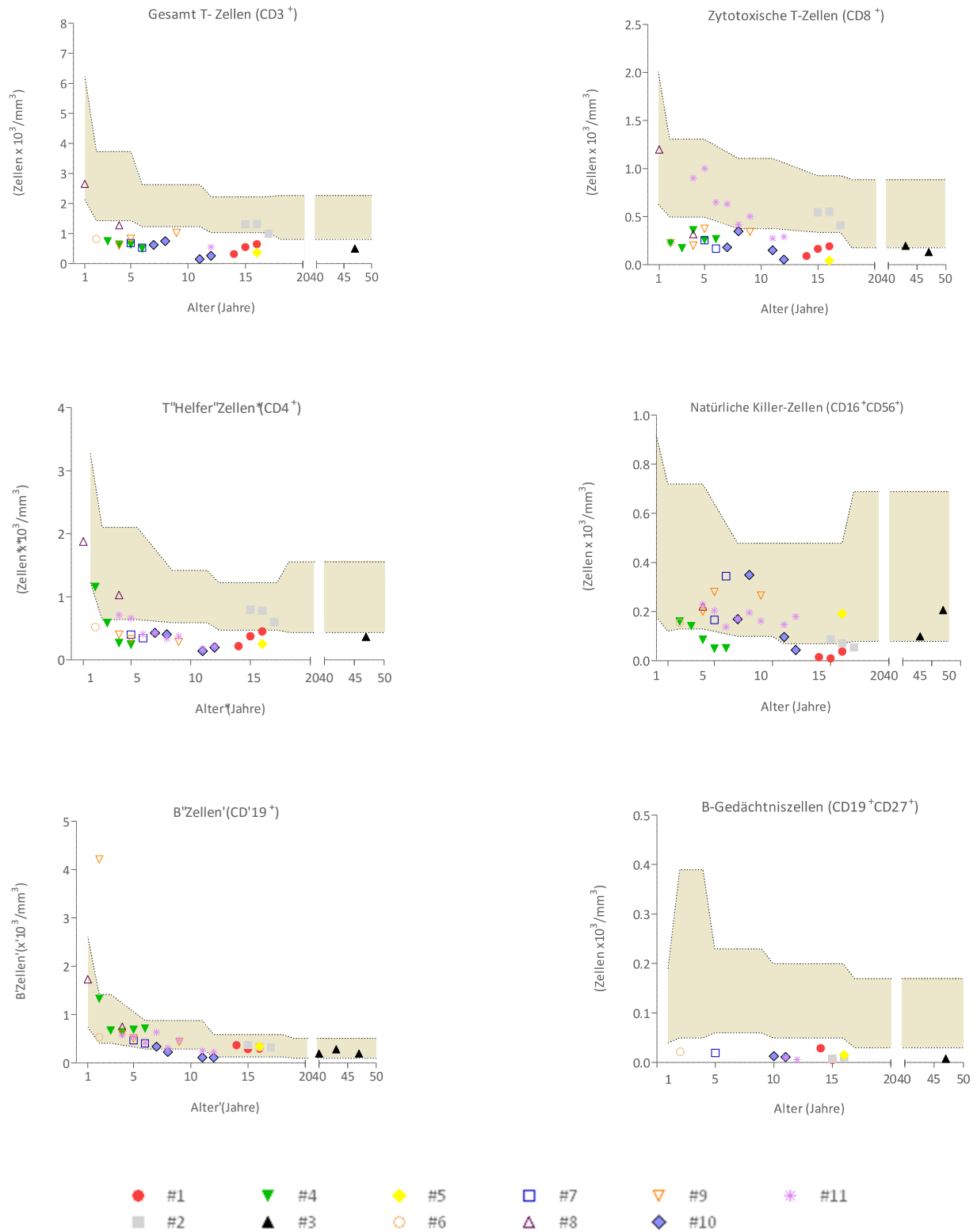


Abbildung 12: graphische Darstellung laborchemisch ermittelter Werte von DOCK8-HIES-Patienten

Leuko-, und Lymphozytensubgruppen der DOCK8 HIES Kohorte (#1-10). Die gelblich unterlegten Bereiche stellen die Normwerte dar (0-19 Jahre: 10.-90. Perzentile [62], 19-25 Jahre 2,5.-97,5. Perzentile [63]).

Die Graphiken zeigen alle erhobenen Werte bzw. Mehrfachmessungen zu verschiedenen Zeitpunkten.

3.5.1.3 Immunglobuline

Wie die Gesamtzellzahl der B-Lymphozyten zeigten sich auch die Werte der von diesen produzierten Immunglobuline (IgG) als weitgehend im Normbereich liegend, ebenso die IgG-Subgruppen. Nur vereinzelt fanden sich Werte außerhalb des Normbereiches. Bei zwei von zehn Patienten (18 %) der DOCK8-HIES-Gruppe ließen sich erhöhte Werte feststellen. Drei von 13 Patienten (23 %) der DOCK8-Wildtyp-Gruppe zeigten verminderte, zwei Patienten (15 %) derselben Kohorte erhöhte Werte für das Gesamt-IgG. Eine Darstellung der IgG-Subgruppen zeigt Tabelle 10.

Kohorte		IgG1 ↑	IgG1 ↓	IgG2 ↑	IgG2 ↓	IgG3 ↑	IgG3 ↓	IgG4 ↑	IgG4 ↓
DOCK8-HIES (n = 10)	% (Anzahl/Gesamt)	30 % (3/10)	0 % (0/10)	0 % (0/10)	20 % (2/10)	20 % (2/10)	10 % (1/10)	10 % (1/10)	10 % (1/10)
DOCK8-Wildtyp (n = 13)	% (Anzahl/Gesamt)	25 % (3/12)	8 % (1/12)	17 % (2/12)	8 % (1/12)	25 % (3/12)	17 % (2/12)	0 % (0/12)	17 % (2/12)

Tabelle 10: IgG-Subgruppen von DOCK8-HIES-Patienten im Vergleich zu DOCK8-Wildtyp-Patienten

Zur Analyse herangezogene Normwerte stammen von Schauer et al. [64]. Alle in diese Analyse miteinbezogenen Werte wurden erhoben, bevor eine intravenöse Immunglobulinsubstitution stattgefunden hat.

Für die statistische Auswertung der Immunglobuline wurden für IgA und IgG die jeweils aktuellsten Werte herangezogen, für IgE der höchste sowie für IgM der niedrigste Messwert. IgA zeigte sich bei fünf von 11 Patienten (46 %) der DOCK8-HIES-Patienten und bei zwei von 14 Patienten der DOCK8-Wildtyp-Gruppe erhöht. Ein signifikanter Unterschied der beiden Kohorten ließ sich nicht feststellen. IgM hingegen waren bei 73 % der Patienten der AR-HIES-Gruppe mit einem Mittelwert (\pm SA) von 32,9 (\pm 31) mg/dl erniedrigt. Verminderte Werte für IgM zeigten sich in der DOCK8-Wildtyp-Kohorte bei 21 % der Patienten (n = 3/14). IgE-Werte waren bei den DOCK8-HIES-Patienten stark bis sehr stark erhöht und lagen in einem Bereich von 2.534 - 62.429 mg/dl. Abgesehen von zwei Patienten der DOCK8-Wildtyp-Kohorte, bei welchen hochnormale IgE-Werte (bis zu 777 IU/ml) gemessen wurden, konnten auch hier sehr hohe IgE-Werte mit Spitzen von bis zu 59.400 IU/ml nachgewiesen werden (Tabelle 11, Abbildung 13).

	DOCK8-HIES [mean ± SD]	DOCK8-Wildtyp [mean ± SD]	p-Werte	signifikanter Unterschied
IgE [IU/ml]	26012,72 ± 16294,87	12348,1 ± 14861	0,043080	-
IgM [mg/dl]	32,88 ± 30,51	88,28 ± 57,39	0,010708	*
IgA [mg/dl]	158,53 ± 64,82	137,46 ± 119,45	0,617864	-
IgG [mg/dl]	1166,8 ± 295,255	849,86 ± 397,35	0,052980	-

Tabelle 11: Berechnung zu den Serum-Immunglobulinen von DOCK8-HIES- und DOCK8-Wildtyp-Patienten

Dargestellt werden Mittelwerte (mean) und Standardabweichungen (SD) der Immunglobuline in mg/dl bzw. IU/l für IgE von DOCK8-HIES- und DOCK8-Wildtyp-Patienten. P-Werte $\leq 0,01$ wurden als statistisch signifikant gewertet (* $p \leq 0,01$).

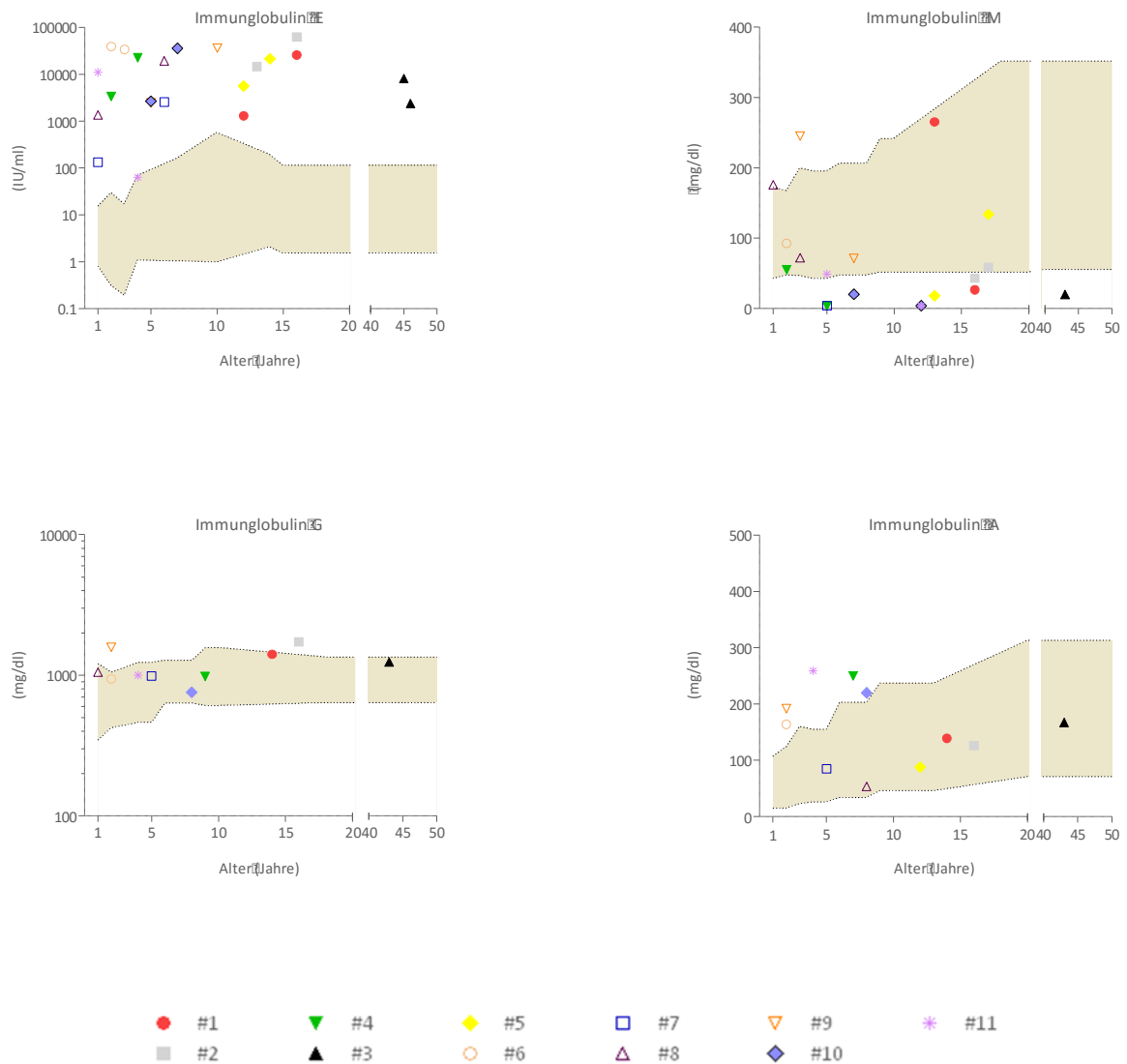


Abbildung 13: graphische Darstellung laborchemisch ermittelter Werte von DOCK8-HIES-Patienten

Absolutwerte der Immunglobuline IgE, IgA, IgG und IgM der DOCK8-HIES-Patienten. Die gelblich unterlegten Bereiche entsprechen den Normwerten und sind für IgE und IgM mit der zweifachen Standardabweichung ober- und unterhalb des Mittelwertes, sowie für IgG und IgA im 95 %-Referenzintervall angegeben [65-68].

Die Graphiken zeigen alle erhobenen Werte bzw. Mehrfachmessungen zu verschiedenen Zeitpunkten.

3.5.1.4 Spezifische Antikörper

Die Antikörperantwort auf die spezifischen Antigene *Haemophilus influenzae*, Pneumokokken, Diphtherie- und Tetanus-Antigen wurde für Patienten beider Kohorten analysiert und in den Tabellen 12 und 13 dargestellt.

In der Gruppe der DOCK8-HIES-Patienten zeigte sich, dass bei 89 % der Patienten ($n = 8/9$) kein Impfschutz oder ein fraglicher Impfschutz für mindestens drei der Erreger, gegen die immunisiert wurde, bestand. In der DOCK8-Wildtyp-Kohorte handelte es sich hierbei um fünf von 13 Patienten (38 %). Analysiert man Tabelle 12 in horizontaler Ebene, so zeigt sich, dass die Immunantwort auf Diphtherietoxin durchschnittlich die beste, die auf *Haemophilus influenzae* Polysaccharid die geringste Immunantwort hervorrief.

Spezifische Antikörper	#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7	#8	#9	#10	#11
Haemophilus influenzae	(-)	(-)	(+)	(-)	k.A.	(-)	(+/-)	k.A.	(-)	(+/-)	(+/-)
Pneumokokken	(+/-)	(+/-)	(+)	(+/-)	k.A.	(+/-)	(+/-)	k.A.	(+/-)	(+/-)	(+/-)
Diphtherie	(+/-)	(+)	(+)	(+/-)	k.A.	(+)	(+/-)	(+)	(+)	(+)	(+)
Tetanus	(-)	(-)	(+)	k.A.	k.A.	(+/-)	(-)	(+/-)	(+/-)	(+/-)	(+/-)
AK Bestimmung unter VIG	nein	ja	ja	ja	k.A.	nein	nein	nein	k.A.	nein	nein

Tabelle 13: Darstellung spezifischer Antikörper von DOCK8-HIES-Patienten (ID#1-11)

Spezifische Antikörper	#12	#13	#14	#15	#16	#17	#18	#19	#20	#21	#22	#23	#24	#25	#26
Haemophilus influenzae	(+/-)	(+)	(+)	(+)	(-)	(+/-)	(-)	(+)	(+)	k.A.	(+)	k.A.	(+/-)	(+/-)	(+)
Pneumokokken	(+)	(+)	k.A.	(+)	(+/-)	(+)	(+/-)	k.A.	(+)	k.A.	(+)	k.A.	(+/-)	(+)	(+/-)
Diphtherie	(+/-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+/-)	(+)	(+)	k.A.	(+/-)	k.A.	(+/-)	k.A.	(+)
Tetanus	(+/-)	(+/-)	(+/-)	(+/-)	(+/-)	(+/-)	(-)	(+/-)	(+)	k.A.	(-)	k.A.	(+/-)	(+/-)	(+)
AK Bestimmung unter VIG	nein	nein	nein	nein	ja	nein	nein	nein	nein	k.A.	nein	k.A.	nein	k.A.	ja

Tabelle 12: Darstellung spezifischer Antikörper (AK) von DOCK8-Wildtyp-Patienten (ID#12-26)

* Patienten haben schon mindestens einmal vor bzw. im Zeitraum der Messung intravenöses Immunglobulin G (IVIG) erhalten.

3.5.1.5 Granulozytenfunktion

Zum Ausschluss einer septischen Granulomatose (CDG), die auf einer Granulozytendysfunktion basiert, wurde bei insgesamt 14 Patienten ein Dihydrorhodamin-Test (DHR-Test) durchgeführt und einheitlich Normalwerte festgestellt.

Um Granulozytendysfunktionen im weiteren Sinne auszuschließen, wurde deren Fähigkeit zur Chemotaxis bei 4 DOCK8-HIES-Patienten untersucht und als vermindert festgestellt. Messungen (n = 2) in der Gruppe der DOCK8-Wildtyp-Patienten erbrachten unauffällige Werte.

3.5.1.6 T_H17-Entwicklung

Um darzustellen inwieweit eine DOCK8-Defizienz Auswirkung auf Zahl und Funktion von IL-17 produzierenden T-Zellen hat, wurde bei insgesamt 20 Patienten die T_H17-Zellzahl bestimmt. Werte von > 0,2 % der CD4⁺-Zellen galten als normal. In der DOCK8-HIES-Gruppe ließ sich ein Mittelwert (\pm SA) von 0,8925 (\pm 0,588) % gemessen an der Gesamt-T-Zellzahl ermitteln. Nur bei Patient ID#11 aus der DOCK8-HIES-Gruppe wurde mit einem Anteil von 0,16 % an IL-17 produzierenden T-Zellen ein Wert kleiner als 0,2 % festgestellt (Abbildung 11, Seite 45). In der DOCK8-Wildtyp-Gruppe wurde bei keinem der elf getesteten Patienten ein Wert < 0,2 % nachgewiesen, in dieser Kohorte wurde ein Mittelwert (\pm SA) von 0,934 (\pm 0,689) % berechnet.

3.5.1.7 pSTAT3-Phosphorylierung

Zur Analyse der Konsequenzen eines fehlenden oder nicht vollständig vorhandenen DOCK8-Proteins für die STAT3-Aktivierungskaskade, wurden PBMCs in vitro mit Interleukin-6 (IL-6) und Interleukin-10 (IL-10) stimuliert und intrazellulär phosphoryliertes STAT3-Protein (pSTAT3) gemessen. Weder zwischen den beiden Kohorten noch der Vergleich mit einer gesunden Kontrollgruppe erbrachte signifikante Unterschiede (Tabelle 14, Abbildung 14).

	DOCK8-HIES-Patienten (n=5)	DOCK8-Wildtyp-Patienten (n=5)	Kontrollen
PBMCs unstimuliert	3,79±0,36	4,71±2,84	4,61±1,58
MFI PBMCs-IL-6	1,01±0,59	1,05±1,25	1,52±1,19
	DOCK8-HIES-Patienten (n=5)	DOCK8-Wildtyp-Patienten (n=5)	Kontrollen
MFI PBMCs-IL-10	1,99±1,22	1,66±1,18	1,80±1,17

Tabelle 14: pSTAT3-Stimulation von DOCK8-HIES-Patienten, DOCK8-Wildtyp-Patienten und Kontrollen

Anteil unstimulierter PBMCs (Mittelwerte und Standardabweichungen aus unabhängigen FACS-Analysen) sowie Angabe der zugehörigen mittleren Fluoreszenzintensität (MFI)

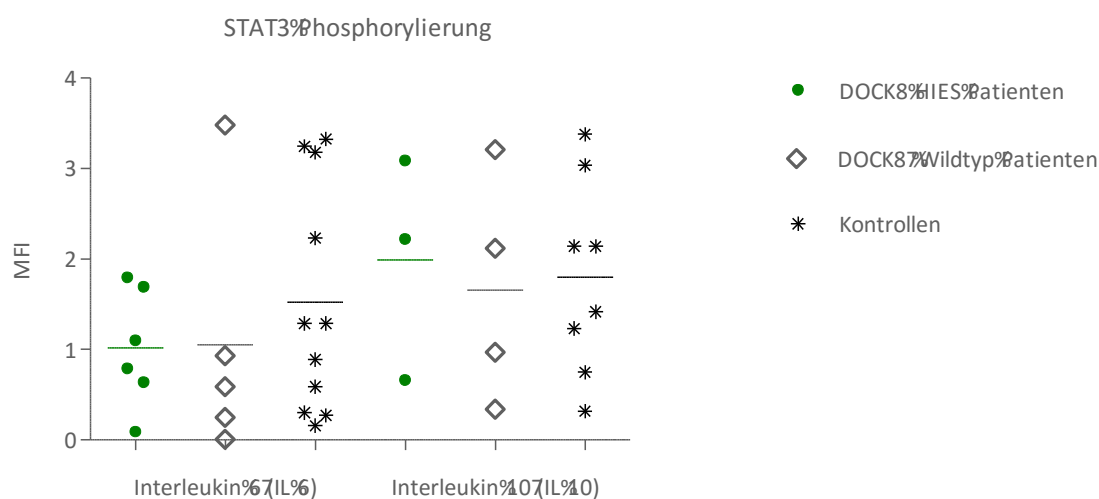


Abbildung 14: pSTAT3 bei DOCK8-HIES, DOCK8-Wildtyp und Kontrollen

Gezeigt werden die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) von mit Interleukin-6 und Interleukin-10 stimulierten PBMCs von Patienten und Kontrollen inklusive des Median. Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen.

3.5.2 Klinische Chemie

3.5.2.1 Insulin like Growth Factor-1 (IGF-1), Binding Protein 3 (BP-3)

Die laborchemische Bestimmung von IGF-1 und BP-3 erfolgte zum Ausschluss eines durch Wachstumshormonmangel bedingten Minderwuchses. Bei 57 % (n = 4/7) der Patienten zeigten sich Normwerte sowohl für IGF-1 als auch für BP-3. Bei zwei Patienten zeigte sich eine solitäre IGF-1-Reduktion, und bei einem Patienten (ID#10) waren sowohl IGF-1 als auch BP-3 vermindert. In der DOCK8-Wildtyp-Kohorte wurden bei fünf Patienten Messungen durchgeführt. Lediglich bei einem Patienten ließ sich ein verminderter Wert für IGF-1 feststellen.

3.5.2.2 Antinukleäre Antikörper (ANA)

Der Nachweis von Autoantikörpern zum Ausschluss von pathogenen Reaktionen autoimmuner Genese wurde bei neun von elf der DOCK8-HIES-Patienten durchgeführt. Bei 67 % der Patienten ergaben sich positive Testergebnisse die in einem Bereich von 1:60 und 1:240 lagen. Von insgesamt acht ANA-Bestimmungen in der DOCK8-Wildtyp-Gruppe war die Hälfte positiv, Antikörpertiter lagen in einem Bereich von 1:100 - 1:480.

4. DISKUSSION

Das Ziel dieser Studie war es Möglichkeiten aufzuzeigen, DOCK8-HIES-Patienten anhand ihrer klinischen Symptomatik und laborchemischer Parameter von anderen primären Immundefekten mit ähnlichem klinischen Erscheinungsbild, sowie von Patienten mit atopischer Dermatitis zu unterscheiden. DOCK8-HIES-Symptome sind vielfältig, nicht nur für dieses Krankheitsbild charakteristisch und ergeben oftmals erst in Zusammenschau aller Befunde ein schlüssiges Bild. Daraus resultiert die Schwierigkeit der Diagnosestellung.

Die klinische Analyse der Studienpatienten orientierte sich an schon zuvor bekannten für DOCK8-HIES charakteristischen Symptomen und setzte sich zum Ziel, diese für unsere Kohorte zu untermauern und zu spezifizieren sowie das Spektrum an Symptomen gegebenenfalls zu erweitern.

4.1 Mutationsanalyse

Auf Publikationen im Jahr 2009 [27, 28], welche erstmals Mutationen im *DOCK8*-Gen als Ursache für die autosomal rezessive Form des Hyper-IgE-Syndroms beschrieben, folgten fünf weitere Veröffentlichungen [60, 69-71], die sich mit DOCK8-Mutationen und deren klinischen Auswirkungen befassten (Tabelle 16a-c). Das menschliche *DOCK8*-Gen befindet sich auf Chromosom 9p24.3, hat eine Länge von ca. 250 kb und besteht, abhängig von der Isoform, aus 46-48 Exons [72].

Es wurden bis zur Fertigstellung dieser Arbeit 62 Patienten aus 41 Familien mit DOCK8-Defizienz beschrieben [27, 28, 60, 69, 70]. Insgesamt konnten 41 unterschiedliche homozygote oder compound heterozygote Mutationen identifiziert werden (Tabelle 15) und sind wie folgt aufgeteilt: Hinsichtlich der homozygoten Mutationen handelt es sich bei 19 davon um große Deletionen, bei 3 um Deletionen einzelner Exons bzw. um Mutationen einzelner Basen innerhalb eines Exons. 16 weitere Mutationen sind Punktmutationen, von denen sich 4 in der splice site befinden und zu out of frame nonsense-Mutationen sowie zu in frame nonsense-Mutationen führen. Bei den drei beschriebenen compound heterozygoten-Mutationen handelt es sich sowohl um Punktmutationen als auch um große Deletionen. Die genetischen Veränderungen von sechs Patienten unserer Kohorte (#1-#5, #9) wurden in den vergangenen Jahren schon beschrieben [27, 59, 60], vier zusätzliche Mutationen ließen sich im Zuge dieser Studie detektieren.

Bei diesen von uns zusätzlich nachgewiesenen Mutationen handelt es sich um drei große Deletionen, die zu einem Verlust von Exon 1-19 (ID#8), Exon 1-2 (ID#10) und Exon 1-26 (ID#11) führten, sowie um eine Deletion von zwei Basenpaaren in Exon 8 bei den Patienten ID#6 und ID#7. Der Exonverlust bei den Patienten ID#8 und ID#11 schließt die DHR1-Domäne mit ein, die Mutationen der Patienten ID#6, ID#7, ID#10 betreffen keine der beiden Domänen (Abbildung 5).

Die bis heute entdeckten großen Deletionen betreffen mitunter über das *DOCK8*-Gen hinausgehende Abschnitte des Chromosoms 9p. Hierzu gehört *C9orf66*, ein offener Leserahmen, *FAM 138C*, ein nicht codierendes RNA-Gen, sowie *FOXD4*, ein Transkriptionsfaktor, und *CBWD* (Abbildung 5). Auch die großen Deletionen unserer Kohorte haben ihren Ursprung proximal von Exon 1.

Für 17 der in der Literatur beschriebenen Mutationen wurden Westernblot-Analysen durchgeführt, bei keinem der getesteten Patienten konnte ein Protein nachgewiesen werden. Verantwortlich hierfür ist in vielen Fällen vermutlich der nonsense mediated decay, ein intrazellulärer Kontrollmechanismus, der für eukaryotische Zellen beschrieben wurde und dazu führt, mRNAs mit vorzeitigen Stop Codons, entstanden durch Mutationen, zu erkennen und diese abzubauen. Dies soll verhindern, dass unvollständige und somit möglicherweise für den Organismus schädliche Proteine synthetisiert werden [73]. Auch in unserer Kohorte zeigte sich, dass nur die Mutation der Patienten ID#1-3 nicht zu einem Verlust des *DOCK8*-Proteins führt.

Eine Korrelation zwischen Ausmaß der Deletion oder Lokalisation der verschiedenen Mutationen und klinischem Erscheinungsbild konnte bei unseren Patienten nicht festgestellt werden und wurde auch bei anderen *DOCK8*-HIES-Patienten nicht beschrieben.

Domäne	Exon	Mutation	Nomenklatur und Publikationen	Nukleotidaustausch	ASR-Austausch	Protein	Zhang et al. (n=11)	Engelhardt et al. (n=19)	Gatz et al. (n=12)	Bittrich et al. (n=12)	Al-Herz et al. (n=11)	Alsumaiti et al. (n=13)	Sawalha et al. (n=17)	eigene Patienten (n=11)
	1	10-23	DEL	Pt12-1(A)	c.921_2765del	3085_922Ldel	nein	1						
	1	5-24	DEL	Pt12-1(B)	c.426_3017del	109A_972Kdel	nein	1						
	-	5	PMT	Pt13-1(C)	c.538-15T>G	E180VfsX4	nein	1						
	-	10	PMT	Pt14-1,18-2(D)	c.1153G>T	E385X	nein	2						
	-	7	PMT	Pt15-1,15-2(E)	c.745C>T	R249X	nein	2						
	-	5	PMT	Pt16-1(F)	c.538-18C>G	E180VfsX4	nein	1						
	-	27	compound heterozygote	Pt17-1	c.3290delC c.3303_3304insTGGCTGCT	T1097KfsX29 A1120WfsX27	nein	1						
1,2	12	homozygote cryptic splice site	Pt18-1 ARH1011.4 Pt18-2 ARH1011.5 ARH1011.3	c.1214A>G, A>G+3bp del pos333Ex2	K405R, K473R	nein	2	+1						
1,2	11-48	DEL	ARH1014, ID#5			k.A		1						1
1	1-26	DEL	ARH1015			k.A		1						
1	1-25	DEL	ARH1016			k.A		2						
-	25	homozygote splice donor site	ARH1010, ID#3 ARH1010, ID#2 ARH1010, ID#1	c.3120+1G>T	V990_K1040del	ja		4						3
1,2	7	homozygote premature termination	ARH1012	A>T pos70Ex7	K271stop	k.A.		1						
-	46+	homozygote exon deletion-frameshift-stop	ARH1013	k.A.		k.A.		2						
1	17	homozygote splice acceptor site	ARH1008	splice acceptor site G>C	IVS16-1G>C	nein		1						
-	37	homozygote exon deletion	ARH009	k.A.		nein		1						
-	x-3/4	DEL	ARH1001	k.A.		k.A.		1						
1	x-125/26	DEL	ARH1002	k.A.		k.A.		1						
1	x-32/33	DEL	ARH1003	k.A.		k.A.		1						
k.A.	k.A.	DEL	ARH1004	k.A.		k.A.		1						
k.A.	k.A.	compound heterozygote deletion	ARH1005	k.A.		k.A.		1						
1	x-26	DEL	Patient ID#9	chrom9del0.910-388.506		nein			1					1
1,2	1-48	compound heterozygote deletion	Patient	chrom9del1.76581-15827, umfasst DOCK8 komplett		nein			1					
-	8			c.880_883delAAAG	Glu295GlyfsX13									
-	1-5	DEL	A35, A49, A53, A54, A59, A69	c.[1-?_404+?del]		nein			2		6			
-	33	PMT	A38	c.4070C>A	S1357*	nein					1			
-	2-12	DEL	A44	c.54-?_1285+?del		nein					1			
1	1-23	DEL	A52	c.1-?_2778+7del		nein					1			
2	44	PMT	F1(F1P1), F2(F2P1, F2P2, F2P3), F3(F3P1, F3P2, F3P3);	c.5625T>G	Y1875X	k.A.						7		
2	40	PMT	F4(F4P1), F5(F5P1), #4	c.5132C>A	S1711X	k.A.				1		2		1
1,2	7	homozygote splice donor site	F13(F13P1)	c.827+6T>C		nein						1		
1	x-12	DEL	F6, F7	codon209,111-228,227,192bp		nein						2		
1,2	x-48+	DEL	F10	codon209,111-127,670,193bp		k.A.						1		
-	8	DEL	ID#6, ID#7	c.850_851delCT	L284fsX292	nein						13		2
k.A.	k.A.	PMT	1-1	c.2401G>C	A746_S800del									1
k.A.	36	PMT	2-1, 2-2	c.4698C>G	Thr1566Xplus									2
k.A.	k.A.	PMT	3-1, 3-2	c.2389A>G	Val797Met									2
-	35	PTM	4-1, 4-2	c.4339T>C	Cys1447Arg									2
-	1-9	DEL	4-1, 4-2	(153,190_194,193)_ (315,772_322,										2
1	1-19	DEL	ID#8			nein								7
-	1-2	DEL	ID#10			nein								1
1	1-26	DEL	ID#11			nein								1

Tabelle 15: Vergleich Mutationsanalyse

Dargestellt werden alle bisher publizierten DOCK8-Mutationen sowie die zusätzlich im Rahmen dieser Arbeit detektierten Mutationen (fett gedruckt); PMT = Punktmutation (rot), DEL = Deletion (blau), compound heterozygot (grün); k. A. = keine Angaben; ASR = Aminosäuren; die rechts stehenden Zahlen geben an, wie viele Patienten in welchem Paper von dieser Mutation betroffen sind; Patienten unserer Studie werden mit ID#1-11 angegeben;

4.2 Klinik

Die Tabellen 16a-c (Seite 70, 71 und 77) zeigen die Symptomverteilung unserer DOCK8-HIES-Patienten und vergleichen sie mit den Ergebnissen sechs weiterer Studien, die sich ebenfalls mit der klinischen und immunologischen Symptomatik von DOCK8-HIES-Patienten befasst haben und ihre Ergebnisse in ähnlicher Weise darstellten [20, 27, 28, 69-71].

Patienten mit Verdacht auf ein Hyper-IgE-Syndrom (HIES) stellen sich primär meist mit einer charakteristischen klinischen Trias vor: frühkindliches Ekzem, Eosinophilie und erhöhtes Serum IgE. Hierbei handelt es sich jedoch um Symptome, die nicht nur für HIES, sondern auch für Erkrankungen des atopischen Formenkreises oder andere Immundefekte charakteristisch sind. So tritt dieser Symptomenkomplex auch bei 86 % unserer Wildtyp-Kohorte auf und zwar in ähnlich hoher Häufigkeit wie in Wildtyp-Kohorten anderer Studien [27, 69]. Nicht außer Acht zu lassen ist die Tatsache, dass diese Trias Einschlusskriterien in unserer Studie definiert, was die Häufigkeitsverteilung zusätzlich erklärt.

Das Comel-Netherton-, das Wiskott-Aldrich-, das IPEX- oder das Omenn-Syndrom sind ebenfalls primäre Immundefekte die, wie auch eine atopische Dermatitis, primär über diese Symptomentrias auffallen können [38-40, 74]. Ebenso kommt es bei all diesen Erkrankungen zu Dysregulationen und Fehlfunktionen des Immunsystems, was sich vor allem in einer erhöhten Anfälligkeit für verschiedenste Infektionen äußert. Das jeweilige Vollbild der Erkrankung lässt sich jedoch erst im weiteren Verlauf und mitunter verzögert erkennen, was für den Ausprägungsgrad des Erkrankungsbildes und die Therapiemöglichkeiten von Nachteil sein kann. Umso wichtiger ist es die verschiedenen Erkrankungen so früh wie möglich voneinander abzugrenzen.

Der NIH-Score (Abbildung 2), welcher zur vereinfachten Diagnosestellung des autosomal dominanten HIES (*STAT3*-Mutation) entwickelt wurde, kann zwar zur Orientierung herangezogen werden, ein DOCK8-HIES lässt sich damit jedoch nicht ausschließen. So zeigte sich bei sechs von elf unserer Patienten ein Wert unterhalb des für HIES definierten „cut off“ von 40 Punkten. Dies ist vergleichbar mit den Zahlen der Literatur, in der für 20-90 % der Patienten Werte < 40 angegeben wurden [27, 28, 69].

Wesentlich für DOCK8-HIES-Patienten ist das Auftreten von Symptomen des atopischen Formenkreises. Erstmals wurden 2009 Symptome wie beispielsweise Hypersensibilitäten gegenüber Nahrungsmitteln und Inhalationsallergenen, allergisches Asthma bis hin zur

Anaphylaxie beschrieben [28]. „Normale“ Atopiker mit stark ausgeprägtem Krankheitsbild präsentieren sich diesbezüglich mit einem dem DOCK8-HIES-Patienten sehr ähnlichen Phänotyp. Ebenso wird für Comel-Netherton und IPEX-Patienten wie auch für Patienten mit Mutationen im *PGM3*-Gen das Auftreten einer atopischen Diathese beschrieben [12, 13, 40, 74]. Hinsichtlich der Hauterscheinungen sollten auch das Wiskott-Aldrich-Syndrom (WAS) sowie das Omenn-Syndrom bedacht werden. Die atopische Dermatitis präsentierte sich bei allen Patienten der DOCK8-HIES-Gruppe als generalisiertes und stark ausgeprägtes Ekzem, wobei kein standardisiertes Instrument zur objektiven Beurteilung, weder in der Literatur noch in unserer Studie, angewandt wurde. Das Ekzem bei DOCK8-Patienten wird in der Literatur – anders als bei STAT3- HIES-Patienten – nicht streng als Neugeborenenekzem, sondern als ein sich in der Kindheit entwickelndes definiert [75]. Die Beschreibungen orientieren sich diesbezüglich mehr an dem Schweregrad der Ausprägung als am Entstehungszeitpunkt. Dies wurde auch für unsere Patienten so gehandhabt.

Anders verhält es sich bezüglich der Hautsuperinfektionen bzw. Abszessbildungen. Diese ließen sich mehr als doppelt so oft bei DOCK8-HIES-Patienten verglichen mit der DOCK8-Wildtyp Kohorte nachweisen. Es ist jedoch zu beachten, dass Hautsuperinfektionen von Abszessen im eigentlichen Sinn auch in der Literatur nur teilweise differenziert werden, was eine objektive Vergleichbarkeit nicht garantiert [28]. Wir mussten uns diesbezüglich auf Angaben aus Arztbriefen oder mündlich weitergegebene Information verlassen, was möglicherweise dazu führte, dass eine Abgrenzung zwischen superinfizierter Haut und tatsächlichem Abszess nicht einheitlich beurteilt werden konnte. Dennoch verbleibt die Häufigkeit bemerkenswert und vermittelt einen Eindruck von dem schweren Ausprägungsgrad der Hauterscheinungen von DOCK8-HIES-Patienten.

An der Haut zeigten sich in der DOCK8-HIES-Gruppe doppelt so häufig bakterielle Infektionen verglichen mit der DOCK8-Wildtyp-Gruppe. Der sowohl in der Literatur [27, 28, 75] als auch in unserer Kohorte am häufigsten nachgewiesene Erreger ist *Staphylokokkus aureus* (100 %). Als zweithäufigster Erreger wurde bei mehr als der Hälfte (54 %) unserer DOCK8-HIES-Patienten *Pseudomonas aeruginosa* isoliert. Pseudomonaden werden als Erreger opportunistischer Infektionen bezeichnet [76], gleichzeitig gelten sie als der zweithäufigste Erreger der Otitis externa [77].

Insgesamt ließ sich im Rahmen unserer Studie eine Vielzahl von Erregern nachweisen, die mitunter zwar selten sind, jedoch auch Teil der normalen Hautflora sein können. Neben

Staphylokokkus epidermidis und *hominis*, welche die Basis der Hautflora des Menschen darstellen, werden auch *Micrococcus spp.*, Corynebakterien, Brevibacterien, Propionibakterien und *Acinetobacter spp.* regelmäßig auf der Haut des Menschen nachgewiesen [78, 79]. *Staphylokokkus aureus* und *Streptokokkus pyogenes* werden wie auch Pseudomonaden oftmals vorübergehend beim gesunden Menschen als kolonisierende Erreger gefunden und können beispielsweise bei immunsupprimierten Patienten als Auslöser opportunistischer Infektionen eine Rolle spielen [80-82]. Der Nachweis von *Staphylokokkus aureus* ist zudem bei Patienten mit atopischer Dermatitis keine Seltenheit, kann gesunde wie auch betroffene Haut besiedeln und bis zu 80 % der Hautflora der betroffenen Patienten ausmachen [79]. Ein Charakteristikum für DOCK8-HIES stellen Hautsuperinfektionen mit *Staphylokokkus aureus* somit vermutlich nicht dar. Dies lässt sich auch durch den ähnlich häufigen Nachweis dieses bakteriellen Erregers in Hautabstrichen beider Kohorten veranschaulichen (67 % vs. 83 % in der DOCK8-Wildtyp-Gruppe). Alleine durch den Nachweis der aufgeführten Keime lässt sich kein Rückschluss auf die tatsächliche Pathogenität ziehen.

Rezidivierende, therapieresistente virale Infektionen der Haut werden als Charakteristikum für DOCK8-HIES angesehen [27, 28]. Die häufigsten Erreger sind DNA-Viren der Herpes-Gruppe, dazu zählen unter anderem das Herpes-Simplex-Virus (HSV1, HSV2, HHV6), das Varizella-Zoster-Virus (VZV) und in geringerem Umfang das Zytomegalie-Virus (CMV). Ebenso Humane-Papilloma-Viren (HPV) und das Molluscum-Contagiosum-Virus (MCV).

HSV-Infektionen präsentieren sich bei DOCK8-HIES-Patienten oft nicht nur lokal als orolabialer oder genitaler Herd, sondern klassischerweise in Form eines Ekzema herpeticatum, das sich großflächig auf meist schon vorgeschädigter Haut ausbreitet. Zusätzlich gelten HSV als Trigger für benigne, von Mukosa ausgehenden Tumoren [58, 83]. Das Vorkommen von Dellwarzen in ausgeprägter Form, hervorgerufen durch das MCV wurde bei annähernd der Hälfte (46 %) unserer DOCK8-HIES-Patienten festgestellt. In der Literatur liegen die Werte in einem Bereich von 8-46 % [1, 20, 27, 28, 69].

Es werden schwere Primärinfektionen von VZV ebenso beschrieben wie VZV-Reaktivierung die als Herpes Zoster in Erscheinung tritt. HPV-Infektionen resultieren in Veruccae vulgares oder planae sowie in Hauterscheinungen, die an Epidermodysplasia verruciformis erinnern. Auch anogenitale Feigwarzen (*Condylomata accuminata*) wurden regelmäßig beobachtet [75], in unserer DOCK8-HIES-Kohorte jedoch nicht festgestellt.

Pilzinfektionen mit *Candida albicans* sind nicht nur in unserer DOCK8-HIES-Kohorte mit einer Häufigkeit von 91 % (n = 10/11) stark vertreten, sondern gelten, wie auch viral bedingte Infektionen, als wichtiges Kriterium zur klinischen Definition des autosomal-rezessiven HIES. Andere Mykosen wie *Pneumocystis jirovecii*-Infektionen, Histoplasmose oder Infektionen mit *Cryptokokkus neoformans* sind hingegen eine Seltenheit [75].

Vergleicht man Candida-Infektionen der DOCK8-HIES-Patienten mit denen der Wildtyp-Gruppe so zeigt sich eine Häufigkeitsverschiebung in Richtung der DOCK8-HIES-Patienten mit 91 % zu 36 %. In der Literatur liegen die Angaben hierzu in einem Bereich von 11 % - 81 % (Tabelle 16a, Seite 70).

Als mögliche Ursache für die Anfälligkeit gegenüber Pilzinfektionen wird eine verminderte Anzahl an IL-17 produzierenden CD4⁺-T-Zellen (T_H17-Zellen) gesehen [18, 84-86], deren entscheidende Funktion unter anderem in der Abwehr von intrazellulären Bakterien und Pilzen besteht [87]. Verglichen mit dem STAT3-HIES sowie mit dem Krankheitsbild der chronisch-mucokutanen Candidiasis (CMC), welche differentialdiagnostisch diesbezüglich bedacht werden sollten, zeigt sich bei den DOCK8-HIES-Patienten wenn überhaupt nur eine milde bis moderate Verminderung der T_H17-Zellzahlen [51, 85, 88, 89].

Neben Infektionen der Haut sind auch Hypersensibilisierungen als aggravierender Faktor der Hauterscheinungen zu nennen. Umweltantigene (Bäume, Gräser), Medikamente, Hausstaubmilben und Latex sowie vor allem Allergien auf Nahrungsmittel wie Nüsse, Milch, Eier und Getreide wurden als Allergene bei DOCK8-HIES-Patienten festgestellt. Von 53 in der Literatur hinsichtlich Nahrungsmittelallergien untersuchten DOCK8-HIES-Patienten zeigten mehr als die Hälfte (55 %) positive Reaktionen [27, 28, 69].

Durch Allergene induzierte und durch erhöhtes Serum IgE, Eosinophilie sowie ein Ungleichgewicht der T_H1-, T_H2-Zellverteilung hervorgerufene Entzündungen sind charakteristisch für allergisch bedingte Erkrankungen (z.B. atopische Dermatitis) wie auch für das DOCK8-HIES [54, 90, 91]. Korrelationsanalysen (i.R. einer weiteren Dissertation, Daten werden hier nicht gezeigt) haben gezeigt, dass die T_H2-Zellzahlen von DOCK8-HIES Patienten mit dem Schweregrad der klinischen Manifestation (bezogen auf den NIH-Score und allergisch bedingte Symptomatik) korreliert. Es wird somit postuliert, dass das DOCK8-Protein eine Rolle hinsichtlich der Entstehung und Anfälligkeit von Allergien spielen könnte [54].

Möglicherweise spielt die erhöhte Anzahl an Interleukin-4 (IL-4) und Interleukin-13 (IL-13) synthetisierenden T_H2-Zellen, welche an DOCK8-defizienten Mäusen nachgewiesen wurde, hier eine zentrale Rolle [33]. IL-4, CD86 und CD154 stimulieren als Co-Faktoren die IgE-Synthese [92, 93], was das erhöhte Serum-IgE der DOCK8-HIES-Patienten erklären könnte. Zusätzlich wurde kürzlich eine positive Korrelation von Eosinophilie und IgE bei Patienten mit DOCK8-HIES festgestellt [54]. Ob und in welcher Form hier ein Zusammenhang besteht der auf die Pathogenese des erhöhten Serum-IgE schließen lässt, konnte noch nicht zufriedenstellend geklärt werden.

Eine über die Norm (> 500 Zellen/ μ l) ansteigende Anzahl an Eosinophilen ist jedoch charakteristisch für eine Vielzahl von Erkrankungen; neben dem atopischen Formenkreis gelten auch parasitäre Infektionen als ursächlich. Ebenso kann eine Eosinophilie als Arzneimittelnebenwirkung in Erscheinung treten und bei anderen primären Immundefekten wie dem Omenn-Syndrom von Bedeutung sein [94]. Auch hinsichtlich der Eosinophilie könnten T_H2-Zellen eine zentrale Rolle spielen. Hier besteht die Annahme, dass T_H2-Zellen (über IL-5) die Differenzierung, Aktivierung wie auch das in situ Überleben der eosinophilen Granulozyten induzieren [95].

Allergisches Asthma als Zeichen einer bronchialen Hyperreagibilität gilt als typisches Symptom für DOCK8-HIES-Patienten und wurde in unserer Kohorte bei über der Hälfte der Patienten (78 %) festgestellt. Mit Zahlen zwischen 33 und 55 % zeigte sich Asthma auch in anderen DOCK8-HIES-Kohorten (Tabelle 16a, Seite 70) als vergleichsweise häufiges Symptom.

Die Lunge betreffend belastet nicht nur ein hyperreagibles Bronchialsystem die Mehrheit der DOCK8-HIES-Patienten, sondern auch rezidivierende Infektionen der oberen und unteren Atemwege. Der Anteil an in der Literatur beschriebenen Infektionen der oberen Atemwege, inklusive rezidivierender Sinusitiden, Otitiden und oder Rhinitiden, lässt sich mit dem unserer Patienten vergleichen (Tabelle 16a, Seite 70). Die häufigen Rezidive sowie die Therapieresistenz der Infektionen führten oftmals zu Komplikationen wie dem Auftreten einer Mastoiditis oder der Entstehung von Bronchiektasen, welche jedoch sowohl in der Literatur (MW = 25 %) als auch in unserer Kohorte (9 %) vergleichsweise selten beschrieben werden [1, 20, 27, 28, 69]. Pneumatozelen, wie sie oft für STAT3-HIES-Patienten beschrieben werden, wurden bei keinem unserer Patienten festgestellt [10, 18]. Schwere Verläufe und resultierende Komplikationen machten bei einigen Patienten chirurgische Sanierungen des

Nasennebenhöhlenbereichs sowie die Einlage von Paukenröhrchen notwendig [27, 28]. Hinsichtlich des Erregerspektrums handelt es sich meist um grampositive und gramnegative Bakterien wie Pneumokokken und *Hämophilus Influenzae*; aber auch durch Erreger von opportunistischen Atemwegsinfektionen wie *Pneumocystis jirovecii* oder Viren, wie dem *respiratory syncytial virus* (RSV), wurden Atemwegsinfektionen hervorgerufen.

Wenn es um die Diagnosestellung von DOCK8-HIES geht, hat sich gezeigt, dass vor allem das wiederholte Auftreten von Atemwegsinfektionen den behandelnden Arzt aufhorchen lassen sollte. Vergleicht man unsere DOCK8-HIES-Kohorte mit der Wildtyp-HIES-Gruppe, so zeigen sich bei DOCK8-HIES-Patienten mehr als doppelt so häufig rezidivierende Atemwegsinfektionen (73 % vs. 21 %). Bei sechs von sieben DOCK8-HIES-Patienten wurde eine obstruktive Lungenbeeinträchtigung festgestellt, was die Beanspruchung des bronchopulmonalen Systems im Zuge der rezidivierenden Infektionen verdeutlicht.

Fasst man die bisher genannten Symptome zusammen, so beziehen sich diese vor allem auf die Haut (Ekzem, Allergien) sowie auf die Schleimhaut der Atemwege (Asthma, Infektionen) und den Gastrointestinaltrakt (Nahrungsmittelallergien).

Ein weiterer Fokus bezüglich viraler Infektionen sind die Augen mit Entzündungen der Konjunktiva und der Cornea. Verglichen mit DOCK8-Wildtyp-Patienten wurden bei DOCK8-HIES-Patienten mehr als doppelt so häufig ophthalmologische Infektionen beobachtet und könnten somit als diagnostisches Kriterium berücksichtigt werden.

Okuläre Infektionen, hervorgerufen durch Herpesviren sind generell keine Seltenheit. Neben Herpes-Simplex-Virus-Typ 2, dem Varizella-Zoster-Virus, Zytomegalie-, und Epstein-Barr-Virus spielt vor allem Herpes-Simplex-Typ 1 eine zentrale Rolle. Er wird für die Mehrzahl der durch Viren hervorgerufenen Krankheitsfälle verantwortlich gemacht und als Hauptursache für infektiös bedingte Blindheit in entwickelten Nationen angesehen [96]. Grundsätzlich wird postuliert, dass das Ausmaß und die Aggressivität einer HSV-Keratitis ein Zusammenspiel aus Virulenz des Erregers und der Abwehrfähigkeit des Immunsystems des Wirtes ist [97]. Über die Ausschüttung von Chemokinen und die dadurch herbeigeführte Aktivierung unterschiedlichster Zellen, sowohl der angeborenen als auch der erworbenen Immunabwehr, wird die Exazerbation einer durch HSV hervorgerufenen okulären Infektion bei Patienten mit intakter Immunabwehr meist unterdrückt [98]. Da für DOCK8-HIES-Patienten sowohl eine Lymphopenie, die CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen betrifft, als auch in geringerem Ausmaß eine Verminderung der natürlichen Killer-Zellen beschrieben wird [35,

72], lassen sich die schweren Verläufe einiger Patienten dieser Studie, die mitunter bleibende Folgeschäden mit sich brachten, erklären. Vor allem die Ähnlichkeiten hinsichtlich Lokalisation, Schwere des Verlaufs, des Erregerspektrums, des klinischen Erscheinungsbildes und der langwierigen und schwierigen Therapie der Patienten ID#1 und ID#5 sowie kürzlich veröffentlichte Fallberichte [58, 83] legen nahe, dass es sich hierbei nicht um Einzelfälle handelt.

Da mehr als die Hälfte der DOCK8-HIES-Patienten (55 %) schwere ophthalmologische Infektionen im Zuge ihres Krankheitsverlaufes durchmachen, sollte also entsprechend frühzeitig darauf reagiert werden. In der Literatur wurden bis heute insgesamt sechs DOCK8-HIES-Patienten mit HSV-Keratitis beschrieben [27, 28]. Angaben hinsichtlich der Schwere des Verlaufs oder bezüglich des Ansprechens auf Therapie wurden jedoch keine gemacht.

Im Gegensatz zu den ausgeprägten Lokalinfektionen scheinen systemische Infektionen besser unter Kontrolle gebracht werden zu können. Das Immunsystem von DOCK8-HIES Patienten scheint soweit intakt zu sein, dass sich CMV-Infektionen lediglich in milder Ausprägung zeigten und EBV-Virämien nur selten beobachtet wurden [27]. Dies gilt auch für die Patienten unserer Kohorte. Nur bei einer Patientin (ID#6) wurde CMV nachgewiesen. Problematisch können Infektionen mit diesen Erregern jedoch werden, wenn im Rahmen einer hämatogenen Stammzelltransplantation (HSCT) eine Immunsuppression erforderlich wird [99]. Das Auftreten einer Sepsis, einer Meningitis und/oder einer Osteomyelitis, die im Rahmen dieser Studie unter dem Überbegriff „schwere Infektionen“ zusammengefasst wurden, sind auf Grund des vergleichsweise seltenen Vorkommens in allen bisher publizierten DOCK8-HIES-Kohorten nicht als richtungsweisendes Diagnosekriterium anzusehen. Auch unsere Patienten wurden diesbezüglich befragt, eine Meningitis konnte jedoch bei keinem der Patienten in der Vorgeschichte eruiert werden. Insgesamt wird von vier Patienten berichtet, die im Verlauf ihrer Erkrankung eine Meningitis entwickelten. Diese war durch bakterielle Erreger wie Listerien, *Haemophilus influenzae* und Pneumokokken, das humane Zytomegalie-Virus (HZMV) und den Hefepilz *Cryptokokkus neoformans* [20, 27, 28] hervorgerufen worden. Vor allem HZMV und *Cryptokokkus neoformans* gelten als Erreger opportunistischer Infektionen [100]. Listerien zählen grundsätzlich zu den typischen Verursachern von Meningitiden bei Kindern < 1 Monat [101], werden allerdings auch als opportunistische Meningitiserreger dargestellt [102]. Angaben zum Erkrankungsalter der DOCK8-HIES-Patienten werden jedoch nicht gemacht [27]. Für Listerien als fakultativ

intrazellulärer Erreger existieren viele Studien in Bezug auf den Pathomechanismus und die Rolle des Immunsystems. Vor allem auf natürliche Killerzellen und Gedächtnis-CD8⁺-Zellen scheint das Abwehrsystem angewiesen zu sein [103-105], was die Auftretenswahrscheinlichkeit bei DOCK8-HIES-Patienten im Vergleich zu immunkompetenten Patienten zusätzlich erhöhen könnte. Dieser Zusammenhang muss jedoch wegen der geringen Anzahl an daraufhin untersuchten Patienten und der bislang nur am Mausmodell publizierten Studien noch kritisch gesehen werden.

Von einer Sepsis wird bei insgesamt fünf Patienten in der Literatur berichtet, hervorgerufen durch Erreger wie *Staphylokokkus aureus*, Klebsiellen, *Acinetobacter Baumannii*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* [20, 27, 28]. Die systemischen Infektionen unserer Kohorte wurden hervorgerufen durch Salmonellen und Klebsiellen. Von insgesamt 59 DOCK8-HIES-Patienten entwickelten demnach 12 % eine Sepsis. Auf die Definition einer Sepsis, beispielsweise ob die aktuellen Leitlinien zur Diagnosestellung einer Sepsis herangezogen wurden [106], wird im Rahmen der einzelnen Studien nicht näher eingegangen. Angaben zu charakteristischen Sepsis-Erregern differieren: so gelten Staphylokokken, Streptokokken, *Haemophilus Influenzae* und gramnegative Enterobakterien als häufige Sepsiserreger [107] ebenso wie Klebsiellen, Salmonellen, Pseudomonaden oder *Acinetobacter*-Species keine Seltenheit sind [108]. Somit stellt auch dieses Symptom vermutlich keine primäre Hilfe im Zuge der HIES-Diagnosestellung dar, reflektiert allerdings die Anfälligkeit für schwere Infektionen. Selbiges gilt für das Vorkommen einer Osteomyelitis, die insgesamt bei 7 % (n = 4) aller DOCK8-HIES-Patienten verzeichnet wurde [27, 28].

Autoimmunerkrankungen sind für primäre Immundefekte keine Seltenheit und können auch Patienten mit autosomal rezessivem Hyper-IgE-Syndrom betreffen. Einige Patienten entwickelten autoimmunhämolytische Anämien, ebenso wurden ZNS-Vaskulitiden beschrieben. Ob infektiöse, autoimmune und/oder autoinflammatorische Prozesse ursächlich waren, konnte jedoch nicht geklärt werden [27, 75]. Da vaskuläre Auffälligkeiten auch für das autosomal-dominante HIES bekannt sind [109, 110], wurde diskutiert, ob möglicherweise die Eosinophilie, welche charakteristisch für beide Entitäten des HIES ist, ursächlich für die Pathogenese von vaskulären Erkrankungen bei HIES-Patienten sein könnte. Eine Antwort auf diese Frage wurde bisher nicht gegeben und bedarf weiterer Forschung.

Symptome, die das zentrale Nervensystem betreffen, wurden erstmals von Renner et al. beschrieben, denen es gelang die autosomal-rezessive von der dominanten HIES-Form

klinisch zu unterscheiden [20]. Mehr als die Hälfte der Patienten (54 %) dieser Kohorte entwickelte eine neurologische Symptomatik, die Krankheitsbilder, wie eine Fazialisparese bis hin zur Hemiplegie, einschloss. Bei fünf der sieben Patienten war die neurologische Symptomatik vaskulär bedingt, bei drei Patienten könnte eine Infektion mitursächlich gewesen sein [20].

Im Verlauf wurden auch bei weiteren DOCK8-HIES-Patienten ZNS-Auffälligkeiten verzeichnet [27, 69], die entweder vaskulärer (Apoplex, Vaskulitis) oder infektiöser Genese (Meningitis, PML) waren. Bei den Patienten ID#1 und ID#8 wurden vaskuläre Ursachen als wahrscheinlichste Genese angegeben, welche jedoch ausschließlich magnetresonanztomographisch diagnostiziert wurden. Die Ursache der Fazialisparese von Patientin ID#9 konnte nicht eruiert werden, ebenso wenig, welche diagnostischen Maßnahmen damals eingeleitet wurden. Alle Angaben hierzu wurden aus Arztbriefen übernommen. Die Vermutung, dass es hier einen Zusammenhang mit den rezidivierenden Mittelohrentzündungen geben könnte, wäre unter anderem auf Grund der vollständigen und vergleichsweise schnellen Remission innerhalb von sechs Wochen durchaus schlüssig.

Die Diagnose einer progressiv multifokalen Leukenzephalopathie (PML), hervorgerufen durch das JC-Virus wurde bei insgesamt drei aller bisher diagnostizierten DOCK8-HIES-Patienten gestellt. Patienten unserer DOCK8-HIES-Kohorte waren jedoch nicht betroffen, die Leukenzephalopathie von Patientin ID#1 schien vaskulär bedingt zu sein. Die Seroprävalenz des JC-Virus wird für immunkompetente Erwachsene mit 39 % (Prävalenz mit dem Alter steigend) und für Kinder mit 21 % angegeben, wobei angenommen wird, dass die primäre Virusexposition im Kindesalter stattfindet [111]. PML entsteht durch die Reaktivierung einer latenten Virusinfektion und wird den demyelinisierenden Erkrankungen des Gehirns zugeordnet. Sie tritt selten auf, oftmals jedoch mit verheerendem Verlauf, und betrifft meist Patienten mit schwerer Immundefizienz, insbesondere AIDS-Patienten, aber auch Patienten mit hämatologischen Malignomen. Darüber hinaus zählen transplantierte Patienten und Patienten mit primären oder erworbenen Immundefekten zu den Betroffenen; so wurde z.B. ein Patient mit Wiskott-Aldrich-Syndrom und PML beschrieben [112, 113]. CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen spielen vermutlich eine entscheidende Rolle hinsichtlich der zellulären Abwehr gegen das JC-Virus von Seiten des Wirts [112], womit sich das häufige Vorkommen in dem vergleichsweise kleinen DOCK8-HIES-Kollektiv erklären ließe. Durch HSV oder VZV hervorgerufene Enzephalitiden wurden bisher bei keinem DOCK8-HIES-Patienten

beschrieben, ebensowenig wurde bei DOCK8-HIES-Patienten eine mentale Retardierung festgestellt.

Geistige Behinderung in Kombination mit Autoimmunerkrankungen (z.B. Vaskulitiden), fazialen Dysmorphien und klassischen DOCK8-HIES-Symptomen wie atopischer Dermatitis, allergischem Asthma, Nahrungsmittelallergien und erhöhtem Serum-IgE sollten an die erst kürzlich beschriebenen Mutationen im *PGM3*-Gen denken lassen [12, 13].

Vermindertes Wachstum, ist ein Symptom, das in der Literatur zwar erwähnt, jedoch bezüglich des autosomal-rezessiven HIES nicht näher definiert wird. Manche Autoren sprechen von „Entwicklungsverzögerung“, wobei hier keine genauere Definition gegeben wird [69, 70]. Es lässt sich somit kaum eine Aussage zur Vergleichbarkeit der unterschiedlichen Kohorten treffen. Minderwuchs in unserer Kohorte, definiert als Wachstumsabfall unter die dritte Perzentile, wurde bei mehr als der Hälfte der Patienten (55 %) festgestellt. Durch Überprüfung von IGF-1 und BP-3 wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass es sich vermutlich nicht um einen Mangel an Wachstumshormon handelt, da die Messwerte für IGF-1 als auch für BP-3 bei 57 % der Patienten (n = 4/7) im Normbereich lagen.

In der Literatur werden verschiedenste Thesen diskutiert, die sich mit dem Zusammenhang von Erkrankungen des atopischen Formenkreises und einem Wachstumsdefizit bzw. einer Entwicklungsverzögerung beschäftigen. Es wurde der negative Einfluss von Nahrungsmittelallergien auf Wachstum und Ernährungsgewohnheiten, jedoch ohne Ursachen zu definieren, beschrieben [114]. Des Weiteren wurde gezeigt, dass Kinder mit atopischer Dermatitis zwar Wachstumsdefizite aufweisen, diese aber bis in das Erwachsenenalter wieder ausgeglichen werden, womit vermutlich von einer Wachstumsverzögerung, jedoch nicht von einem Minderwuchs gesprochen werden sollte. Speziell für Asthma wurde diese Wachstumsverzögerung untersucht [115-117], wobei nicht das Asthma an sich, sondern die Atopie als ursächlich angenommen wird [118]. Eine verminderte adrenerge Androgensynthese, wie sie bei Asthmatikern festgestellt wurde, könnte hier zusätzlich von Bedeutung sein [119]. Der Einfluss von Glukocortikoiden wird kontrovers diskutiert, auch sie könnten eine Rolle spielen [120]. Eine weitere These ist die anhaltende allergische Entzündungsreaktion, welche selbst durch hypoallergene Ersatznahrung nicht komplett unterdrückt werden kann. Dies könnte über eine kontinuierliche Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen das Knochenwachstum negativ beeinflussen [121].

Diese Annahmen würden die These unterstützen, dass ein mögliches Wachstumsdefizit zwar Folge der Atopie, jedoch nicht der DOCK8-Defizienz an sich sein könnte.

Wie es für primäre Immundefekte bekannt ist, besteht auch für DOCK8-HIES-Patienten eine höhere Wahrscheinlichkeit für die Entstehung von Malignomen. 20 % aller DOCK8-HIES-Patienten entwickelten mindestens ein Malignom, zirka 10 % der Patienten erliegen ihrer Krebserkrankung [72]. In unserer DOCK8-HIES-Kohorte wurde einzig bei Patientin ID#8 ein Malignom diagnostiziert.

Das bei DOCK8-HIES-Patienten am häufigsten vorkommende Karzinom ist das Plattenepithelzellkarzinom der Haut, welches in Verbindung mit dem „Humanen Papilloma Virus“ (HPV) entstehen kann. Aufgetreten ist es primär bei Patienten, die eine lange Vorgeschichte von Infektionen mit HSV, HPV und Molluscum-contagiosum-Virus aufwiesen. Dies trifft auch für Patientin ID#8 zu [28]. Als weitere häufig diagnostizierte Malignome sind das diffuse B-Zell-Karzinom sowie das EBV⁺-Burkitt-Lymphom zu nennen. Von weiteren sporadisch aufgetretenen selteneren Malignomen, wie dem mikrozystischen Adenom und dem Leiomyom bei DOCK8-HIES-Patienten wird ebenfalls berichtet [28, 122]. Als mögliche Ursache für die vermutete Prädisposition zu Malignomen wird die beeinträchtigte CD8⁺-T-Zell-Funktion und damit die reduzierten Kontrollmechanismen der Tumorgenese diskutiert [28]. Des Weiteren könnten andere der DOCK180-Familie zugehörige Proteine eine Rolle hinsichtlich Karzinomentwicklung und -invasivität spielen [50, 86, 122-128]. Die bei fünf (ID#1, ID#5, ID#6, ID#7, ID#11) unserer DOCK8-HIES-Patienten aufgetretenen von Mukosa ausgehenden benignen, tumorösen Veränderungen werden auch in der Literatur beschrieben und als primär HSV-getriggert beurteilt. Als Ursache wird eine verminderte Anzahl an plasmazytoiden dendritischen Zellen genannt, die bei DOCK8-HIES-Patienten in diesem Zusammenhang festgestellt wurde. Plasmazytoide dendritische Zellen sind Teil des angeborenen Immunsystems und spielen eine Schlüsselrolle hinsichtlich der Immunantwort auf virale Infektionen, unter anderem indem sie große Mengen an Interferon-(IFN)- α synthetisieren. Die unzureichende Wirkung auf Therapieansätze mit Aciclovir und Valaciclovir sowie das sofortige Ansprechen auf die Therapie mit systemischem IFN- α -(2b) sprechen für diese These [58, 83].

DOCK8-HIES-Symptome	Engelhardt et al., 2009 n=21	Zhang et al., 2009 n=11	Al-Herzi et al., 2012 n=9	Alsum et al., 2012 n=13	Sanal et al., 2012 n=7	Renner et al., 2004 n=13	Eigene Ergebnisse n=11
Konsanguinität	86% (18/21)	36% (4/11)	100% (9/9)	92% (12/13)	100% (7/7)	100% (13/13)	82% (9/11)
Mittleres Alter [Jahre] [Altersspanne in Jahren]	14 (3-45,5)	16 (6-21)	4 (0,4-7)	k.A.	9 (2,5-15)	6 (0,5-16)	17 (3-47)
Geschlecht [weiblich:männlich]	11:10	7:4	6:3	k.A.	4:3	7:4	7:4
Ekzem	100% (21/21)	100% (11/11)	100% (9/9)	77% (10/13)	100% (7/7)	100% (13/13)	100% (11/11)
IgE größer 1000 IU/ml	100% (21/21)	91% (10/11)	67% (6/9)	100% (13/13)	83% (5/6)	100% (10/10)	100% (11/11)
Eosinophilie >500 cells/µl oder >5%	90% (18/20)	91% (10/11)	100% (9/9)	100% (13/13)	k.A.	100% (10/10)	100% (11/11)
Rezidivierende Entzündungen obere Atemwege [Sinusitis, Rhinitis, Otitis]	81% (17/21)	73% (8/11)	89% (8/9)	62% (8/13)	k.A.	100% (13/13)	82% (9/11)
Entzündungen untere Atemwege [Pneumonie, Mand.]	95% (20/21)	73% (8/11)		31% (4/13)	71% (5/7)	100% (12/12)	100% (11/11)
Rezidivierende Entzündungen untere Atemwege [>1 Pneumonie]	67% (14/21)	55% (6/11)	0% (0/9)	23% (3/13)	k.A.	83% (10/12)	82% (9/11)
Bronchiektasien	19% (4/21)	27% (3/11)	22% (2/9)	31% (4/13)	14% (1/7)	0% (0/13)	9% (1/11)
Abszesse der Haut	81% (17/21)	46% (5/11)	67% (6/9)	69% (9/13)	k.A.	100% (13/13)	73% (8/11)
Infektionen mit HSV 1/2	48% (10/21)	64% (7/11)	34% (3/9)	38% (5/13)	100% (4/4)	62% (8/13)	91% (10/11)
Infektionen mit HHV3/8/VZV	14% (3/21)	27% (3/11)	22% (2/9)	8% (1/13)	17% (5/7)	15% (2/13)	36% (4/11)
Infektionen mit MCV	33% (7/21)	46% (5/11)	22% (2/9)	8% (1/13)	29% (2/7)	31% (4/13)	46% (5/11)
Infektion mit Candida albicans	81% (17/21)	55% (6/11)	11% (1/9)	46% (6/13)	14% (1/7)	77% (10/13)	91% (10/11)
Allergien	48% (10/21)	100% (11/11)	56% (5/9)	54% (7/13)	57% (4/7)	k.A.	100% (11/11)
Nahrungsmittelallergien	48% (10/21)	82% (9/11)	56% (5/9)	46% (6/13)	57% (4/7)	k.A.	100% (11/11)
Asthma bronchiale	33% (7/21)	55% (6/11)	44% (4/9)	54% (7/13)	k.A.	k.A.	73% (8/11)

Tabelle 16a: Vergleichstabelle Klinik

Die als Bruch aufgeführte Zahlenangabe entspricht der Anzahl der Patienten mit diesem Symptom (Zähler) und der Gesamtzahl der Patienten, für die dieses Symptom ausgewertet wurde (Nenner). Die Prozentzahl beschreibt die relative Häufigkeit. „k. A.“ bedeutet, dass wegen fehlender Analyse oder Zahlenangabe keine Auswertung möglich war.

DOCK8-HIES-Symptome	Engelhardt et al., 2009 n=21	Zhang et al., 2009 n=11	Al-Herzi et al., 2012 n=9	Alsum et al., 2012 n=13	Sanal et al., 2012 n=7	Renner et al., 2004 n=13	Eigene Ergebnisse n=11
Sepsis	9% (2/21)	9% (1/11)	k. A.	k. A.	k. A.	8% (3/13)	18% (2/11)
Osteomyelitis	9% (2/21)	18% (2/11)	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.	18% (1/11)
Meningitis	19% (4/21)	9% (1/11)	k. A.	k. A.	k. A.	8% (1/13)	0% (0/11)
ZNS-Beteiligung [ausgenommen Meningitis]	24% (5/21)	0% (0/11)	k. A.	23% (3/13)	14% (1/7)	46% (6/13)	37% (3/11)
ZNS-vaskuläre Genese [Vaskulitis, Infarkt]	14% (3/21)	0% (0/11)	k. A.	15% (2/13)	k. A.	38% (5/13)	9% (1/11)
Minderwuchs	k. A.	27% (3/11)	22% (2/9)	46% (6/13)	29% (2/7)	k. A.	55% (6/11)
Maligne Tumoren	10% (2/21)	27% (3/11)	0% (0/9)	15% (2/13)	29% (2/7)	k. A.	9% (1/11)
Squamöses Karzinom	5% (1/21)	18% (2/11)	0% (0/9)	0% (0/13)	0% (0/7)	k. A.	0% (0/11)
Lymphom	5% (1/21)	9% (1/11)	0% (0/9)	0% (0/13)	14% (1/7)	k. A.	0% (0/11)

Tabelle 16b: Vergleichstabelle Klinik

Die als Bruch aufgeführte Zahlenangabe entspricht der Anzahl der Patienten mit diesem Symptom (Zähler) und der Gesamtzahl der Patienten, für die dieses Symptom ausgewertet wurde (Nenner). Die Prozentzahl beschreibt die relative Häufigkeit. „k. A.“ bedeutet, dass wegen fehlender Analyse oder Zahlenangabe keine Auswertung möglich war.

4.3 Immunologie

Das autosomal-rezessive Hyper-IgE-Syndrom war die erste beschriebene Erkrankung, die durch Mutationen in einem der DOCK180 Familie zugehörigen Protein hervorgerufen wird [86]. Ein nicht korrekt funktionierendes bzw. fehlendes DOCK8-Protein hat weitreichende Folgen sowohl für das angeborene als auch das erworbene Immunsystem. Hierzu zählt das Auftreten einer Lymphopenie und einer reduzierten Lymphozytenproliferation, eine reduzierte NK-Zell-Zytotoxizität, vermindertes Immunglobulin M im Serum, B-Gedächtniszellzahlverminderung sowie eine Beeinträchtigung der Synthese von spezifischen Antikörpern [1, 27, 28, 35, 69, 71, 129]. Eine mögliche Erklärung für die sowohl bei uns als auch in der Literatur beobachtete Lymphopenie gaben Untersuchungen zur Lymphozytenproliferation sowie zur Lymphozytendifferenzierung von CD4⁺-T-Zellen in T_H1- und T_H2-Zellen [33, 54, 75]. Die Tatsache, dass DOCK8 zur Familie der Rho-GPTasen gehört, welche wichtig für T-Zell-Aktivierung, -Proliferation und deren Überleben sind, könnte diesbezüglich eine Rolle spielen [130-132]. Die Fähigkeit zur Proliferation von CD8⁺-T-Zellen erwies sich als eingeschränkt. Untersuchungen zur Proliferationsfähigkeit von CD4⁺-T-Zellen zeigten hingegen keine Auffälligkeiten [27, 28]. Gesamt T-Zellzahl (CD3⁺), CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen sowie NK-Zellen unserer DOCK8-HIES-Kohorte erwiesen sich, wie auch in der Literatur beschrieben, als mehrheitlich vermindert und zeigten signifikante Unterschiede im Vergleich zu der DOCK8-Wildtyp-Gruppe. Des Weiteren wurde für unsere Patienten (i.R. einer weiteren Dissertation, Daten werden hier nicht gezeigt) eine Einschränkung hinsichtlich der Differenzierung von aktivierten CD4⁺-Zellen in T_H1- und T_H2-Zellen festgestellt [54].

Für die Abwehr bakterieller Infektionen und Mykosen sind unter anderen T_H1- und T_H17-Zellen über die Ausschüttung von IFN- γ und IL-17 zuständig [133, 134]. Die erhöhte Anfälligkeit von STAT3-HIES-Patienten für *S. aureus* und *Candida albicans* wird auf verminderte T_H17-Zellzahlen zurückgeführt [51, 88]. Dies wurde vereinzelt auch für DOCK8-HIES-Patienten festgestellt [27, 84]. Im Gegensatz dazu zeigen unsere Ergebnisse, dass sowohl Absolutwerte dieser beiden Zellgruppen [54], als auch die Prozentzahl der T_H17-Zellen bei 10 von 11 Patienten unserer DOCK8-HIES-Kohorte im Normbereich lagen (Abbildung 11, Seite 45). Studien zufolge wirkt sich der *DOCK8*-Gendefekt im Vergleich zu Mutationen im *STAT3*-Gen erst in einem späteren Stadium der T_H17-Differenzierung negativ aus und führt zudem zu vergleichsweise milden Reduktionen der T_H17-Zellzahlen [86]. Zufriedenstellende Erklärungen hinsichtlich des Effektes einer DOCK8-Mutation auf T_H17-

Zellen und der vermutlich daraus resultierenden Anfälligkeit gegenüber Pilzinfektionen gibt es jedoch bis heute noch nicht [75]. Auch unsere Ergebnisse suggerieren, dass der Zusammenhang einer DOCK8-Defizienz und verminderter T_H17 -Zellzahl nicht in dem Maße gegeben ist wie z.B. bei STAT3-HIES, da sich lediglich bei zwei von neun Patienten (22 %) eine T_H17 -Zellzahlreduktion feststellen ließ.

Mausmodelle machten es möglich die Anfälligkeit für rezidivierende Virusinfektionen von DOCK8-Patienten besser zu verstehen [31-34]. So wurde dargestellt, dass nicht die primäre Immunantwort auf virales Antigen den limitierenden Faktor für eine suffiziente Abwehr darstellt. Diese Annahme wird dadurch gestützt, dass die Expression von Perforin und Granzyme B als Marker für Apoptosefähigkeit [135] weder in der Literatur [28] noch in unserer Studie signifikante Unterschiede zwischen DOCK8-HIES- und DOCK8-Wildtyp-Kohorte zeigte. Vielmehr wurde im Zuge weiterer Studien festgestellt, dass die antigenspezifische $CD8^+$ -T-Zellzahl und -Antwort bei Reinfektionen vermindert ist, was zu der Annahme einer defekten Funktion der $CD8^+$ -T-Gedächtniszellen führt [31, 33].

Die verminderte Produktion von antiviralen Zytokinen durch DOCK8-defiziente $CD8^+$ -T-Zellen wurde ebenso untersucht [28] wie auch dendritische Zellen hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur Chemotaxis und Synthesefähigkeit von Typ I Interferon (IFN) [58, 83, 136].

Relevante Ergebnisse gab es hinsichtlich der Zytokinsynthese: Bei mit PHA stimulierten PBMCs von DOCK8-defizienten Patienten und bei anti-CD3/CD28-stimulierten natürlichen Killer-T-Zellen DOCK8-defizienter Mäuse zeigte sich eine verminderte IFN- γ -Ausschüttung [70, 137]. Auch für IFN- α wurden entsprechende Untersuchungen durchgeführt, jedoch unterschiedliche Ergebnisse festgestellt: Jabara et al. konnten keinen Unterschied zwischen DOCK8-HIES-Patienten und Kontrollen hinsichtlich IFN- α -Ausschüttung feststellen, nachdem man PBMCs mit CpG-A-DNA (ODN 2216) stimulierte [37]. Eine andere Studie konnte hier deutliche Unterschiede erkennen und vermutet eine verminderte Anzahl an plasmazytoiden dendritischen Zellen (pDCs) als Ursache [83].

Zusätzlich wichtig für die Abwehr viraler Infektionen sowie für die Eindämmung der Tumorgenese sind natürliche Killer-Zellen (NK-Zellen). Die absolute Anzahl der NK-Zellen DOCK8-defizienter Patienten wurde primär als im Normbereich liegend beschrieben [20, 27, 28]. Im Gegensatz dazu zeigen unsere Daten eine Verminderung der absoluten NK-Zellzahlen bei 45 % der DOCK8-HIES-Patienten. Erst Untersuchungen hinsichtlich der NK-Zell-Funktion ließen eine Beeinträchtigung der NK-Zell-Zytotoxizität erkennen [35]. Es wurde ein

Zusammenhang hergestellt aus der Tatsache, dass DOCK8-Protein CDC42 (cell division circle 42) aktiviert [36] und, dass CDC42 gemeinsam mit dem Wiskott-Aldrich-Syndrom-Protein (WASP) wichtig für die NK-Zell Zytotoxizität sind [138]. Die erhöhte Anfälligkeit für virale Infektionen und die Entstehung von Malignomen hängt somit vermutlich von mehreren Faktoren ab. Hierzu zählt die Verminderung der CD8⁺-Zellen und der NK-Zellen, die reduzierte NK-Zell-Zytotoxizität sowie die reduzierte IFN- γ - und IFN- α -Ausschüttung.

Ein weiterer Ansatz, um eine Erklärung für die Verminderung der T-Zellzahl und Funktion zu finden, erfolgte auf „Thymusebene“. Ein Marker für normale T-Zellentwicklung sind „T cell receptor excision circles“ (TRECs). Eine Verminderung oder ein fehlender Nachweis von TRECs kann Hinweis für ein SCID (severe combined immunodeficiency) sein und wird auch im Rahmen des Neugeborenen Screenings angewandt [139-142]. Vereinzelt wurden auch für DOCK8-HIES-Patienten defiziente TRECs beschrieben [143]. CD31⁺-Zellen gelten als Marker für naive mit TRECs beladene T-Zellen, die erst kürzlich den Thymus verlassen haben und noch Antigen-unerfahren sind, sogenannte Recent thymic emigrants (RTE) [52]. Um die These einer möglicherweise beeinträchtigten Thymusfunktion als Ursache für die T-Zell-Defizienz zu untermauern, wurde in unserer Studie die Anzahl der RTEs bestimmt und bei 43 % der Patienten eine Verminderung festgestellt.

Auch die Regulatorfunktion von T-Zellen wurde untersucht. Es gibt mehrere Subgruppen von regulatorischen T-Zellen (Tregs), von denen jedoch CD4⁺-CD25⁺- Zellen die entscheidende Rolle in Bezug auf das immunologische Gleichgewicht und die Immuntoleranz zugeschrieben wurde [144-146], sowie als wesentlich für die Immunantwort u.a. hinsichtlich Autoantigenen angesehen wird [147]. Der Transkriptionsfaktor FOXP3 wurde als entscheidend für die Entwicklung und Funktionsfähigkeit von CD4⁺-CD25⁺-Tregs erkannt [148-154]. Die Bestimmung von FOXP3⁺-CD4⁺-CD25⁺ erfolgte zur Abklärung möglicher Autoimmunität, wie sie für einige DOCK8-HIES-Patienten beschrieben wurde [27]. Primär ließen sich jedoch weder bei uns noch in vorangehenden Studien [28] Veränderungen von FOXP3⁺-CD4⁺-CD25⁺-Zellen feststellen. Erst nachdem beschrieben wurde, dass FOXP3 auf Grund seiner variablen Expression nicht als alleiniger Marker zur Identifikation von Tregs herangezogen werden sollte [147], änderte sich die Datenlage. Neueste Studien konnten nun sowohl eine Verminderung wie auch eine Dysfunktion von DOCK8-defizienten Tregs (CD3⁺CD4⁺CD25^{hi}CD127^{lo}FOXP3⁺) feststellen. Es wurde somit postuliert, dass eine

verminderte Anzahl an Tregs mitursächlich für die insuffiziente periphere B-Zell-Toleranz sein könnte [155].

Neben der beschriebenen Lymphopenie gelten Anomalien bei Antikörpern als zweites großes immunologisches Charakteristikum für DOCK8-Patienten. Die zugehörigen Mechanismen sind dennoch nicht vollständig verstanden. Angefangen von der initialen Aktivierung des B-Zell-Rezeptors, über den Vorgang der Migration von B-Zellen in sekundäre lymphatische Organe, bis hin zu T-Zell-vermitteltem Isotyp switching – in all diesen Prozessen könnte sich eine DOCK8-Defizienz als negativ beeinflussender Faktor hinsichtlich der Antikörpersynthese auswirken [86, 156].

B-Zellen, als Hauptakteure der humoralen Immunabwehr lagen bei DOCK8-HIES-Patienten in bisherigen Studien wie auch in unserer Analyse mehrheitlich im Normbereich [27, 70].

In Mausmodellen wurde gezeigt, dass es zwar keine Einschränkung hinsichtlich der T/B-Zellinteraktion gibt, dass DOCK8-defiziente Zellen jedoch nicht in den Keimzentren der Lymphfollikel persistieren und somit auch keinen Affinitätsreifungsprozessen unterzogen werden können. Das erklärt möglicherweise die signifikant verminderten B-Gedächtniszellzahlen sowie den Mangel an spezifischen Antikörpern bei DOCK8-HIES-Patienten unserer und anderer Studien [28, 34, 37]. Es wurde gezeigt, dass das Immunsystem der Mehrheit der Patienten auf mindestens drei der verabreichten Impfstoffe entweder nicht oder nur inadäquat reagiert. Zusätzlich stellte man fest, dass B-Zellen von DOCK8-HIES-Patienten auf den Toll-like-rezeptor 9 (TLR9) Liganden CpG nicht suffizient ansprechen, was eine reduzierte Proliferation sowie eine verminderte Synthese von IgM und IgG zur Folge hat [28, 34, 37]. Dies unterstützt unsere Beobachtung einer verminderten Lymphozytenproliferation auf SAC, einem Staphylokokkus aureus-Lysat, welches CpG enthält.

Die Kombination aus stark erhöhtem IgE sowie erniedrigtem IgM wird laborchemisch als kennzeichnend für ein DOCK8-HIES beschrieben. Dies wurde für zirka 70 % der diesbezüglich untersuchten Patienten festgestellt [27, 28, 69-71]. Im Gegensatz zu SCIDs (severe combined immunodeficiencies), für die Hypogammaglobulinämien typisch sind, liegen die IgG-Werte der DOCK8-HIES Patienten innerhalb oder oberhalb der Norm. Immunglobulin A zeigte keine Tendenz in eine Richtung und wurde als vermindert, unauffällig und erhöht beschrieben [27, 28, 69, 70]. Vergleichbare Ergebnisse brachte auch die Antikörperanalyse unserer DOCK8-HIES-Patienten (Tabelle 11, Seite 49), wobei darauf hingewiesen werden muss, dass die

Evaluation der IgG-Antikörper-Titer vor Beginn einer Immunglobulinsubstitution stattgefunden hat. Auffallend ist jedoch die Langezeitanalyse unserer Patienten. Hier zeigte sich eine deutliche Variabilität der Messergebnisse zu unterschiedlichen Zeitpunkten. So wurden auch für eosinophile Granulozyten, Lymphozyten und deren Subgruppen im Rahmen von Mehrfachmessungen für fast jeden Patienten einzelne Messwerte festgestellt, die innerhalb der Norm lagen. Dies gilt auch für IgE und IgM. Bei zwei Patienten aus der DOCK8-HIES-Kohorte wurde zwischenzeitlich keine bzw. nur eine geringe IgE-Erhöpfung nachgewiesen. Auch hinsichtlich der Annahme, dass IgM mehrheitlich vermindert sei, zeigte sich im Zuge unserer wiederholten Messungen, dass eine IgM-Verminderung zwar signifikant häufiger bei DOCK8-HIES-Patienten als in der Wildtyp-Kohorte vorkommt, dass jedoch im Normbereich liegende Werte für IgM bei DOCK8-HIES-Patienten ebenso keine Seltenheit sind. Untersuchungen an DOCK8-defizienten Mäusen unterstützen diese These, indem gezeigt wurde, dass neben einer milderer Ausprägung hinsichtlich Zellaktivierung und -teilung sowie Zytokinproduktion nicht alle ein erhöhtes Serum-IgE aufweisen [31, 33, 75, 143].

Im Gegensatz zu quantitativen und qualitativen Auffälligkeiten von Lymphozyten und eosinophilen Granulozyten sind die Zellzahlen von basophilen und neutrophilen Granulozyten sowohl in der Literatur [28] als auch bei den Patienten unserer Kohorte unauffällig. Hinsichtlich neutrophiler Granulozyten und vor allem deren Fähigkeit zur Chemotaxis wurden Studien an DOCK2-defizienten Mäusen durchgeführt. DOCK2 ist ein weiteres Mitglied der DOCK180-Proteinfamilie, für das sich schon früher als für DOCK8 eine relevante Bedeutung hinsichtlich des Immunsystems herausstellte [86]. Im Zuge dieser Studien konnte unter anderem eine Beeinträchtigung der Chemotaxis von neutrophilen Granulozyten nachgewiesen werden [157, 158]. Eine Beeinträchtigung der Fähigkeit zur Chemotaxis bei neutrophilen Granulozyten wurde in unserer DOCK8-HIES-Kohorte ebenso bei 40 % festgestellt.

Abschließend stellte sich für uns die Frage, ob und inwieweit es einen Zusammenhang zwischen DOCK8 und dem STAT3-Protein gibt [159]. STAT3 als Transkriptionsfaktor ist wichtig für die Vermittlung der von IL-6- und IL-10-induzierten pro- und antiinflammatorischen Signale. Eine Mutation im *STAT3*-Gen führt somit zu einem Ungleichgewicht dieser pro- und antiinflammatorischen Antworten [23, 51, 160]. Um darzustellen, ob DOCK8 auf diesen Weg der Signaltransduktion Einfluss nimmt, wurde in

in vitro die pSTAT3-Phosphorylierung in DOCK8-defizienten PBMCs gemessen. Signifikante Unterschiede zwischen den Kohorten ließen sich jedoch nicht erkennen. Zu demselben Ergebnis kamen auch Jabara et al., die ebenso keine Beeinträchtigung der STAT3-Phosphorylierung nach Stimulation mit IL-6 feststellten [37].

DOCK8-HIES-Symptome	Engelhardt et al., 2009 n=11	Zhang et al., 2009 n=11	Al-Herzi et al., 2012 n=9	Alsum et al., 2012 n=13	Sana et al., 2012 n=7	Renner et al., 2004 n=13	Eigene Ergebnisse n=11
Lymphopenie	19% (4/21)	81% (9/11)	k. A.	k. A.	33% (2/6)	0% (0/13)	82% (9/11)
T-Zellen[CD3+] ⁺	38% (5/13)	91% (10/11)	44% (4/9)	k. A.	67% (4/6)	33% (2/6)	73% (8/11)
T-Zellen[CD3+] ⁺	62% (8/13)	k. A.	56% (5/9)	k. A.	33% (2/6)	67% (4/6)	27% (3/11)
T-Zellen[CD4+] ⁺	54% (7/13)	100% (11/11)	78% (7/9)	k. A.	100% (6/6)	17% (1/6)	64% (7/11)
T-Zellen[CD8+] ⁺	25% (3/12)	91% (10/11)	22% (2/9)	k. A.	0% (0/7)	17% (1/6)	55% (6/11)
B-Zellen[CD19+] ⁺	46% (6/13)	k. A.	78% (7/9)	k. A.	67% (4/6)	84% (5/6)	91% (10/11)
B-Zellen[CD19+] ⁻	54% (7/13)	k. A.	11% (1/9)	k. A.	33% (2/6)	0% (0/13)	0% (0/11)
B-Zellen[CD19+] ⁻	k. A.	46% (5/11)	11% (1/9)	k. A.	-	17% (1/6)	9% (1/11)
NK-Zellen[CD16+CD56+] ⁺	92% (11/12)	40% (4/10)	78% (7/9)	k. A.	50% (3/6)	100% ² (5/5)	64% ² (7/11)
NK-Zellen[CD16+CD56+] ⁻	k. A.	55% (6/10)	22% (2/9)	k. A.	33% (2/6)	0% (0/13)	36% (4/11)
T _H 17-Zellen ⁺	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.	11% (1/9)
IgM ⁺	77% (10/13)	100% (11/11)	78% (7/9)	62% (8/13)	83% (5/6)	0% (0/6)	73% (8/11)
IgG ⁺	85% (11/13)	46% (5/11)	67% (7/9)	9% (1/11)	33% (2/6)	50% (3/6)	80% (8/10)
IgG ⁻	0% (0/21)	0% (0/11)	0% (0/9)	0% (0/13)	0% (0/7)	0% (0/13)	0% (0/11)
IgG [±]	15% (2/13)	55% (6/11)	22% (2/9)	91% (10/11)	67% (4/6)	50% (3/6)	20% (2/10)
IgA ⁺	62% (8/13)	k. A.	33% (3/9)	40% (4/10)	33% (2/6)	50% (3/6)	82% (9/11)
IgA ⁻	31% (4/13)	k. A.	11% (1/9)	0% (0/13)	17% (1/6)	0% (0/13)	0% (0/11)
IgA [±]	8% (1/13)	k. A.	56% (5/9)	60% ² (6/10)	50% (3/6)	50% (3/6)	18% (2/11)

Tabelle 16c: Vergleichstabelle Klinik

Die als Bruch aufgeführte Zahlenangabe entspricht der Anzahl der Patienten mit diesem Symptom (Zähler) und der Gesamtzahl der Patienten, für die dieses Symptom ausgewertet wurde (Nenner). Die Prozentzahl beschreibt die relative Häufigkeit. „k. A.“ bedeutet, dass wegen fehlender Analyse oder Zahlenangabe keine Auswertung möglich war.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Das autosomal-rezessive Hyper-IgE-Syndrom (DOCK8-HIES) wird den primären Immundefekten zugeordnet. DOCK8-HIES wird neben der für HIES charakteristischen Trias Ekzem, Eosinophilie und IgE-Erhöhung durch rezidivierende Atemwegsinfektionen, viral bedingte Hautsuperinfektionen, mucokutane Candidiasis sowie einer Prädisposition für Allergien, insbesondere Nahrungsmittelallergien charakterisiert. Durch die Identifikation von Mutationen im *DOCK8*-Gen als Ursache für die Mehrheit der autosomal-rezessiven Hyper-IgE-Syndrome ist es heute möglich die primär rein klinisch gestellte Diagnose molekulargenetisch zu bestätigen.

Ziel der hier vorgelegten Arbeit war es, den klinischen und immunologischen Phänotyp des autosomal-rezessiven Hyper-IgE-Syndroms erweiternd zu definieren. Hierzu sollten Kriterien identifiziert werden, die es ermöglichen ein DOCK8-HIES von anderen Erkrankungen mit ähnlichem klinischen oder immunologischen Erscheinungsbild bestmöglich unterscheiden zu können, und somit dazu beizutragen eine frühzeitige Diagnose zu stellen.

Es wurden hierfür 26 Patienten mit Verdacht auf DOCK8-HIES ohne Anhalt für einen anderen Immundefekt hinsichtlich einer Mutation im *DOCK8*-Gen untersucht. Bei elf Patienten konnten homozygote *DOCK8*-Mutationen festgestellt werden. Hierbei handelte es sich vor allem um Punktmutationen oder große Deletionen, von denen vier Mutationen (ID#6-8, ID#10, ID#11; Tabelle 15, Seite 58) noch nicht zuvor in der Literatur beschrieben wurden.

Aus dem Vergleich der DOCK8-HIES- und DOCK8-Wildtyp-Patienten ließ sich erkennen, dass klinische Symptome wie Infektionen mit dem Molluscum-contagiosum-Virus (MCV), dem Pilz *Candida albicans* sowie dem Bakterium *Pseudomonas aeruginosa* mindestens doppelt so häufig in der DOCK8-HIES-Gruppe vertreten waren, verglichen mit der DOCK8-Wildtyp-Kohorte. Selbiges gilt für Hautsuperinfektionen, ophthalmologische Infektionen, ZNS-Symptomatik und Minderwuchs. Die Anfälligkeit für die Vielzahl an Infektionen hervorgerufen durch unterschiedlichste Erreger, ließ sich anhand des immunologischen Phänotyps, den DOCK8-Patienten aufweisen, erklären. Hier zeigten sich Unterschiede hinsichtlich der CD3⁺-, CD4⁺-, CD8⁺- Zellen sowie der natürlichen Killer-Zellen (NK-Zellen), welche alle bei DOCK8-HIES-Patienten im Vergleich zu DOCK8-Wildtyp-Patienten signifikant vermindert waren. Speziell der nachgewiesene NK-Zell-Defekt bietet eine Erklärung für die Prädisposition zu viralen Infektionen. Hinsichtlich der Antikörper ließ sich eine signifikante Verminderung für Immunglobulin M (IgM) darstellen und kann somit als aussagekräftiger

Parameter im Zuge einer Diagnosestellung herangezogen werden, wobei Mehrfachmessungen bei Patienten auch Normwerte ergaben und dies im Zuge der Diagnosestellung bedacht werden sollte.

Unsere Untersuchungen unterstreichen insgesamt die Indikation zu einer Stammzelltransplantation, welche die Therapie der Wahl darstellt mit dem Ziel, die Lebensqualität der Patienten und ihrer Familien zu verbessern.

Weitere Untersuchungen werden es ermöglichen einen genaueren Einblick in die DOCK8-Proteinfunktion zu geben, um somit Rückschlüsse auf die Zusammenhänge zwischen Proteindefekt, möglichem Proteinverlust und Symptomentstehung ziehen zu können.

6. LITERATURVERZEICHNIS

1. Al-Herz, W. et al. *Primary immunodeficiency diseases: an update on the classification from the international union of immunological societies expert committee for primary immunodeficiency*. Front Immunol 2011; 2: 54.
2. Notarangelo, L. D. *Primary immunodeficiencies*. J Allergy Clin Immunol 2010; 125(2 Suppl 2): S182-94.
3. Fischer, A. *Human primary immunodeficiency diseases*. Immunity 2007; 27(6): 835-45.
4. Casanova, J. L. & Abel, L. *Primary immunodeficiencies: a field in its infancy*. Science 2007; 317(5838): 617-9.
5. Notarangelo, L. D. & Casanova, J. L. *Primary immunodeficiencies: increasing market share*. Curr Opin Immunol 2009; 21(5): 461-5.
6. Alcais, A. et al. *Life-threatening infectious diseases of childhood: single-gene inborn errors of immunity? Ann N Y Acad Sci 2010; 1214: 18-33.*
7. Casanova, J. L. & Abel, L. *Inborn errors of immunity to infection: the rule rather than the exception*. J Exp Med 2005; 202(2): 197-201.
8. Davis, S. D., Schaller, J. & Wedgwood, R. J. *Job's Syndrome. Recurrent, "cold", staphylococcal abscesses*. Lancet 1966; 1(7445): 1013-5.
9. Buckley, R. H., Wray, B. B. & Belmaker, E. Z. *Extreme hyperimmunoglobulinemia E and undue susceptibility to infection*. Pediatrics 1972; 49(1): 59-70.
10. Sowerwine, K. J., Holland, S. M. & Freeman, A. F. *Hyper-IgE syndrome update*. Ann N Y Acad Sci 2012; 1250: 25-32.
11. Minegishi, Y. et al. *Human tyrosine kinase 2 deficiency reveals its requisite roles in multiple cytokine signals involved in innate and acquired immunity*. Immunity 2006; 25(5): 745-55.
12. Zhang, Y. et al. *Autosomal recessive phosphoglucomutase 3 (PGM3) mutations link glycosylation defects to atopy, immune deficiency, autoimmunity, and neurocognitive impairment*. J Allergy Clin Immunol 2014; 133(5): 1400-9, 1409 e1-5.
13. Sassi, A. et al. *Hypomorphic homozygous mutations in phosphoglucomutase 3 (PGM3) impair immunity and increase serum IgE levels*. J Allergy Clin Immunol 2014; 133(5): 1410-9, 1419 e1-13.
14. Van Scoy, R. E. et al. *Familial neutrophil chemotaxis defect, recurrent bacterial infections, mucocutaneous candidiasis, and hyperimmunoglobulinemia E*. Ann Intern Med 1975; 82(6): 766-71.
15. Blum, R., Geller, G. & Fish, L. A. *Recurrent severe staphylococcal infections, eczematoid rash, extreme elevations of IgE, eosinophilia, and divergent chemotactic responses in two generations*. J Pediatr 1977; 90(4): 607-9.
16. Buckley, R. H. & Becker, W. G. *Abnormalities in the regulation of human IgE synthesis*. Immunol Rev 1978; 41: 288-314.
17. Hagl, B. *Hyper-IgE-Syndrom erkennen*. Pädiatrie hautnah 2012; 5: 330-335.
18. Schimke, L. F. et al. *Diagnostic approach to the hyper-IgE syndromes: immunologic and clinical key findings to differentiate hyper-IgE syndromes from atopic dermatitis*. J Allergy Clin Immunol 2010; 126(3): 611-7 e1.
19. Grimbacher, B. et al. *Hyper-IgE syndrome with recurrent infections--an autosomal dominant multisystem disorder*. N Engl J Med 1999; 340(9): 692-702.
20. Renner, E. D. et al. *Autosomal recessive hyperimmunoglobulin E syndrome: a distinct disease entity*. J Pediatr 2004; 144(1): 93-9.
21. Woellner, C. et al. *The hyper IgE syndrome and mutations in TYK2*. Immunity 2007; 26(5): 535; author reply 536.
22. Casanova, J. L., Holland, S. M. & Notarangelo, L. D. *Inborn errors of human JAKs and STATs*. Immunity 2012; 36(4): 515-28.
23. Holland, S. M. et al. *STAT3 mutations in the hyper-IgE syndrome*. N Engl J Med 2007; 357(16): 1608-19.

24. Minegishi, Y. et al. *Dominant-negative mutations in the DNA-binding domain of STAT3 cause hyper-IgE syndrome*. Nature 2007; 448(7157): 1058-62.
25. Renner, E. D. et al. *STAT3 mutation in the original patient with Job's syndrome*. N Engl J Med 2007; 357(16): 1667-8.
26. Woellner, C. et al. *Mutations in STAT3 and diagnostic guidelines for hyper-IgE syndrome*. J Allergy Clin Immunol 2010; 125(2): 424-432 e8.
27. Engelhardt, K. R. et al. *Large deletions and point mutations involving the dedicator of cytokinesis 8 (DOCK8) in the autosomal-recessive form of hyper-IgE syndrome*. J Allergy Clin Immunol 2009; 124(6): 1289-302 e4.
28. Zhang, Q. et al. *Combined immunodeficiency associated with DOCK8 mutations*. N Engl J Med 2009; 361(21): 2046-55.
29. Meller, N., Merlot, S. & Guda, C. *CZH proteins: a new family of Rho-GEFs*. J Cell Sci 2005; 118(Pt 21): 4937-46.
30. Cote, J. F. & Vuori, K. *Identification of an evolutionarily conserved superfamily of DOCK180-related proteins with guanine nucleotide exchange activity*. J Cell Sci 2002; 115(Pt 24): 4901-13.
31. Randall, K. L. et al. *DOCK8 deficiency impairs CD8 T cell survival and function in humans and mice*. J Exp Med 2011; 208(11): 2305-20.
32. Randall, K. L. et al. *The essential role of DOCK8 in humoral immunity*. Dis Markers 2010; 29(3-4): 141-50.
33. Lambe, T. et al. *DOCK8 is essential for T-cell survival and the maintenance of CD8+ T-cell memory*. Eur J Immunol 2011; 41(12): 3423-35.
34. Randall, K. L. et al. *Dock8 mutations cripple B cell immunological synapses, germinal centers and long-lived antibody production*. Nat Immunol 2009; 10(12): 1283-91.
35. Mizesko, M. C. et al. *Defective actin accumulation impairs human natural killer cell function in patients with dedicator of cytokinesis 8 deficiency*. J Allergy Clin Immunol 2013; 131(3): 840-8.
36. Harada, Y. et al. *DOCK8 is a Cdc42 activator critical for interstitial dendritic cell migration during immune responses*. Blood 2012; 119(19): 4451-61.
37. Jabara, H. H. et al. *DOCK8 functions as an adaptor that links TLR-MyD88 signaling to B cell activation*. Nat Immunol 2012; 13(6): 612-20.
38. Ochs, H. D. & Thrasher, A. J. *The Wiskott-Aldrich syndrome*. J Allergy Clin Immunol 2006; 117(4): 725-38; quiz 739.
39. Aleman, K. et al. *Reviewing Omenn syndrome*. Eur J Pediatr 2001; 160(12): 718-25.
40. Wildin, R. S., Smyk-Pearson, S. & Filipovich, A. H. *Clinical and molecular features of the immunodysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X linked (IPEX) syndrome*. J Med Genet 2002; 39(8): 537-45.
41. Grimbacher, B. et al. *Genetic linkage of hyper-IgE syndrome to chromosome 4*. Am J Hum Genet 1999; 65(3): 735-44.
42. Renner, E. D. *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 der Ludwig-Maximilians-Universität München 2002; 90.
43. Mullis, K. B. & Faloona, F. A. *Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction*. Methods Enzymol 1987; 155: 335-50.
44. Bauer, A., Solinas-Toldo S., Hoheisel J.D. *"Gendiagnostik, Methodische Grundlagen"*. Springer Medizin, Heidelberg, 2008; 247-362.
45. Saiki, R. K. et al. *Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia*. Science 1985; 230(4732): 1350-4.
46. Powell, L. M. et al. *A novel form of tissue-specific RNA processing produces apolipoprotein-B48 in intestine*. Cell 1987; 50(6): 831-40.
47. Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R. *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors*. Proc Natl Acad Sci U S A 1977; 74(12): 5463-7.

48. *DOCK8-Gen Sequenz*. Available from: www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?db=core;g=ENSG00000107099;r=9:214854-465259;t=ENST00000453981; access date: 2013-08-30.
49. Ruusala, A. & Aspenstrom, P. *Isolation and characterisation of DOCK8, a member of the DOCK180-related regulators of cell morphology*. FEBS Lett 2004; 572(1-3): 159-66.
50. Takahashi, K. et al. *Homozygous deletion and reduced expression of the DOCK8 gene in human lung cancer*. Int J Oncol 2006; 28(2): 321-8.
51. Renner, E. D. et al. *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 2008; 122(1): 181-7.
52. Kimmig, S. et al. *Two subsets of naive T helper cells with distinct T cell receptor excision circle content in human adult peripheral blood*. J Exp Med 2002; 195(6): 789-94.
53. *CD4 T-Cell Recent thymic emigrants – Normwerte*. Available from: <http://www.mayomedicallaboratories.com/test-catalog/Clinical+and+Interpretive/89504>; access date: 2016-01-31.
54. Boos, A. C. et al. *Atopic dermatitis, STAT3- and DOCK8-hyper-IgE syndromes differ in IgE-based sensitization pattern*. Allergy 2014; 69(7): 943-53.
55. Heltzer, M. L. et al. *A potential screening tool for IPEX syndrome*. Pediatr Dev Pathol 2007; 10(2): 98-105.
56. Maluish, A. E., and D.M. Stong *Lymphocyte proliferation* in Manual of clinical Laboratory immunology (Rose N.R., F. H., Fahey J.L., editors) American Society for Microbiology, 1986, 274-281.
57. Nelson, R. D., Baumann M. P. *Leukocyte chemotaxis: migration under agarose method* in Investigation of phagocytes in disease (Douglas S. D., Q. P. G., editors) Livingstone, Churchill, New York, 1981, 20-31.
58. Papan, C. et al. *Beneficial IFN-alpha treatment of tumorous herpes simplex blepharoconjunctivitis in dedicator of cytokinesis 8 deficiency*. J Allergy Clin Immunol 2014; 133(5): 1456-8.
59. Gatz, S. A. et al. *Curative treatment of autosomal-recessive hyper-IgE syndrome by hematopoietic cell transplantation*. Bone Marrow Transplant 2011; 46(4): 552-6.
60. Bittner, T. C. et al. *Successful long-term correction of autosomal recessive hyper-IgE syndrome due to DOCK8 deficiency by hematopoietic stem cell transplantation*. Klin Padiatr 2010; 222(6): 351-5.
61. *DOCK8-Gen Abbildung*. Available from: www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=DOCK8; access date: 2013-08-05.
62. Shearer, W. T. et al. *Lymphocyte subsets in healthy children from birth through 18 years of age: the Pediatric AIDS Clinical Trials Group P1009 study*. J Allergy Clin Immunol 2003; 112(5): 973-80.
63. Jentsch-Ullrich, K. et al. *Lymphocyte subsets' reference ranges in an age- and gender-balanced population of 100 healthy adults--a monocentric German study*. Clin Immunol 2005; 116(2): 192-7.
64. Schauer, U. et al. *IgG subclass concentrations in certified reference material 470 and reference values for children and adults determined with the binding site reagents*. Clin Chem 2003; 49(11): 1924-9.
65. Kjellman, N. M., Johansson, S. G. & Roth, A. *Serum IgE levels in healthy children quantified by a sandwich technique (PRIST)*. Clin Allergy 1976; 6(1): 51-9.
66. Jolliff, C. R. et al. *Reference intervals for serum IgG, IgA, IgM, C3, and C4 as determined by rate nephelometry*. Clin Chem 1982; 28(1): 126-8.
67. Zetterstrom, O. & Johansson, S. G. *IgE concentrations measured by PRIST in serum of healthy adults and in patients with respiratory allergy. A diagnostic approach*. Allergy 1981; 36(8): 537-47.
68. Piatosa, B. et al. *B cell subsets in healthy children: reference values for evaluation of B cell maturation process in peripheral blood*. Cytometry B Clin Cytom 2010; 78(6): 372-81.

69. Alsum, Z. et al. *Clinical, immunological and molecular characterization of DOCK8 and DOCK8-like deficient patients: single center experience of twenty-five patients*. J Clin Immunol 2013; 33(1): 55-67.
70. Al-Herz, W. et al. *Clinical, immunologic and genetic profiles of DOCK8-deficient patients in Kuwait*. Clin Immunol 2012; 143(3): 266-72.
71. Sanal, O. et al. *Additional diverse findings expand the clinical presentation of DOCK8 deficiency*. J Clin Immunol 2012; 32(4): 698-708.
72. Su, H. C. *Dedicator of cytokinesis 8 (DOCK8) deficiency*. Curr Opin Allergy Clin Immunol 2010; 10(6): 515-20.
73. Chang, Y. F., Imam, J. S. & Wilkinson, M. F. *The nonsense-mediated decay RNA surveillance pathway*. Annu Rev Biochem 2007; 76: 51-74.
74. Renner, E. D. et al. *Comel-Netherton syndrome defined as primary immunodeficiency*. J Allergy Clin Immunol 2009; 124(3): 536-43.
75. Su, H. C., Jing, H. & Zhang, Q. *DOCK8 deficiency*. Year in Human and Medical Genetics: Inborn Errors of Immunity Ii 2011; 1246: 26-33.
76. Wilson, R. & Dowling, R. B. *Lung infections. 3. Pseudomonas aeruginosa and other related species*. Thorax 1998; 53(3): 213-9.
77. Schaefer, P. & Baugh, R. F. *Acute otitis externa: an update*. Am Fam Physician 2012; 86(11): 1055-61.
78. Leyden, J. J. et al. *Skin microflora*. J Invest Dermatol 1987; 88(3 Suppl): 65s-72s.
79. Roth, R. R. & James, W. D. *Microbial ecology of the skin*. Annu Rev Microbiol 1988; 42: 441-64.
80. Noble, W. C. *Skin bacteriology and the role of Staphylococcus aureus in infection*. Br J Dermatol 1998; 139 Suppl 53: 9-12.
81. Akiyama, H. et al. *Assessment of Streptococcus pyogenes microcolony formation in infected skin by confocal laser scanning microscopy*. J Dermatol Sci 2003; 32(3): 193-9.
82. El Baze, P. et al. *Pseudomonas aeruginosa O-11 folliculitis. Development into ecthyma gangrenosum in immunosuppressed patients*. Arch Dermatol 1985; 121(7): 873-6.
83. Keles, S. et al. *Plasmacytoid dendritic cell depletion in DOCK8 deficiency: rescue of severe herpetic infections with IFN-alpha 2b therapy*. J Allergy Clin Immunol 2014; 133(6): 1753-5 e3.
84. Al Khatib, S. et al. *Defects along the T(H)17 differentiation pathway underlie genetically distinct forms of the hyper IgE syndrome*. J Allergy Clin Immunol 2009; 124(2): 342-8, 348.e1-5.
85. Milner, J. D. et al. *Impaired T(H)17 cell differentiation in subjects with autosomal dominant hyper-IgE syndrome*. Nature 2008; 452(7188): 773-6.
86. Zhang, Q. et al. *Genetic, clinical, and laboratory markers for DOCK8 immunodeficiency syndrome*. Dis Markers 2010; 29(3-4): 131-9.
87. Korn, T. et al. *Th17 cells: effector T cells with inflammatory properties*. Semin Immunol 2007; 19(6): 362-71.
88. Ma, C. S. et al. *Deficiency of Th17 cells in hyper IgE syndrome due to mutations in STAT3*. J Exp Med 2008; 205(7): 1551-7.
89. de Beaucoudrey, L. et al. *Mutations in STAT3 and IL12RB1 impair the development of human IL-17-producing T cells*. J Exp Med 2008; 205(7): 1543-50.
90. Arshad, S. H. & Holgate, S. *The role of IgE in allergen-induced inflammation and the potential for intervention with a humanized monoclonal anti-IgE antibody*. Clin Exp Allergy 2001; 31(9): 1344-51.
91. Deo, S. S. et al. *Role played by Th2 type cytokines in IgE mediated allergy and asthma*. Lung India 2010; 27(2): 66-71.
92. Jeannin, P. et al. *CD86 (B7-2) on human B cells. A functional role in proliferation and selective differentiation into IgE- and IgG4-producing cells*. J Biol Chem 1997; 272(25): 15613-9.
93. Gould, H. J. & Sutton, B. J. *IgE in allergy and asthma today*. Nat Rev Immunol 2008; 8(3): 205-17.
94. Stone, K. D., Prussin, C. & Metcalfe, D. D. *IgE, mast cells, basophils, and eosinophils*. J Allergy Clin Immunol 2010; 125(2 Suppl 2): S73-80.

95. Romagnani, S. *The role of lymphocytes in allergic disease*. J Allergy Clin Immunol 2000; 105(3): 399-408.
96. Farooq, A. *The role of herpesviruses in ocular infections*. Virus Adaption and Treatment 2010; 2: 115-123.
97. Kaye, S. & Choudhary, A. *Herpes simplex keratitis*. Prog Retin Eye Res 2006; 25(4): 355-80.
98. Rowe, A. M. et al. *Herpes keratitis*. Prog Retin Eye Res 2013; 32: 88-101.
99. Barlogis, V. et al. *Successful allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for DOCK8 deficiency*. J Allergy Clin Immunol 2011; 128(2): 420-22 e2.
100. Sepkowitz, K. A. *Opportunistic infections in patients with and patients without Acquired Immunodeficiency Syndrome*. Clin Infect Dis 2002; 34(8): 1098-107.
101. Kim, K. S. *Acute bacterial meningitis in infants and children*. Lancet Infect Dis 2010; 10(1): 32-42.
102. Simpson, J. F. *Listeria monocytogenes meningitis: an opportunistic infection*. J Neurol Neurosurg Psychiatry 1971; 34(6): 657-63.
103. Berg, R. E. et al. *Memory CD8+ T cells provide innate immune protection against Listeria monocytogenes in the absence of cognate antigen*. J Exp Med 2003; 198(10): 1583-93.
104. Berg, R. E. et al. *Relative contributions of NK and CD8 T cells to IFN-gamma mediated innate immune protection against Listeria monocytogenes*. J Immunol 2005; 175(3): 1751-7.
105. Plitas, G. et al. *NK dendritic cells are innate immune responders to Listeria monocytogenes infection*. J Immunol 2007; 178(7): 4411-6.
106. Bone, R. C. et al. *Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine*. Chest 1992; 101(6): 1644-55.
107. Koletzko, B. *Kinder und Jugendmedizin* Springer, 2007; 235.
108. Sharma, M. et al. *Bacteraemia in children*. Indian J Pediatr 2002; 69(12): 1029-32.
109. Freeman, A. F. et al. *Coronary artery abnormalities in Hyper-IgE syndrome*. J Clin Immunol 2011; 31(3): 338-45.
110. Yavuz, H. & Chee, R. *A review on the vascular features of the hyperimmunoglobulin E syndrome*. Clin Exp Immunol 2010; 159(3): 238-44.
111. Kean, J. M. et al. *Seroepidemiology of human polyomaviruses*. PLoS Pathog 2009; 5(3): e1000363.
112. Tan, C. S. & Koralnik, I. J. *Progressive multifocal leukoencephalopathy and other disorders caused by JC virus: clinical features and pathogenesis*. Lancet Neurology 2010; 9(4): 425-437.
113. Weber, T. et al. *Immune response in progressive multifocal leukoencephalopathy: an overview*. J Neurovirol 2001; 7(4): 311-7.
114. Christie, L. et al. *Food allergies in children affect nutrient intake and growth*. J Am Diet Assoc 2002; 102(11): 1648-51.
115. Balfour-Lynn, L. *Growth and childhood asthma*. Arch Dis Child 1986; 61(11): 1049-55.
116. Martin, A. J., Landau, L. I. & Phelan, P. D. *The effect on growth of childhood asthma*. Acta Paediatr Scand 1981; 70(5): 683-8.
117. Hauspie, R., Susanne, C. & Alexander, F. *Maturation delay and temporal growth retardation in asthmatic boys*. J Allergy Clin Immunol 1977; 59(3): 200-6.
118. Ferguson, A. C., Murray, A. B. & Tze, W. J. *Short stature and delayed skeletal maturation in children with allergic disease*. J Allergy Clin Immunol 1982; 69(5): 461-6.
119. Priftis, K. et al. *Adrenal function in asthma*. Arch Dis Child 1990; 65(8): 838-40.
120. Patel, L. et al. *Linear growth in prepubertal children with atopic dermatitis*. Arch Dis Child 1998; 79(2): 169-72.
121. Isolauri, E. et al. *Elimination diet in cow's milk allergy: risk for impaired growth in young children*. J Pediatr 1998; 132(6): 1004-9.
122. Lei, J. Y. et al. *Microcystic adnexal carcinoma associated with primary immunodeficiency, recurrent diffuse herpes simplex virus infection, and cutaneous T-cell lymphoma*. Am J Dermatopathol 2000; 22(6): 524-9.

123. Sato, M. et al. *Identification of chromosome arm 9p as the most frequent target of homozygous deletions in lung cancer*. *Genes Chromosomes Cancer* 2005; 44(4): 405-14.
124. Heidenblad, M. et al. *Genome-wide array-based comparative genomic hybridization reveals multiple amplification targets and novel homozygous deletions in pancreatic carcinoma cell lines*. *Cancer Res* 2004; 64(9): 3052-9.
125. Kang, J. U. et al. *Frequent silence of chromosome 9p, homozygous DOCK8, DMRT1 and DMRT3 deletion at 9p24.3 in squamous cell carcinoma of the lung*. *Int J Oncol* 2010; 37(2): 327-35.
126. Takada, H. et al. *Genomic loss and epigenetic silencing of very-low-density lipoprotein receptor involved in gastric carcinogenesis*. *Oncogene* 2006; 25(49): 6554-62.
127. Idbaih, A. et al. *Genomic changes in progression of low-grade gliomas*. *J Neurooncol* 2008; 90(2): 133-40.
128. Saelee, P. et al. *Novel PNLIPRP3 and DOCK8 gene expression and prognostic implications of DNA loss on chromosome 10q25.3 in hepatocellular carcinoma*. *Asian Pac J Cancer Prev* 2009; 10(3): 501-6.
129. Janssen, E. et al. *Flow cytometry biomarkers distinguish DOCK8 deficiency from severe atopic dermatitis*. *Clin Immunol* 2014; 150(2): 220-4.
130. Etienne-Manneville, S. & Hall, A. *Rho GTPases in cell biology*. *Nature* 2002; 420(6916): 629-35.
131. Tybulewicz, V. L. & Henderson, R. B. *Rho family GTPases and their regulators in lymphocytes*. *Nat Rev Immunol* 2009; 9(9): 630-44.
132. Sinha, S. & Yang, W. *Cellular signaling for activation of Rho GTPase Cdc42*. *Cell Signal* 2008; 20(11): 1927-34.
133. Ochs, H. D., Oukka, M. & Torgerson, T. R. *TH17 cells and regulatory T cells in primary immunodeficiency diseases*. *J Allergy Clin Immunol* 2009; 123(5): 977-83; quiz 984-5.
134. Zielinski, C. E. et al. *Pathogen-induced human TH17 cells produce IFN-gamma or IL-10 and are regulated by IL-1beta*. *Nature* 2012; 484(7395): 514-8.
135. Trapani, J. A. & Smyth, M. J. *Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway*. *Nat Rev Immunol* 2002; 2(10): 735-47.
136. Gotoh, K. et al. *Selective control of type I IFN induction by the Rac activator DOCK2 during TLR-mediated plasmacytoid dendritic cell activation*. *Journal of Experimental Medicine* 2010; 207(4): 721-730.
137. Crawford, G. et al. *DOCK8 is critical for the survival and function of NKT cells*. *Blood* 2013; 122(12): 2052-61.
138. Stabile, H. et al. *Impaired NK-cell migration in WAS/XLT patients: role of Cdc42/WASp pathway in the control of chemokine-induced beta2 integrin high-affinity state*. *Blood* 2010; 115(14): 2818-26.
139. Puck, J. M. *The case for newborn screening for severe combined immunodeficiency and related disorders*. *Ann N Y Acad Sci* 2011; 1246: 108-17.
140. Routes, J. M. et al. *Statewide newborn screening for severe T-cell lymphopenia*. *JAMA* 2009; 302(22): 2465-70.
141. Gerstel-Thompson, J. L. et al. *High-throughput multiplexed T-cell-receptor excision circle quantitative PCR assay with internal controls for detection of severe combined immunodeficiency in population-based newborn screening*. *Clin Chem* 2010; 56(9): 1466-74.
142. Janik, D. K. et al. *A multiplex immunoassay using the Guthrie specimen to detect T-cell deficiencies including severe combined immunodeficiency disease*. *Clin Chem* 2010; 56(9): 1460-5.
143. Dasouki, M. et al. *Deficient T Cell Receptor Excision Circles (TRECs) in autosomal recessive hyper IgE syndrome caused by DOCK8 mutation: implications for pathogenesis and potential detection by newborn screening*. *Clin Immunol* 2011; 141(2): 128-32.
144. Sakaguchi, S. et al. *T cell-mediated maintenance of natural self-tolerance: its breakdown as a possible cause of various autoimmune diseases*. *J Autoimmun* 1996; 9(2): 211-20.
145. Sakaguchi, S. *Regulatory T cells: key controllers of immunologic self-tolerance*. *Cell* 2000; 101(5): 455-8.

146. Yi, H. et al. *The phenotypic characterization of naturally occurring regulatory CD4+CD25+ T cells*. Cell Mol Immunol 2006; 3(3): 189-95.
147. d’Hennezel, E. et al. *Single-cell analysis of the human T regulatory population uncovers functional heterogeneity and instability within FOXP3+ cells*. J Immunol 2011; 186(12): 6788-97.
148. Fontenot, J. D., Gavin, M. A. & Rudensky, A. Y. *Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells*. Nat Immunol 2003; 4(4): 330-6.
149. Fontenot, J. D. et al. *Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor foxp3*. Immunity 2005; 22(3): 329-41.
150. Hori, S., Nomura, T. & Sakaguchi, S. *Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3*. Science 2003; 299(5609): 1057-61.
151. Khattry, R. et al. *An essential role for Scurfin in CD4+CD25+ T regulatory cells*. Nat Immunol 2003; 4(4): 337-42.
152. O’Garra, A. & Vieira, P. *Twenty-first century Foxp3*. Nat Immunol 2003; 4(4): 304-6.
153. Wan, Y. Y. & Flavell, R. A. *Identifying Foxp3-expressing suppressor T cells with a bicistronic reporter*. Proc Natl Acad Sci U S A 2005; 102(14): 5126-31.
154. Ziegler, S. F. *FOXP3: of mice and men*. Annu Rev Immunol 2006; 24: 209-26.
155. Janssen, E. et al. *Dedicator of cytokinesis 8-deficient patients have a breakdown in peripheral B-cell tolerance and defective regulatory T cells*. J Allergy Clin Immunol 2014; 134(6): 1365-74.
156. Notarangelo, L. D. et al. *Defects of class-switch recombination*. J Allergy Clin Immunol 2006; 117(4): 855-64.
157. Fukui, Y. et al. *Haematopoietic cell-specific CDM family protein DOCK2 is essential for lymphocyte migration*. Nature 2001; 412(6849): 826-31.
158. Kunisaki, Y. et al. *DOCK2 is a Rac activator that regulates motility and polarity during neutrophil chemotaxis*. J Cell Biol 2006; 174(5): 647-52.
159. Niemand, C. et al. *Activation of STAT3 by IL-6 and IL-10 in primary human macrophages is differentially modulated by suppressor of cytokine signaling 3*. J Immunol 2003; 170(6): 3263-72.
160. Welte, T. et al. *STAT3 deletion during hematopoiesis causes Crohn’s disease-like pathogenesis and lethality: a critical role of STAT3 in innate immunity*. Proc Natl Acad Sci U S A 2003; 100(4): 1879-84.

7. ANHANG

7.1 Abkürzungsverzeichnis

A	AD-HIES	Autosomal-dominantes Hyper-IgE-Syndrom
	ANA	Antinukleäre Antikörper
	APC	Allophyocyanin
	AR-HIES	Autosomal-rezessives Hyper-IgE-Syndrom
B	BP-3	Binding Protein-3
C	cDNA	complementary DNA
	CD	cluster of differentiation
	CDC42	cell division control protein 42
	CDG	chronic granulomatous disease
	ConA	Concavalin A
D	DHR	Dihydrorhodamin
	DHR 1, 2	DOCK Homology Region 1,2
	DMF	Dimethylformamide
	DNA	Desoxyribonukleinsäure
	dNTPs	Desoxyribonukleotidtriphosphate
	ddNTPs	Didesoxyribonukleotidtriphosphate
	ds DNA	doppelstrang DNA
	DOCK8	Dedicator of cytokinesis 8
	EBV	Epstein-Barr-Virus
E	EDTA	Ethylendiamintetraacetat
F	FACS	Fluorescence-activated cell sorting
	FBS	Fetales bovines (Kälber) Serum
	FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
	FOXP3	Forkhead Box Protein P3
G	gDNA	genomische DNA
	GEF	Guanosin triphosphate Exchange Factor
	GTP	Guanosintriphosphat
H	HIES	Hyper-IgE-Syndrom
	HHV	Humanes Herpes-Virus
	HPV	Humanes Papilloma-Virus
	HSCT	haematopoetic stem cell transplantation
	HZMV	Humaner Zytomegalie-Virus
I	ID#	Identifikationsnummer
	IgA, -E, -G, -M	Immunglobulin A, -E, -G, -M
	IGF-1	Insulin like Growth Factor-1
	IL	Interleukin
	INF	Interferon

	IPEX	Immunodysregulation polyendocrinopathy enteropathy X-linked syndrome
	IVIG	intravenöses Immunglobulin
	IU	International Units
J	JAK	JANUS KINASE
M	MCV	Molluscum Contagiosum Virus
	MFI	mittlere Fluoreszenzintensität
	MW	Mittelwert
	mRNA	messenger RNA
	MRT	Magnetresonanztomographie
N	NaCl	Natriumchlorid
	NGS	Next Generation Sequencing
	NIH	National Institutes of Health
	NK-Zellen	natürliche Killer Zellen
O	OD	optische Dichte
P	PBMC	peripheral blood mononuclear cell
	PBS	Phosphat puffered saline
	PCR	Polymerase-Kettenreaktion
	PerCP	Peridinin Chlorophyll
	PGM	Phosphoglucomutase
	PHA	Phytohämagglutinin
	PID	Primärer Immundefekt
	PMA	Phorbol-Myristat-Acetat
	PWM	Pokeweed
R	Rpm	rounds per minute
	RSV	Respiratory Syncytical Virus
	RTE	Recent thymic emigrants
	RT PCR	Reverse-Transkriptase PCR
S	SA	Standardabweichung
	SAC	Staphylokokkus Aureus Cowan I
	STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription
T	T_H1/2/17	T-Helferzelle 1/2/17
	TLR	Toll-like-Rezeptor
	TRECs	T cell receptor excision circles
	t RNA	transfer Ribonukleinsäure
	TYK	Tyrosinkinase
V	VZV	Varizella Zoster Virus
W	WASP	Wiskott-Aldrich Syndrome Protein
Z	ZNS	Zentrales Nervensystem

7.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Darstellung Patientenakquise	9
Abbildung 2: Hyper-IgE-Syndrom-Scoringsystem.....	11
Abbildung 3: Gelelektrophorese.....	17
Abbildung 4: Stammbäume DOCK8-HIES-Familien	25
Abbildung 5: Darstellung DOCK8-HIES-Mutationen unserer Kohorte	28
Abbildung 6: Klinische Symptomatik DOCK8-HIES-Patienten	34
Abbildung 7: Symptomverteilung DOCK8-HIES-Patienten vs. DOCK8-Wildtyp-Patienten.....	41
Abbildung 8: graphische Darstellung laborchemisch ermittelter Werte von DOCK8-HIES-Patienten	43
Abbildung 9: Perforin/Granzyme B positive CD8 ⁺ -Zellen	44
Abbildung 10: Darstellung Lymphozytenstimulation bei DOCK8-HIES-Patienten und Kontrollen	45
Abbildung 11: graphische Darstellung laborchemisch ermittelter Werte von DOCK8-HIES-Patienten	46
Abbildung 12: graphische Darstellung laborchemisch ermittelter Werte von DOCK8-HIES-Patienten	48
Abbildung 13: graphische Darstellung laborchemisch ermittelter Werte von DOCK8-HIES-Patienten	51
Abbildung 14: pSTAT3 bei DOCK8-HIES, DOCK8-Wildtyp und Kontrollen	55

7.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Lymphozytensubpopulationen nach CD-Klassifikation	19
Tabelle 2: Mutationen der DOCK8-HIES-Kohorte [20, 27, 54, 58-60]	27
Tabelle 3: Virale Infektionen und Pilzinfektionen von DOCK8-HIES-Patienten.....	31
Tabelle 4: Bakterielle Infektionen der DOCK8-HIES-Patienten	32
Tabelle 5: Klinische Daten DOCK8-HIES-Patienten	35
Tabelle 6: Virale Infektionen und Pilzinfektionen der DOCK8-Wildtyp-Patienten.....	37
Tabelle 7: Bakterielle Infektionen DOCK8-Wildtyp-Patienten	38
Tabelle 8: klinische Daten DOCK8-Wildtyp-Patienten.....	40
Tabelle 9: Zellzahlberechnung von DOCK8-HIES- und DOCK8-Wildtyp-Patienten.....	47
Tabelle 10: IgG-Subgruppen von DOCK8-HIES-Patienten im Vergleich zu DOCK8-Wildtyp-Patienten.....	49
Tabelle 11: Berechnung zu den Serum-Immunglobulinen von DOCK8-HIES- und DOCK8-Wildtyp-Patienten.....	50
Tabelle 12: Darstellung spezifischer Antikörper von DOCK8-Wildtyp-Patienten (ID#12-26)	53
Tabelle 13: Darstellung spezifischer Antikörper von DOCK8-HIES-Patienten (ID#1-11)	53
Tabelle 14: pSTAT3-Stimulation von DOCK8-HIES-Patienten, DOCK8-Wildtyp-Patienten und Kontrollen	55
Tabelle 15: Vergleich Mutationsanalyse	59
Tabelle 16a-c: Vergleichstabelle Klinik	71
Tabelle 17: Reagenzien.....	92
Tabelle 18: gDNA Primer	93
Tabelle 19: cDNA-Primer-Sequenzen	94

7.3.1. Reagenzien

Reagenz	Firma	Stadt, Land	Abschnitt
Anti DOCK8-Antikörper	Sigma-Aldrich	St. Louis, MO, USA	2.2.4
Goat-anti rabbit IgG HRP	Thermo Scientific	Rockford, USA	2.2.4
West-Femto Super Signal Chemolumineszenz Reagenz	Thermo Scientific	Rockford, USA	2.2.4
Anti-beta-Aktin Antikörper	Cellsignaling Technology	Danvers, USA	2.2.4
Ficoll-Paque Plus	Biochrom AG	Berlin, GER	2.3.2.1
Phytohämagglutinin (PHA)	Oxoid Limited	Basingstoke, UK	2.3.2.1
OKT 3	Immunotech	Marseille, FRA	2.3.2.1
Concavalin (ConA)	Sigma-Aldrich	St. Louis, MO, USA	2.3.2.1
Pokeweed (PWM)	Sigma-Aldrich	St. Louis, MO, USA	2.3.2.1
Staphylokokkus Aureus Cowan I (SAC)	Merck Chemicals GmbH	Schwalbach, GER	2.3.2.1
Diphtherie Antigen	Binding Site	Birmingham, UK	2.3.2.1
Tetanus Antigen	Binding Site	Birmingham, UK	2.3.2.1
Interleukin-6	Biochrome	Berlin, GER	2.3.1.2
Interleukin-10	Biochrome	Berlin, GER	2.3.1.2
Anti pSTAT3-Alexa 647 (Y705) Antikörper	BD Biosciences	Heidelberg, GER	2.3.1.2
CD31 FITC-Antikörper	Immunotech	Marseille, FRA	2.3.1.3
CD45 RA PE-Antikörper	Immunotech	Marseille, FRA	2.3.1.3
CD3 PerCP-Antikörper	BD Biosciences	Heidelberg, GER	2.3.1.3
CD4 APC-Antikörper	BD Biosciences	Heidelberg, GER	2.3.1.3
Foxp3-Antikörper (Foxp3-PE)	eBioscience	Frankfurt, GER	2.3.1.4
CD4 FITC-Antikörper	BD Biosciences	Heidelberg, GER	2.3.1.4
CD25 PC5-Antikörper	Beckman – Coulter	Krefeld, GER	2.3.1.4
Foxp3 Staining Buffer set	eBioscience	Frankfurt, GER	2.3.1.4
Alexa Fluor 647 Anti 17 A-Antikörper	Natutec	Frankfurt, GER	2.3.1.5
FITC Anti IFN- γ -Antikörper	Biozol	Eching, GER	2.3.1.5
Granzyme B Alexa 647-Antikörper	BD Biosciences	Heidelberg, GER	2.3.1.6

Tabelle 17: Reagenzien

7.3.2 Primer

gDNA	Vorwärts 5`-3` Richtung	Rückwärts 3`-5` Richtung
1	CTCCGAGCTCGGACCCTCC	GACGCGAATGGACTCGTCCG
2	GTTCTGCTCATTGCCAGCC	GGAACAGGAGGCAAACACATACC
3	GCAAGGCAAACATCTACTATTGCC	GAAGGCATCTCCCCTACCCAC
4	TTGGAATGATTGGGCAAGAAC	TGTGTGTGATATGGAGTGGGG
5	CAGCACCATGTCTACACTTAAGCC	GTAAAACGACAGCATGCCCTGG
6	CCCAAATTGGAGCAGTCTTG	AATAATGAACAACACAATTGTCCAC
7	TTAACTTGAGCCGTGGAGGG	GAAGAATGACCATCAAGAAGTTGG
8	TCCAAATATTTGGGAAACTGC	TCAAATCTGATAGTTCTTGCTGC
9	CCTTCAGCAAATTTCTCTGTGG	CAAACATGTGCTGGGAACAACAC
10	AGCTTCCTATGTCATCAAATATTGTC	GGGACACATTAGGGACTAAAGCC
11	GTCATATTCAGGTCAGAGGCAGTTG	CTAGTAAGCTGTGGACCTGGGC
12	TGGCCATATTCAGTGTTCTG	ATCCTCCTCCTGTGGGTTCC
13	TCCCAGAAATCGTTTGTCCC	TGCCAAAGACATAGAACAATTTCAG
14	CATGAAAGAAACACAGTCAACAATC	GACACGTTTTTGCCATGTTGC
15	AAGCACCCCATGAATGGAAG	TCCCGGACTTGTGTGAAGTG
16	AGAACATCCTGTTGGCCTGATG	TTAGGAGGAACCCACCCG
17	ACACCAGGCAAATTCTGAGGAG	TTTCTGCCTCTTGCTATAATGTGG
18	TTGCATTTGATTATTGCGAGC	CCACATGGGAATGGAAAGTG
19	GGGCTCCTGACTCCAAGAAC	AGAGGTTTGCATGTCCCAC
20	CTTCTGGTCTGAAACGCTGG	GCACACATCATCAGTGGAAAGG
21	CTAGTTAAATTGGTCAGCGGTCAG	GTTGCAGATGTGAGCCCCTG
22	GCTTTTCATCCACCCTATCCC	GTGGGCAGCAGTAGTGGTTG
23	CTGAGGTTGTGATTTCCAGATGTC	GGAGCACTTTGACTATTTCCAAG
24	GAACATCTAAGACACATGCTTCAGG	CAGCAGGGGCAACTCAGTG
25	GCACCACCAGCACAGATAAAG	CCACATCAGGGTCCAGTCC
26	CCAGTGCCACCAGAAGGAC	AACTCAGTAATGAAGAAGACAGCGTG
27	GATTGCCTTAACCTGGAGAGAAAG	GCTAGTGGTGTAACTTCAGGGTAGC
28	CTACCTCACTGGGGAGGGCTC	CTCAAGACAGATGTTTCTACTCCTCAG
29	TGCTTGGTTTTACAGTCACC	CAGCACTGGAACGAATGACAG
30	GGTTTGAATTACTGTGCTGACTTTAG	CTGAGGCATGAAGAACCCTGG
31	GATCTCCAGCCTAGCAGTGATG	CTCCATGGCCCAAACAAG
32	TGTCAAACCTTAGCTGGCATCACTG	GAATCCGCTGTCTCTGACTACTACC
33	CCCGAGAAATGGTGCTGAGG	TTGGAAGGATGCAGTTGTTTCAG
34	GGATGAGGATGACCAGGAAACC	GTCAAAGAAGCCAGAAGAATGTTTG
35	CACTGGACATGGAACATCAGC	CTGTGACTTTTGGTCCACCTG
36	TGATAACACAGCTCTGACCCTTTAG	TTTTTCGCAGCTGATGCTTTAC
37	GTGTCTGGCCATGCTGCTTTC	CATACACAATAGTTGGCAGATCCC
38	TGATCCAACCTTCCCATGG	CAGTGACAAATCCTCGACCCC
39	AAAAGGTCACACAAAGTAGAAGAACAG	GCACCTACTCACCCATCCCAG
40	ATTCGGGGTTCCTGTGGTC	CCAGCACCCCAAGTCCAG
41	GGACAATGACCTCTGGTTGCTC	CCCTGGAGAGGAAGGATGGC
42	ACACAATGAGAGACCCCTGCC	TTGGTGATGACCCACTCTAACTTG
43	CATCATTCTACCTTCACTTGCTC	GTTTGACTGCATTTAAGTGACTTGG
44	TCCATTGCGTCAGGGATG	GTTTGTGGGTCTCCTGGG
45	TGGCCTCTCTGTCATAGCTCC	AAGGAAGAAGGGTGCAGACG
46	TGAGATGTCCAAGACCTTCCTT	GGTGCCTGAGACTTTGTCTTTC
47	AGGTGATCCCGATATGCCAC	TGACTGTGGGACCCTCTTCC
48	ACTGATGTCCATTTCTACTGGGTG	TCAGATGGGCAGTGATTGGC

Tabelle 18: gDNA Primer

Für Exon 19, 24, 37 wurde der Rückwärtsstrang sequenziert (fett gedruckt)

Primer-ID	Vorwärts 5'-3' Richtung	Rückwärts 3'-5' Richtung
1c	GACAGACGAGGTTTGCCTTG	
4ac		GAGTGTACAGTCAGTCCTGGGTGG
4c	GAAGACATGAAGAAGAAGACCCTGC	
Ac	GGAAACCTTGGAGTGCAGTGAAC	GTTCACTGCACTCCAAGGTTTCC
Bc	CCCTACACGGTTATCAAAGAAAGTG	
Cc	GACACGCCCGCACAAAGAGA	
Dc	CCACCCAACACTCCATGCATTC	
Ec	CTCCCACTGCCCTCCTAGACC	
Fc	GAAGGAAAATGAACAGGCGGA	
Gc	GCTCGGATGAAGAACAAGAAGG	
Hc	CTGGGAGGTGTTCTGAGGGTG	
Ic	GCTGCGTTAGTGGCTGAGTATCTG	
Kc	CTTTTGTGGAGCCCTACTTTGATG	

Tabelle 19: cDNA-Primer-Sequenzen

„Fett“ gedruckte Primer wurden für die PCR verwendet, grau hinterlegte für die Sequenzierung

7.4 Danksagung

Ich bedanke mich bei Priv.-Doz. Dr. med. Ellen Renner für die Bereitstellung des Themas und die damit zusammenhängenden Patientendaten und Labormaterialien. Vor allem bedanke ich mich jedoch für ihre unermüdliche Geduld und Ausdauer. Sie war es, neben anderen, die mich motivieren konnte diese Arbeit fertigzustellen und in ihrer heutigen Form abzugeben. Besonders möchte ich mich bei Dr. Beate Hagl und Benedikt Spielberger bedanken, die mir freundschaftlich und konstruktiv immer zur Seite standen und die sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Natürlich geht mein Dank auch an das gesamte Team des immunologischen Forschungslabors am Dr. von Haunerschen Kinderspital Dipl.-Biol. Julie Sawalle-Belohradsky, Irmgard Eckerlein, Mayumi Hoffmann und Evi Eisel und Prof. Dr. med. BH Belohradsky.

Außerdem bedanke ich mich bei Priv.-Doz. Dr. med. Michael Albert, der in schwierigen Phasen dieser Arbeit für mich da war.

Des Weiteren möchte ich an dieser Stelle auch alle Patienten und deren Familien sowie die zuweisenden Ärzte erwähnen und mich herzlich bei ihnen für die gute Zusammenarbeit bedanken.

Besonderer Dank gilt meiner Mutter und meiner Großmutter für die ausdauernde Unterstützung, die vielen konstruktiven Gespräche und den ständigen Rückhalt während der letzten Jahre.

7.5 Veröffentlichungen

B. Hagl, A.C. Boos, V. Heinz, A. Schlesinger, B.D. Spielberger, PD Dr. E.D. Renner

Hyper-IgE-Syndrome erkennen Pädiatrie hautnah 2012 Mai 24(5):330-4

Mizesko, M. C., Banerjee, P. P., Monaco-Shawver, L., Mace, E. M., Bernal, W. E., Sawalle-Belohradsky, J., Belohradsky, B. H., Heinz, V., Freeman, A. F., Sullivan, K. E., Holland, S. M., Torgerson, T. R., Al-Herz, W., Chou, J., Hanson, I. C., Albert, M. H., Geha, R. S., Renner, E. D. and Orange, J. S.

Defective actin accumulation impairs human natural killer cell function in patients with dedicator of cytokinesis 8 deficiency J Allergy Clin Immunol. 2013 Mar 131(3):840-8

Papan, C. and Hagl, B., Heinz, V., Albert, M. H., Ehrh, O., Sawalle-Belohradsky, J., Neumann, J., Ries, M., Bufler, P., Wollenberg, A. and Renner, E. D.

Beneficial IFN-alpha treatment of tumorous herpes simplex blepharoconjunctivitis in dedicator of cytokinesis 8 deficiency J Allergy Clin Immunol 2014 May 133(5):1456-8

Boos, A. C. and Hagl, B., Schlesinger, A., Halm, B. E., Ballenberger, N., Pinarci, M., Heinz, V., Kreilinger, D., Spielberger, B. D., Schimke-Marques, L. F., Sawalle-Belohradsky, J., Belohradsky, B. H., Przybilla, B., Schaub, B., Wollenberg, A. and Renner, E. D.

Atopic dermatitis, STAT3- and DOCK8-hyper-IgE syndromes differ in IgE-based sensitization pattern Allergy 2014 Jul 69(7):943-53

Aydin, S.E., Kilic, S.S., Aytakin, C., Kumar, A., Porras, O., Kainulainen, L., Kostyuchenko, L., Genel, F., Kütükcüler, N., Karaca, N., Gonzalez-Granado, L., Abbott, J., Al-Zahrani, D., Rezaei, N., Baz, Z., Thiel, J., Ehl, S., Marodi, L., Orange, J.S., Sawalle-Belohradsky, J., Keles, S., Holland, S.M., Sanal, Ö., Ayvaz, D.C., Tezcan, I., Al-Mousa, H., Alsum, Z., Hawwari, A., Metin, A., Matthes-Martin, S., Hönig, M., Schulz, A., Picard, C., Barlogis, V., Gennery, A., Ifversen, M., van Montfrans, J., Kuijpers, T., Bredius, R., Dückers, G., Al-Herz, W., Pai, S.Y., Geha, R., Notheis, G., Schwarze, C.P., Tavil, B., Azik, F., Bienemann, K., Grimbacher, B., Heinz, V., Gaspar, H.B., Aydin, R., Hagl, B., Gathmann, B., Belohradsky, B.H., Ochs, H.D., Chatila, T., Renner, E.D., Su, H., Freeman, A.F., Engelhardt, K., Albert, M.H.

DOCK8 deficiency: clinical and immunological phenotype and treatment options - a review of 136 patients J Clin Immunol 2015 Feb 35(2):189-98

Hagl, B., Heinz, V., Schlesinger, A., Spielberger, B. D., Sawalle-Belohradsky, J., Senn-Rauh, M., Magg, T., Boos, A. C., Hönig, M., Schwarz, K., Dückers, G., von Bernuth, H., Christoph, P., Karitnig-Weiss, C., Belohradsky, B. H., Josef, F., Niehues, T., Wahn, V., Albert, M. H., Wollenberg, A., Jansson, A. F., Renner, E.D.

Key findings to expedite the diagnosis of hyper-IgE syndromes in infants and young children Pediatr Allergy Immunol 2015 Nov