

**Intrazelluläres Zytokinprofil und
Toll-like Rezeptor Signalwege
beim autosomal-dominanten
Hyper-IgE-Syndrom**

Ingo Roland Pawlita

2009

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

Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h.c. D. Reinhardt

**Intrazelluläres Zytokinprofil und
Toll-like Rezeptor Signalwege
beim autosomal-dominanten
Hyper-IgE-Syndrom**

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

**vorgelegt von
Ingo Roland Pawlita
aus
Aachen**

2009

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. B.H. Belohradsky

Mitberichterstatter: Prof. Dr. L. Klein
Priv. Doz. Dr. M. Vogeser
Priv. Doz. Dr. C. Bourquin

Mitbetreuung durch die
promovierten Mitarbeiter: Dr. E. Renner
Dr. F. Hoffmann

Dekan: Prof. Dr. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 15.10.2009

Danksagung

Sehr herzlich bedanke ich mich bei Prof. Dr. med. B.H. Belohradsky, dass er mir die Möglichkeit gegeben hat, ein derart interessantes und herausforderes Gebiet der pädiatrischen Immunologie in Form einer Dissertation zu bearbeiten. Meinen Betreuern Dr. med. E. Renner und Dr. med. F. Hoffmann danke ich ganz besonders für die andauernde und intensive Unterstützung beim Bearbeiten der praktischen und theoretischen Teile dieser Doktorarbeit.

Besonderer Dank gebührt auch Dr. med. S. Rothenfusser und seinen Mitarbeitern für die Durchführung der Analyse der Toll-like Rezeptor Signalwege und die mir gegebene Möglichkeit, die gewonnenen Daten in dieser Arbeit zu verwenden.

Dr. med. Dominik Hartl danke ich sehr für die Durchführung des Cytometric Bead Array zur Verwendung in dieser Arbeit.

Mein Dank gilt auch den Mitarbeiterinnen des Zytokin-Labors und des immunologischen Labors im Dr. von Haunerschen Kinderspital, die mich bei den Experimenten immer helfend unterstützt haben.

Für die Beratung bei der statistischen Auswertung der gewonnenen Daten danke ich herzlich Dr. Philipp Pagel, Lehrstuhl für Genomorientierte Bioinformatik an der Technischen Universität München.

Großer Dank gebührt den Patienten und ihren Familien für die Teilnahme an den Untersuchungen dieser Arbeit.

Mein ganz besonderer Dank geht an die Menschen, ohne die die Fertigstellung dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre - meine Eltern, meinen Bruder und Anna.

	Seite
<u>1. Einleitung und Fragestellung</u>	7
1.1. Einleitung	7
1.2. Fragestellung	8
<u>2. Das Hyper IgE-Syndrom (HIES) und immunologische Grundlagen</u> ...	9
2.1. Das HIES	9
2.1.1. Geschichte des HIES.....	9
2.1.2. Definition des HIES.....	10
2.1.3. HIES-Score.....	11
2.1.4. Genetische Variabilität des HIES.....	13
2.1.5. Pathogenese des HIES.....	14
2.1.5.1. Funktionelle Störung der neutrophilen Granulozyten.....	14
2.1.5.2. Fehlregulation der Produktion und Sekretion von Zytokinen.....	14
2.1.5.3. Weitere mögliche Ursachen des HIES.....	15
2.1.6. Symptomatische Therapie des HIES.....	15
2.2. Immunologische Grundlagen	16
2.2.1. Definition und Charakterisierung der Zytokine.....	16
2.2.1.1. Definition von Zytokinen.....	16
2.2.1.2. Charakterisierung der untersuchten Zytokine.....	16
2.2.1.3. Einteilung der T-Helfer-Lymphozyten Antwort.....	21
2.2.2. Definition und Charakterisierung der Toll-like Rezeptoren (TLR). 22	22
2.2.2.1. Definition der TLR.....	22
2.2.2.2. Charakterisierung der untersuchten TLR.....	25
<u>3. Patienten, Material und Methoden</u>	26
3.1. Patienten	26
3.1.1. Klinik der Patienten und HIES-Score.....	27
3.1.2. Ausschluss anderer Immundefekte.....	29
3.1.3. Patienten und Kontrollkollektiv.....	29
3.2. Material und Methoden Zytokinmessung	30
3.2.1. Material und Methoden intrazelluläre FACS-Analyse.....	30
3.2.1.1. Material intrazelluläre FACS-Analyse.....	30
3.2.1.1.1. Material intrazelluläre FACS-Analyse Lymphozyten.....	30
3.2.1.1.2. Material intrazelluläre FACS-Analyse Monozyten.....	31
3.2.1.2. Methoden intrazelluläre FACS-Analyse.....	32
3.2.1.2.1. Allgemeines zur Analyse von Lymphozyten und Monozyten... 32	32

3.2.1.2.2. Lymphozyten.....	32
3.2.1.2.3. Monozyten.....	35
3.2.2. Cytometric Bead Array (CBA).....	39
3.2.2.1. Allgemeine Informationen zum CBA.....	39
3.2.2.2. Material und Methoden CBA.....	39
3.3. Material und Methoden Toll-like Rezeptoren (TLR).....	41
3.4. Statistische Auswertung.....	41
<u>4. Ergebnisse</u>.....	42
4.1. Zytokinprofil in Lymphozyten und Monozyten.....	42
4.1.1. Intrazelluläre FACS-Analyse.....	42
4.1.1.1. Lymphozyten.....	42
4.1.1.2. Monozyten.....	44
4.1.2. CBA.....	46
4.2. TLR Signalwege.....	48
<u>5. Diskussion</u>.....	54
5.1. Verändertes Zytokinprofil bei HIES.....	54
5.2. Ausschluss eines Defektes der TLR Signalwege.....	58
5.3. Mutationen des STAT3-Gens bei HIES.....	59
<u>6. Zusammenfassung</u>.....	62
<u>7. Literatur</u>.....	64
<u>8. Abkürzungen</u>.....	75
<u>9. Lebenslauf</u>.....	78

1. Einleitung und Fragestellung

1.1. Einleitung

Das Hyper-IgE-Syndrom (HIES; OMIM # 147060) ist ein seltener primärer Immundefekt, der durch rezidivierende Staphylokokken-Infektionen der Lunge und der Haut, ein chronisches Ekzem und erhöhte Spiegel des Immunglobulins E (IgE) im Serum gekennzeichnet ist (Buckley 2001, Grimbacher et al. 1999a, Belohradsky et al. 1987). Da sich zusätzlich weitere nicht immunologische Symptome finden, die das Skelettsystem und das Bindegewebe betreffen (z.B. Milchzahnpersistenz, Spontanfrakturen, Überstreckbarkeit der Gelenke und/oder vergrößerte Gesichtszüge), wird das HIES als Multisystemerkrankung bezeichnet (Grimbacher et al. 1999a).

Obgleich seit der ersten klinischen Beschreibung im Jahre 1966 (Davis et al. 1966) intensive Bemühungen unternommen worden, die Ätiologie und Pathogenese des HIES zu ergründen, konnte bisher keine zu Grunde liegende Veränderung gefunden werden, die die verminderte Immunabwehr als auch die anderen nicht immunologischen Symptome schlüssig erklärt.

Da die Ursache des HIES noch nicht bekannt ist, wird die Erkrankung bisher vor allem symptomatisch durch frühzeitige antibiotische Bekämpfung der rezidivierenden Infektionen therapiert.

Vor allem wegen des meist mit >2000 IU/ml erhöhten IgE im Serum ist ein fehlerhaftes Zytokinprofil bei HIES-Patienten als mögliche Ursache der Erkrankung in das Blickfeld der Forschung geraten. Mittels FACS-Analyse (Fluorescence Activated Cell Sorting) versucht die vorliegende Studie, ein umfassendes Bild der intrazellulären Zytokinproduktion in Lymphozyten und Monozyten bei HIES-Patienten aufzuzeigen und mögliche Defekte oder Überproduktionen an Zytokinen zu identifizieren. Um den Blick auf die Zytokinproduktion zu komplettieren, werden die Serum-Spiegel ausgewählter Zytokine mittels Cytometric Bead Array (CBA) gemessen.

Ein verändertes Zytokinprofil ließe sich durch einen Defekt bei der Erkennung mikrobieller Strukturen durch die sogenannten Toll-like Rezeptoren (TLR) erklären. Deshalb untersucht diese Arbeit die Zytokinproduktion im Serum nach Stimulation mit spezifischen TLR-Liganden mittels Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA), um einen möglichen Defekt im Bereich der angeborenen Immunität (= Fehler der Fremderkennung), speziell der TLR, zu finden.

Die Ergebnisse dieser Studie werden im weiteren Verlauf bezogen auf den Kenntnisstand der HIES-Forschung im Jahre 2005, nach Fertigstellung des experimentellen Teils dieser Arbeit, diskutiert. Auf aktuelle Entwicklungen im Bereich HIES wird am Ende der Diskussion (Kap. 5.3.) eingegangen.

1.2. Fragestellung

Ziel dieser Arbeit ist es:

Veränderungen des intrazellulären Zytokinprofils in Lymphozyten und Monozyten und der Serumspiegel einzelner Zytokine von HIES-Patienten gegenüber gesunden Kontrollpersonen sollen charakterisiert werden und wenn möglich Rückschlüsse auf die zu Grunde liegende Veränderung gezogen werden.

Ein möglicher Defekt im Bereich verschiedener TLR Signalwege bei HIES-Patienten soll dargestellt werden, der zum einen die eingeschränkte Immunabwehr und zum anderen das veränderte Zytokinprofil erklären kann.

2. Das Hyper-IgE-Syndrom (HIES) und immunologische Grundlagen

2.1. Das HIES

2.1.1. Geschichte des HIES

Die erste klinische Beschreibung des HIES stammt aus dem Jahre 1966, als Davis, Schaller und Wedgewood zwei nicht verwandte Mädchen beschrieben. Diese litten unter häufigen Infekten der oberen und unteren Atemwege, einem schweren, unmittelbar nach der Geburt einsetzenden Ekzem und rezidivierenden Staphylokokkenabszessen der Haut ohne charakteristische Entzündungszeichen. Nach der biblischen Figur Hiob, der vom Teufel mit Geschwüren am ganzen Körper geschlagen wurde, wurde die Erkrankung als „Hiob-Syndrom“ (engl. „Job’s Syndrome“) bezeichnet (Davis et al. 1966).

Bei der Beschreibung zweier Jungen 1972 durch Buckley et al. wurden dem Krankheitsbild weitere Symptome wie eine charakteristische Fazies und erhöhte Serum-IgE-Spiegel hinzugefügt und das Krankheitsbild auch als „Buckley’s Syndrome“ bezeichnet (Buckley et al. 1972).

Als sich herausstellte, dass das deutlich erhöhte Serum-IgE ein wichtiges Charakteristikum der Erkrankung ist, wurde das Krankheitsbild als „**Hyper-IgE-Syndrom**“ zusammengefasst (Buckley et al. 1978, Däumling et al. 1980, Donabedian et al. 1983).

Aus dieser Zeit stammen auch die ersten Beschreibungen einer familiären Häufung der Erkrankung (Van Scoy et al. 1975, Blum et al. 1977), so dass von einer angeborenen Form eines Immundefektes ausgegangen werden konnte (siehe Kap. 2.1.4.).

Donabedian und Gallin teilten die klinischen Befunde in Hauptsymptome (rezidivierende Infektionen der Haut und Atemwege, ein mindestens 10fach erhöhtes Serum-IgE) und variable Nebensymptome (grobe Gesichtszüge, chronisches Ekzem, kalte Hautabszesse, milde Eosinophilie, mukokutane Candidiasis und ein Chemotaxisdefekt der Neutrophilen) ein (Donabedian et al. 1983).

Bei der Evaluation von 30 HIES Patienten durch eine Arbeitsgruppe der National Institutes Of Health (NIH) wurde wegen assoziiert vorliegender Symptome des Skelettsystems wie Veränderungen im Bereich des Gesichtes, der Zähne, der Wirbelsäule, der Knochenstabilität und der Gelenke das HIES als **Multisystemerkrankung** definiert (Grimbacher et al. 1999b).

2.1.2. Definition des HIES

Die beschriebene Entwicklung bei der Einordnung der Erkrankung führt zur Definition des HIES als seltenen primären Immundefekt, der sich durch folgende klinische Trias auszeichnet:

Rezidivierende Staphylokokkenabszesse der Haut

Rezidivierende Pneumonien mit Pneumatozelenbildung

Ekzem mit erhöhtem Serum-IgE (>2000 IU/ml) und Eosinophilie

Zusätzlich können Symptome im Bereich des Skelettsystems wie charakteristische Fazies, Überstreckbarkeit der Gelenke, vermehrte Knochenbrüchigkeit und persistierende Milchzähne in unterschiedlicher Ausprägung hinzukommen (Davis et al. 1966, Buckley et al. 1972, Grimbacher et al. 1999a, Erlewyn-Lajeunesse 2000, Renner 2002a).

2.1.3. HIES-Score

Bei der klinischen Beurteilung eines Patienten wird hauptsächlich ein von den National Institutes Of Health (NIH) entwickelter Score verwendet. Dieser wurde ursprünglich erstellt, um bei Verwandten von HIES-Patienten einschätzen zu können, ob sie das erkrankte Gen mit verminderter Expressivität tragen (Grimbacher et al. 1999b). Gegenwärtig dient der Score vor allem dazu, bei Patienten die Wahrscheinlichkeit eines HIES zu bestimmen.

Bei diesem Score werden einzelnen Symptomen des HIES der Ausprägung entsprechend Punkte zugeordnet und diese am Schluss addiert. So ergibt sich eine Höchstpunktzahl von 117 Punkten, ab 40 Punkten gilt die Diagnose HIES als sehr wahrscheinlich (Grimbacher et al. 1999b).

Die Punktzahl lässt sich folgendermaßen interpretieren:

> 40 Punkte	HIES sehr wahrscheinlich
20 – 40 Punkte	klinischer Verdacht auf HIES
< 20 Punkte	HIES unwahrscheinlich

Tab. 1: Darstellung des HIES-Scores und daraus folgender Krankheitswahrscheinlichkeit

Alle Patienten, die in die Studie für diese Dissertation eingeschlossen wurden, haben einen Score von über 40 Punkten und dementsprechend die klinisch gesicherte Diagnose eines HIES.

Auf die klinischen Daten der Patienten und die daraus resultierenden Score-Werte wird in Kapitel 3.1.1. näher eingegangen.

Abb. 1 zeigt das Formblatt, das zum Ermitteln des Scores verwendet wird. Es werden klinische Symptome und laborchemische Veränderungen berücksichtigt. Da einige Symptome erst in späteren Lebensjahren auftreten, enthält der Score eine Alterskorrektur.

Abb. 1: Formblatt zur Berechnung des HIES-Scores (übersetzt aus Grimbacher et al. 1999b)

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

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 1994)

2.1.4. Genetische Variabilität des HIES

Schon erste klinische Beschreibungen zum HIES wiesen darauf hin, dass das HIES familiär gehäuft auftritt (Van Scoy et al. 1975, Blum et al. 1977).

Durch die von Blum et al. (1977) und Grimbacher et al. (1999a) beobachtete Vater-zu-Sohn-Vererbung konnte ein x-chromosomal-gebundener Erbgang ausgeschlossen werden. Dies bestätigte auch die Studie von Belohradsky et al. (1987), in der sich eine annähernd gleiche Geschlechtsverteilung ergab. Diese Arbeiten führten zur These, dass es sich beim „klassischen“ HIES um eine **autosomal-dominant mit variabler Expressivität** vererbte Erkrankung handelt (Grimbacher et al. 1999a). Eine Zuordnung der Erkrankung zu einer Region auf Chromosom 4q21 konnte allerdings nur teilweise hergestellt werden (Grimbacher 1999b).

Wichtig bei der Betrachtung der Vererbung des „klassischen“ HIES ist, dass es sich bei den meisten Patienten um das Auftreten von **Spontanmutationen** handelt, also dass das HIES bei diesen Patienten erstmals in der Familie auftritt und damit keine weiteren erkrankten Familienangehörige bekannt sind (Donabedian et al. 1983, Grimbacher et al. 1999, Renner 2002a).

Daneben gibt es eine deutlich seltenere **autosomal-rezessiv vererbte Form** des HIES. Sie zeigt die gleichen Hauptsymptome (rezidivierende Infektionen der Atemwege und der Haut, erhöhtes Serum-IgE mit Ekzem und Eosinophilie), aber keine Symptome des Skelettsystems. Dafür besteht ein erhöhtes Risiko für schwere rezidivierende Infektionen durch Pilze und Viren wie z.B. Molluscum contagiosum, Herpes zoster und Herpes simplex. Außerdem treten häufig Symptome des zentralen Nervensystems wie Hemiplegie, Hirninfarkte und Subarachnoidalblutungen auf und tragen damit zur hohen Mortalität der Erkrankung bei. Bei Tests der Lymphozytenproliferation konnte festgestellt werden, dass bei dieser Form des HIES die Lymphozyten der Patienten schwach auf Mitogene reagieren und bei Kontakt mit Antigenen nicht proliferieren (Renner et al. 2004).

2.1.5. Pathogenese des HIES

Die Ursachenforschung im Bereich des HIES ist komplex, da eine mögliche Erklärung für den Immundefekt und gleichzeitig für die assoziierten Symptome vor allem im Bereich des Skelettsystems gefunden werden muss.

Im Folgenden zeigt sich, dass es bereits einige unterschiedliche Ansätze gegeben hat, die Ursache des HIES zu ergründen.

2.1.5.1. Funktionelle Störung der neutrophilen Granulozyten

Erste Studien zum HIES schrieben die verminderte Immunantwort einem **Chemotaxis-Defekt** der Granulozyten zu (Hill et al. 1974a, Hill et al. 1974b, Van Scoy et al. 1975, Blum et al. 1977, Däumling et al. 1980, Gahr et al. 1987) bzw. einem durch mononukleäre Zellen produzierten Inhibitor der Leukozyten-Chemotaxis (Donabedian et al. 1982).

Der Chemotaxis-Defekt erwies sich in anderen Studien als sehr inkonsistent (Däumling et al. 1980, Buckley et al. 1981) und variierte teilweise innerhalb eines Patienten zu unterschiedlichen Zeiten (Donabedian et al. 1983).

Auch neuere Studien zeigten kein einheitliches Bild bezüglich eines möglichen Chemotaxis-Defektes (Netea et al. 2002, Ito et al. 2003, Montoya et al. 2003).

Wegen der Unbeständigkeit eines möglichen Chemotaxisdefekts ist dieser höchstwahrscheinlich nicht die alleinige Ursache der Infektionsanfälligkeit bei HIES-Patienten (Buckley 2001).

2.1.5.2. Fehlregulation der Produktion und Sekretion von Zytokinen

Aufgrund des hohen Serum-IgEs beschäftigte sich ein großer Teil der HIES-Forschung mit der Produktion und Sekretion von Zytokinen und einer möglichen Fehlregulation in diesem Bereich.

Einige Studien sahen die Ursache des erhöhten Serum-IgE in einem möglichen **Überwiegen der Antwort von T-Helfer-Lymphozyten Typ2 (T_H2-Zellen) gegenüber der von T-Helfer-Lymphozyten Typ1 (T_H1-Zellen)** mit entsprechend verschobener Zytokinproduktion.

Verändert scheint vor allen Dingen die **Produktion bzw. die Sekretion des Typ1-Zytokins IFN- γ** (Del Prete et al. 1989, Paganelli et al. 1991, Shirafuji et al. 1999, Borges et al. 2000, Netea et al. 2002, Ito et al. 2003, Hawn et al. 2005, Netea et al. 2005).

2.1.5.3. Weitere mögliche Ursachen des HIES

Neben dem Thema Zytokine bei HIES gibt es noch einzelne Studien, die sich mit weiteren möglichen Ursachen für das HIES beschäftigen, so z.B. mit der Frage einer Chemokin-Dysregulation (Chehimi et al. 2001) oder einer verminderten Expression von kostimulatorischen Adhäsionsmolekülen bei der T-Zell-Antwort (Martinez et al. 2004).

2.1.6. Symptomatische Therapie des HIES

Bei unklarer Ätiologie ist bisher auch keine kausale Therapie des HIES bekannt, so dass eine symptomatische antimikrobielle und chirurgische Therapie im Vordergrund steht. Mittel der Wahl ist eine niedrig dosierte Dauerprophylaxe mit einem gegen *Staphylococcus aureus* wirksamen Antibiotikum. Bei einer akuten Infektion ist eine hochdosierte Antibiotikatherapie indiziert. Hinzu kommen teilweise eine antimykotische Dauertherapie und Maßnahmen zur Hautpflege (Renner et al. 2002b).

Über experimentelle Therapieversuche wie z.B. mit Ciclosporin A (Etzioni et al. 1997, Bong et al. 2005), mit rekombinantem menschlichem INF- γ (Jeppson et al. 1991, King et al. 1989, Aihara et al. 1998) oder i.v.-Immunglobulinen (Wakim et al. 1998) liegen bisher keine gesicherten Ergebnisse größerer Studien über Wirkung und Nebenwirkungen vor, so dass in diesen Fällen ein endgültiges Urteil über die Wirksamkeit noch aussteht.

Erste Fallbeschreibungen über eine allogene Stammzelltransplantation zeigten keinen langfristigen Erfolg (Nester et al. 1998, Gennery et al. 2000).

2.2. Immunologische Grundlagen

2.2.1. Definition und Charakterisierung der Zytokine

2.2.1.1. Definition von Zytokinen

Zytokine sind von unterschiedlichen Zellen freigesetzte Proteine, die funktionelle Auswirkungen auf Wachstum, Differenzierung und Aktivierung anderer Zellen haben und so den Charakter von Immunantworten bestimmen (Borish et al. 2003).

Zytokine werden von vielen Zelltypen gebildet: T- und B-Lymphozyten, Monozyten, Makrophagen, NK-Zellen, Granulozyten, dendritischen Zellen, Mastzellen, aber auch Epithelzellen, Stromazellen, Fibroblasten, Hepatozyten, Astrozyten, Gliazellen und Osteoblasten (Holländer et al. 2005b).

2.2.1.2. Charakterisierung der untersuchten Zytokine

Diese Arbeit konzentriert sich auf Zytokine, die vorwiegend in T-Lymphozyten und Monozyten gebildet werden. Untersucht wird die intrazelluläre Produktion von Interferon- γ (IFN- γ), Interleukin-2 (IL-2), IL-4, IL-10, Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α) in T-Lymphozyten und von IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 und TNF- α in Monozyten.

Außerdem werden die Serumspiegel der Zytokine IFN- γ , TNF- α , IL-2, IL-4, IL-5 und IL-10 mittels CBA ermittelt.

Im Folgenden werden die untersuchten Zytokine kurz charakterisiert:

a) Produktion vorwiegend in Lymphozyten

Interleukin-2 (IL-2): IL-2 wird vor allen Dingen von aktivierten **CD4⁺-T-Lymphozyten** gebildet, aber auch von **CD8⁺-T-Lymphozyten**. Es dient als T-Zell-Wachstumsfaktor, aktiviert aber auch NK-Zellen, B-Lymphozyten, zytotoxische T-Zellen und Makrophagen. Außerdem stimuliert IL-2 reife T-Lymphozyten zur Produktion und Sekretion von Zytokinen (IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, GM-CSF, IFN- γ) und trägt so zur **Regulation von gerichteter Immunantwort und Hämatopoese** bei.

Interleukin-4 (IL-4): Hauptproduzent von IL-4 sind **T-Helfer-Lymphozyten Typ2 (T_H2-Lymphozyten)**, ferner wird es von Mastzellen, eosinophilen und basophilen Granulozyten produziert. IL-4 ist ein wichtiger **Wachstumsfaktor** für T- und B-Lymphozyten. So fördert IL-4 bei T-Zellen die Differenzierung

zytotoxischer Effektorzellen und die **Polarisierung naiver T-Zellen zu einem Typ-2-Phänotyp**. Bei B-Zellen steigert IL-4 den Antikörper-Isotypen-Klassenwechsel von IgM zu IgE und IgG₄ und hat so eine entscheidende Bedeutung bei allergischen Erkrankungen. Bei der Steigerung der IgE-Produktion helfen andere Zytokine wie IL-2, IL-5, IL-6 und IL-9.

Interleukin-5 (IL-5): IL-5 wird vor allem von aktivierten **T_H2-Lymphozyten**, eosinophilen Granulozyten und Mastzellen gebildet. Es gilt als sehr wichtig für die **Reifung und Aktivierung von eosinophilen Granulozyten**, wirkt deren Apoptose entgegen und fördert deren Degranulation. Für die Ausbildung einer Blut-Eosinophilie gilt IL-5 als entscheidender Faktor. Außerdem aktiviert es die Reifung von zytotoxischen T-Lymphozyten und die Differenzierung von basophilen Granulozyten.

Interferon- γ (IFN- γ): Gebildet wird IFN- γ hauptsächlich von **Typ1-polarisierten CD4⁺- und CD8⁺-Lymphozyten** und von NK-Zellen, zeitweilig auch von Makrophagen. Es spielt eine wichtige Rolle in der zellvermittelten Immunität. Unter Einfluss von IFN- γ kommt es zu einer vermehrten Expression von Molekülen der Haupthistokompatibilitätskomplexe (MHC) I und II. Die **Präsentation von Antigenen und die Zytokinproduktion von Monozyten** werden stimuliert, wie auch die Effektivität der Makrophagen bei Adhärenz, Phagozytose, Freisetzung von Sauerstoffradikalen und Synthese von Stickstoffmonoxid (NO). Außerdem werden NK-Zellen und neutrophile Granulozyten aktiviert. Insgesamt fördert IFN- γ eine Entzündungsreaktion, in deren Mittelpunkt die Funktion der Makrophagen steht.

Bei B-Lymphozyten hemmt IFN- γ den Isotypen-Wechsel zu IgG₄ und IgE. So ist IFN- γ der wichtigste Suppressor der durch IL-4 und IL-13 vermittelten IgE-Produktion.

b) Produktion vorwiegend in Monozyten

Interleukin-1 β (IL-1 β): IL-1 β gehört neben IL-1 α zur IL-1-Familie und besitzt ähnliche biologische Funktionen, die deshalb als IL-1-Wirkung zusammengefasst werden. IL-1 wird vor allem von **Makrophagen**, aber auch von Endothelzellen, neutrophilen Granulozyten, Keratinozyten und Synovialzellen gebildet. Es wird als Reaktion auf exogene (z.B. bakterielles Lipopolysaccharid, Exotoxine) und endogene Stimuli (z.B. Leukotriene, Komplementfaktor C5a, Immunkomplexe, IFN- γ und TNF- α) im Rahmen von Inflammationsprozessen vermehrt synthetisiert und sezerniert. Eine der wichtigsten Funktionen ist die **Aktivierung von T-Lymphozyten** über eine Erhöhung der Produktion von IL-2 und der Expression des IL-2-Rezeptors. Ferner fördert IL-1 die **B-Lymphozyten-Proliferation** und die **Immun-**

globulin-Synthese. Die Produktion von neutrophilen Granulozyten und deren Adhärenz an Endothelzellen werden erhöht.

Interleukin-8 (IL-8): IL-8 wird zur Gruppe der Chemokine (chemotactic cytokines) gezählt, weil diese Moleküle vor allem eine chemotaktische Aktivität aufweisen. Das Zytokin IL-8 wird vor allem von **Monozyten** produziert und wirkt vorwiegend auf neutrophile Granulozyten. Es bewirkt eine **Steigerung der Chemotaxis** und eine **Aktivierung der Granulozyten**. Adhärenz an Endothel, Degranulation und Bildung mikrobizider Sauerstoffmetaboliten werden gesteigert.

Interleukin-12 (IL-12): Das vollständige Molekül des IL-12 kann nur von **Monozyten, Makrophagen, B-Lymphozyten** und dendritischen Zellen hergestellt werden. Es wird hauptsächlich als Antwort auf Infektionen durch Bakterien, Viren und Parasiten gebildet. Eine Funktion besteht in der **Steigerung der Produktion von IFN- γ** in T-Lymphozyten und NK-Zellen, einer Stärkung der T-Lymphozyten- und NK-Zell-Proliferation und ihrer Zytotoxizität. Ferner hat IL-12 eine **Typ1-polarisierende Wirkung**, fördert die zelluläre Immunabwehr und hemmt die IgE-Produktion.

c) Produktion in Lymphozyten und Monozyten

Interleukin-10 (IL-10): Die Bildung von IL-10 erfolgt vor allen Dingen durch **Typ2-polarisierte CD4⁺- und CD8⁺-T-Lymphozyten**, aber auch durch **Monozyten**, zytotoxische T-Lymphozyten, B-Lymphozyten und dendritische Zellen. IL-10 supprimiert sowohl die Typ1- als auch die Typ-2-polarisierte Immunantwort von T-Zellen, es fördert die **Ausbildung einer humoralen Immunreaktion** und **stimuliert zytotoxische T-Lymphozyten**. Proinflammatorische Zytokine wie IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, TNF- α und TNF- β und bestimmte Chemokine werden vermindert gebildet; zelluläre Immunität und allergische Inflammation werden reduziert zugunsten der gesteigerten humoralen und zytotoxischen Immunantwort. IL-10 spricht man eine wichtige Rolle in der Immunantwort gegen bestimmte Bakterien, Pilze und Protozoen zu, sowie bei der Aufrechterhaltung des Gleichgewichtes zwischen Schutz vor pathogenen Erregern und Minimierung des Gewebes Schadens.

Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α): TNF- α wird hauptsächlich von **Monozyten** produziert, daneben von **aktivierten Lymphozyten**, neutrophilen Granulozyten, NK-Zellen, Endothelzellen, dendritischen Zellen und Mastzellen. Die Synthese wird aktiviert durch diverse Stimuli, exogene (Bakterien, Viren, Parasiten) und endogene (Zytokine, Immunkomplexe, Komplementfaktor C5a,

Tumorzellen). Der potenteste Aktivator ist LPS (bakterielles Lipopolysaccharid) über die Toll-like Rezeptoren TLR-2 und TLR-4.

TNF- α fördert die **Funktion von neutrophilen Granulozyten**, indem es die Adhäsion an Endothelzellen erleichtert und Neutrophile direkt aktiviert, deren Bildung im Knochenmark steigert und ihre Funktion (Chemotaxis, Degranulation und Freisetzung von Sauerstoffradikalen) verbessert. Die **lytische Aktivität von zytotoxischen T-Lymphozyten** wird ebenfalls gesteigert, ebenso die Fähigkeit von dendritischen Zellen, T-Lymphozyten zu stimulieren und so eine gerichtete Immunantwort zu ermöglichen.

Interleukin-6 (IL-6): Die wichtigsten Produzenten von IL-6 sind **mononukleäre Phagozyten**; es wird aber in geringerem Ausmaß auch von **T- und B-Lymphozyten**, Fibroblasten, Endothelzellen, Keratinozyten und Hepatozyten gebildet. Die vermehrte Produktion von IL-6 erfolgt als Reaktion auf bakterielle Endotoxine und proinflammatorische Zytokine. Es hat proinflammatorische und einige anti-inflammatorische Wirkungen. Zum einen wirkt IL-6 ähnlich dem IL-1 und steigert Pyrexie und Produktion von Akute-Phase-Proteinen. Zum anderen stimuliert es B-Lymphozyten zur **Differenzierung in Plasmazellen**, die **Sekretion von Immunglobulinen** und die **Aktivierung von T-Lymphozyten**. Im Gegensatz zu IL-1 und TNF, die gegenseitig ihre Synthese (und die von IL-6) steigern, inhibiert IL-6 die Synthese von IL-1 und TNF und wirkt so antiinflammatorisch (Borish et al. 2003, Holländer et al. 2005b).

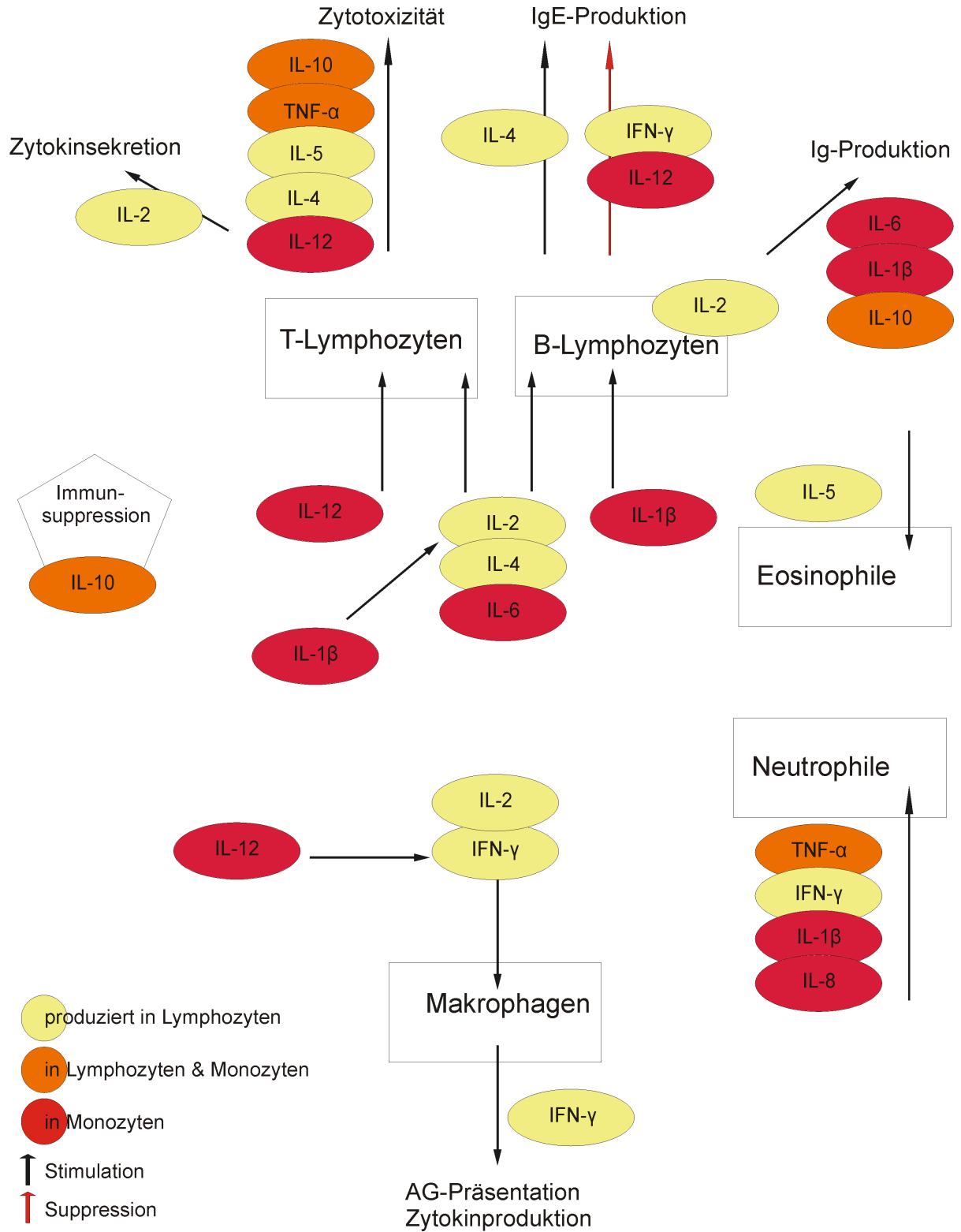


Abb. 2: Schema der Zytokinwirkung auf die gerichtete Immunantwort (modifiziert nach Holländer et al. 2005b)

2.2.1.3. Einteilung der T-Helfer-Lymphozyten-Antwort

Die CD4-positiven T-Helfer-Lymphozyten lassen sich über die Bildung unterschiedlicher Zytokine in zwei Subpopulationen einteilen: **T_H1-Zellen** sind über die Sekretion von IFN- γ , IL-2 und TNF- β an der Ausbildung der zellvermittelten Immunantwort beteiligt; **T_H2-Zellen** setzen die Zytokine IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 und IL-13 frei und fördern so die humorale Immunantwort (Holländer et al. 2005b).

Während T_H2-Zellen über ihre Zytokinproduktion die IgE-Produktion steigern, wirken die von T_H1-Zellen produzierten Zytokine antagonistisch und dementsprechend auf eine Erniedrigung des Serum-IgE hin (Borish et al. 2003). Dieses Schema ist eine Vereinfachung der wirklichen Verhältnisse, so gibt es auch T-Lymphozyten, die Zytokine aus beiden Gruppen freisetzen. Außerdem gibt es CD8⁺-Lymphozyten, die man nach oben genanntem Schema in Typ1 und Typ2 einteilen kann (Holländer et al. 2005b).

2.2.2. Definition und Charakterisierung der Toll-like Rezeptoren (TLR)

2.2.2.1. Definition der TLR

Toll-like Rezeptoren (TLR) gehören zu den Mustererkennungsrezeptoren (pattern-recognition receptors, PRR) und sind eine wichtige Stütze der natürlichen Immunantwort. PRR sind auf Zelloberflächen, im Zellinneren und in Körperflüssigkeiten zu finden und dienen der Erkennung von bestimmten Produkten des mikrobiellen Metabolismus, die dauerhaft in gleicher Weise hergestellt und exprimiert werden. Bei Erkennung werden Phagozytose, Opsonierung, Komplementkaskade, Entzündungsvorgänge oder Apoptose eingeleitet (Medzhitov et al. 1997a, Janeway et al. 2002, Iwasaki et al. 2004).

Der erste „Toll“ Rezeptor wurde bei Drosophila-Fliegen entdeckt, dort zuständig für die Entwicklung der dorsoventralen Polarität während der Embryogenese (Hashimoto et al. 1988). Es zeigte sich aber, dass ein Fehlen dieses Rezeptors auch zu einer hohen Anfälligkeit gegen fungale Infektionen führte. Dies legte den Verdacht nahe, dass der Rezeptor eine wichtige Rolle im Bereich der Immunantwort spielt (Lemaitre et al. 1996, Hoffmann 2003).

Eine ähnliche Struktur konnte auch beim Menschen in Form eines sogenannten Toll-like Rezeptors (TLR) gefunden werden (Medzhitov et al. 1997b). Bis heute ließen sich beim Menschen zehn dieser TLR identifizieren, die unterschiedliche mikrobielle Strukturen erkennen können (Kawai et al. 2006, Holländer et al. 2005a). Zu diesen sogenannten Pathogen-assoziierten Mustern (pathogen associated molecular patterns, PAMP), zählen Lipopolysaccharide (LPS), Peptidoglykane, Lipoproteine und andere Moleküle. Eine Übersicht über die unterschiedlichen TLR gibt Tab. 2.

Die TLR bestehen aus einem zytoplasmatischen Anteil mit etwa 200 konservierten Aminosäuren (Slack et al. 2000) und einem extrazellulären variablen Teil mit vielen sich wiederholenden Leucin-reichen Motiven (Bell et al. 2003).

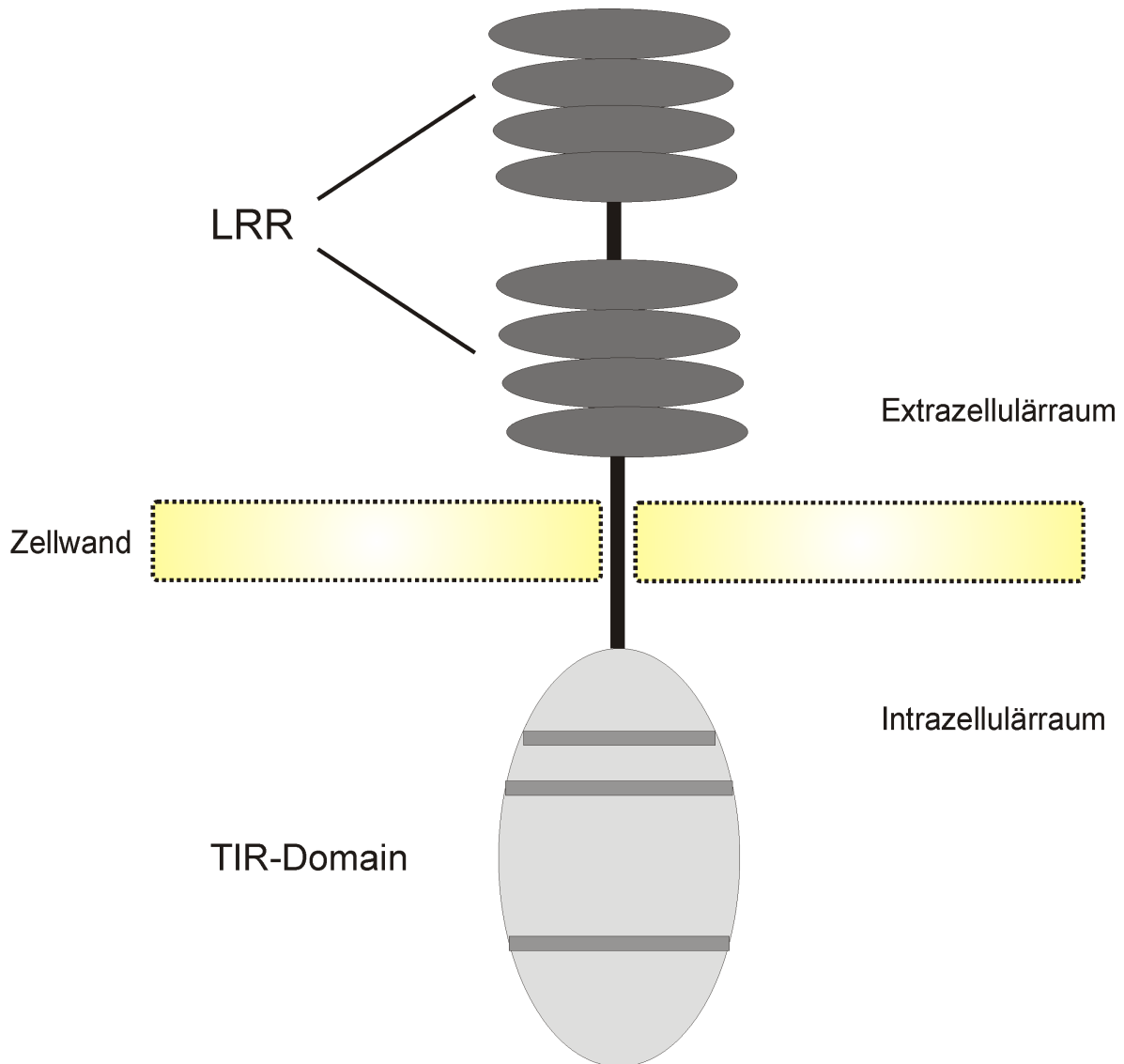


Abb. 3: Bild eines TLR mit der typischen zytoplasmatischen TIR (Toll/IL-1R)-Domain und dem extrazellulären Anteil mit sich wiederholenden Leucin-reichen Motiven (leucine rich repeats, LRR) (modifiziert nach Akira et al. 2004)

Die Bindung von PAMP an einen TLR aktiviert eine intrazelluläre Signalkaskade, die über eine Interaktion der TIR-Domain des TLR mit verschiedenen zytosolischen Adaptern wie MyD88 (myeloid differentiation primary response protein 88), TIRAP (TIR-domain-containing adapter protein), Trif (TIR-domain-containing adapter inducing IFN- β) und TRAM (Trif-related adapter molecule) zur vermehrten Produktion und Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen und Typ 1-Interferonen führt (Kaisho et al. 2006, Kawai et al. 2006, Holländer et al. 2005a) (siehe Abb. 4).

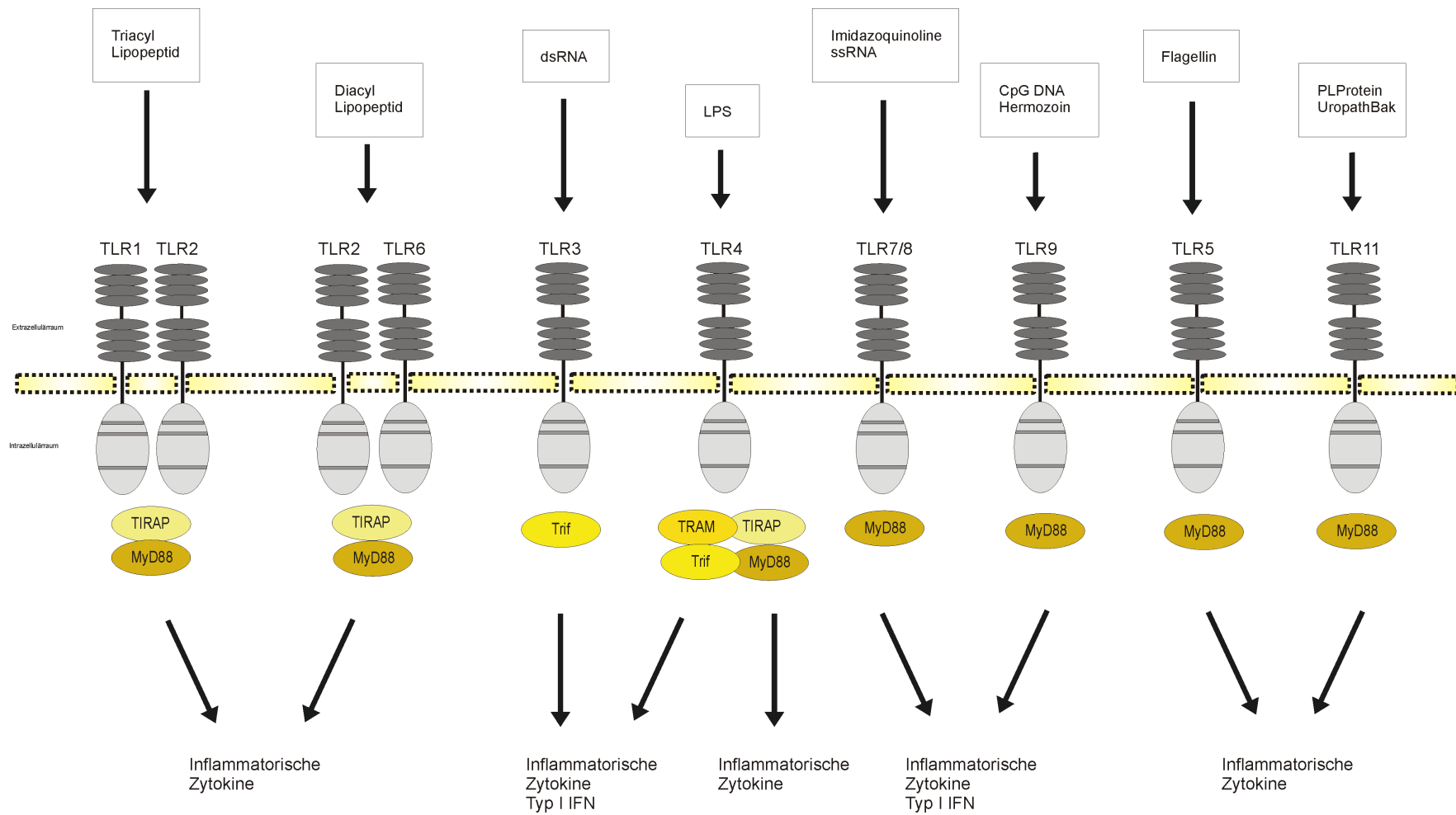


Abb. 4: Übersicht über die verschiedenen TLR und ihre Signaltransduktion (modifiziert nach Kawai et al. 2006)

2.2.2.2. Charakterisierung der untersuchten TLR

Es sind aktuell beim Menschen zehn verschiedene TLR bekannt (Kawai et al. 2006, Holländer et al. 2005a). Im Folgenden sollen die in dieser Studie untersuchten TLR kurz charakterisiert werden:

Name	Verteilung	Funktion	Pathogen
TLR2	Monozyten Granulozyten; hochreguliert auf Makrophagen B-Lymphozyten dendritische Zellen	Erkennung von Peptidoglykanen grampositiver Bakterien, Lipoproteinen von Mykoplasmen und Bakterien, mykobakteriellem Lipoarabinomannan, Thymosan der Hefe und Glykosyl-Phosphatidylinositol von <i>Trypanosoma cruzi</i> über CD14-abhängige und -unabhängige Mechanismen induziert Expression von Typ1-Interferonen	Bakterien (v.a. gram-positiv, Mykobakterien, Neisserien), Pilze, Leptospiren, Trypanosomen
TLR3	dendritische Zellen, Makrophagen; hochreguliert auf Endo- und Epithel	Interaktion mit doppelsträngiger RNA, aktiviert NK κ B aktiviert Sekretion von Typ1- Interferonen	Viren
TLR4	Monozyten, Makrophagen, dendritische Zellen, neutrophile Granulozyten, Mastzellen, B-Lymphozyten; hochreguliert auf Endothel	Interaktion mit mikrobiellen Lipoproteinen, CD14-abhängige Antwort auf LPS, aktiviert NK κ B CD14-abhängige Erkennung des F-Proteins von RS-Viren	gramnegative Bakterien, Chlamydien RS-Viren
TLR 7	in Milz, Lunge, Plazenta; hochreguliert in Makrophagen	Interaktion mit einzelsträngiger RNA	Viren
TLR 8	Leukozyten, Lunge	Interaktion mit einzelsträngiger RNA	Viren
TLR 9	dendritische Zellen, B-Lymphozyten	Erkennung von Oligonukleotiden aus unmethylierten CpG- Dinukleotiden	Bakterien, Protozoen, Viren

Tab. 2: Übersicht über die Eigenschaften der in dieser Studie untersuchten TLR (modifiziert nach Holländer et al. 2005a und Akira et al. 2004)

3. Patienten, Material und Methoden

3.1. Patienten

Aufgrund der sehr niedrigen Inzidenz des HIES gibt es insgesamt nur eine sehr begrenzte Zahl von HIES-Patienten. Ein großer Teil dieser Patienten in Deutschland unterzieht sich regelmäßigen Kontrollen in der Immundefektambulanz im Dr. von Haunerschen Kinderspital, so dass hier etwa 20 Patienten mit klinisch gesicherter Diagnose HIES betreut werden. Sechs dieser Patienten aus unterschiedlichen Altersgruppen (3, 9, 12, 15, 20, 37 Jahre, Altersmedian 13,5 Jahre) und unterschiedlichen Geschlechts (2 weiblich, 4 männlich) konnten für eine Teilnahme an dieser Studie gewonnen werden.

Nach Anamnese und körperlicher Untersuchung wurden die Patienten bzw. ihre Eltern über den Inhalt der Studie aufgeklärt und eine Einverständniserklärung gemäß den Richtlinien der Ethikkommission der Ludwig-Maximilians-Universität (LMU) München vom Patienten selbst oder dessen Sorgeberechtigten eingeholt.

Um die Patienten in die Studie einschließen zu können, mussten folgende Kriterien erfüllt sein:

**Klinisch gesicherte Diagnose Hyper-IgE-Syndrom
(HIES-Score > 40 Punkte)**

Andere Immundefekte ausgeschlossen

**Aktuell keine Behandlung mit Kortikosteroiden oder anderen
Immunomodulatoren**

Keine klinischen und laborchemischen Infektzeichen am Untersuchungstag

3.1.1. Klinik der Patienten und HIES-Score

Die klinische Untersuchung ergab für alle in dieser Arbeit eingeschlossenen Patienten einen HIES-Score von deutlich über 40 Punkten und machte damit die Diagnose HIES bei allen sechs Patienten klinisch sehr wahrscheinlich (siehe Tab. 3).

Patient	HIES-Score [Punkte]
1	53
2	60
3	75
4	62
5	50
6	56
Mittelwert	59

Tab. 3: HIES-Score der 6 Studien-Patienten und Mittelwert

Bei allen sechs Patienten, die in diese Studie eingeschlossen wurden, liegt ein „klassisches“ autosomal-dominantes HIES vor, d.h. es handelt sich um die beschriebene Form, bei der Infektionen der Haut und der Atemwege sowie das Ekzem mit erhöhtem Serum-IgE im Vordergrund stehen. Diese und weitere Symptome sind in den Tab. 4 und 5 zusammengefasst.

Patient	Alter (Jahre)	G. Geschlecht	max. Gesamt IgE (IU/ml)	max. Eosinophilie / μ l	Ekzem	Abszesse	Pneumonie(n) / Pneumatozele(n)	rezidiv. Infektionen	Score-Punkte
1	3	m	2942	968	ja	nein	ja / nein	ja	53
2	9	m	3189	999	ja	ja	ja / ja	ja	60
3	12	w	16480	1122	ja	ja	ja / nein	ja	75
4	15	w	17648	2505	ja	ja	ja / ja	ja	62
5	20	m	42711	2616	ja	ja	ja / nein	ja	50
6	37	m	25379	1148	ja	ja	ja / nein	ja	56
					100% (6/6)	83% (5/6)	100% / 33% (6/6) / (2/6)	100% (6/6)	

Tab. 4: Klinische und laborchemische Daten der Patienten mit Fokus auf immunologische Symptome und HIES Score

Patient	Alter (Jahre)	G. Geschlecht	typisches Gesicht	Milchzahnpersistenz	Spontanfrakturen	Skoliose	Überstreckb. Gelenke	Candidiasis	Score-Punkte
1	3	m	ja	zu jung	ja	nein	nein	ja	53
2	9	m	ja	ja	nein	nein	ja	ja	60
3	12	w	ja	ja	ja	nein	ja	ja	75
4	15	w	ja	ja	nein	nein	nein	ja	62
5	20	m	ja	nein	nein	nein	ja	ja	50
6	37	m	ja	ja	nein	nein	nein	ja	56
			100% (6/6)	80% (4/5)	33% (2/6)	0% (0/6)	50% (3/6)	100% (6/6)	

Tab. 5: Klinische Daten der Patienten mit Fokus auf Symptome des Skelettsystems und HIES Score

3.1.2. Ausschluss anderer Immundefekte

Andere Immundefekte wurden durch Labortests ausgeschlossen. Diese ergaben Normalwerte für Blutbild, Differentialblutbild, Lymphozytensubpopulationen, Lymphozytenstimulation durch Mitogene, die Immunglobuline IgA, IgM und IgG inklusive IgG-Subklassen, spezifische Antikörper und den oxidativen Burst von Granulozyten.

3.1.3. Patienten und Kontrollkollektiv

Alle Patienten zeigten am Untersuchungstag keine klinischen Zeichen einer Infektion und keine Entzündungszeichen im Blut, lediglich Patientin 3 hatte einen leicht erhöhten Wert des C-reaktiven Proteins (CRP) von 0,77 mg/dl (Normalwert: < 0,50 mg/dl). Keiner der Patienten wurde zum Zeitpunkt der Studie mit Immunomodulatoren oder Kortikosteroiden behandelt.

Im Rahmen der Routineblutabnahme wurden zusätzlich etwa 5ml heparinisiertes Blut und etwa 2ml Serum zu Studienzwecken abgenommen und innerhalb der nächsten Stunde verarbeitet.

Als Kontrollen dienten immunologisch gesunde Kinder, die wegen Terminen in der Tageschirurgie des Dr. von Haunerschen Kinderspitals eine Blutentnahme bekamen und bei denen keine sonstigen Erkrankungen vorlagen, und Erwachsene (Mitarbeiter der Klinik) im Alter von 2 bis 35 Jahren.

Diese Blutabnahme erfolgte nach Aufklärung der Kontrollpersonen und mit Genehmigung der Ethikkommission der LMU München.

3.2. Material und Methoden Zytokinmessung

3.2.1. Material und Methoden intrazelluläre FACS-Analyse

3.2.1.1. Material intrazelluläre FACS-Analyse

Vorgefertigte Puffer und Lösungen:

Name der Lösung:	Substanz:	Endkonzentration:	Hersteller, Katalog-Nr.
Lösung A	NaH ₂ PO ₄	22,6 g/l Aqua	Merck, 1.06370.0050
Lösung B	NaOH	25,2 g/l Aqua	
Lösung C (40 % PFA)	Paraformaldehyd	4g/10 ml Aqua	SERVA, 31628

- PFA in Aqua lösen, mehrere Stunden auf 70 °C erhitzen, einige Tropfen 2M NaOH zugeben, bis die Lösung klar wird, Zugabe von 0,54 g Glucose

4 % phosphatgepuffertes PFA (Fixierpuffer)			
---	--	--	--

- 83 ml Lsg. A mit 17 ml Lsg. B mischen, davon 90 ml mit 10 ml Lsg. C mischen, pH mit 1M HCl auf 7,4 – 7,46 einstellen.

PermPuffer 100 fach	Saponin	50 g/500 ml Aqua	SERVA, 34655
	Hepes	119 g/500 ml Aqua	MERCK, 1.10110.0250

- 50 g Saponin und 119 g Hepes in 500 ml Aqua lösen (entspr. 10 %-igem Saponin), sterilfiltrieren und aliquotieren

3.2.1.1.1. Material intrazelluläre FACS-Analyse Lymphozyten

Stammlösungen der Reagenzien zur Stimulation:

Reagenz:	Stammlösung:	Endkonzentration:	Hersteller, Katalog-Nr.
Phorbol12-myristate13-acetate (PMA)	5 mg in 50 ml Ethanol	10 ng/ml	SIGMA, P-8139
Ionomycin	1 mg in 1 ml Ethanol	0,75 µg/ml	SIGMA, I-0634
Monensin	28,6 mg in 4 ml Ethanol	2,5 µmol/l	SIGMA, M-5273

Frisch herzustellende Lösungen

Lösung:		zugeben zu:	Hersteller, Katalog-Nr.
RPMI-1640/10% FCS	55 ml FCS	500 ml RPMI 1640 + 4ml L-Glutamin 200 mosm/l	RPMI: Seromed/Biochrom, F1215 FCS: Biochrom KG S0113 L-G: Biochrom K0280
PMA (100µl/Aliquot)	2 µl Stammlsg.	200 µl RPMI-1640/10% FCS (5000:50)	
Ionomycin (100µl/Aliquot)	2 µl Stammlsg.	20 µl RPMI-1640/10% FCS (5000:500)	
Monensin (100µl/Aliquot)	2 µl Stammlsg.	80 µl RPMI-1640/10% FCS (5000:125)	
Waschpuffer	5 ml FCS	500 ml PBS	500 ml für 24 Wells

PermPuffer	2,5 ml Saponin 1:100	250 ml Waschpuffer	Ca. 12 ml / Röhrchen
CD8 - FITC	2 ml unverdünnt	5 µl / Röhrchen	Coulter-Immunotech, PN IM0451
CD3 - PerCP	2 ml unverdünnt	7,5 µl / Röhrchen	Becton-Dickinson, 345766
Interferon-γ - PE	1:20 mit PermPuffer	10 µl / Röhrchen	Coulter-Immunotech, PN IM2717
IL-2 – PE	1:40 mit PermPuffer	10 µl / Röhrchen	Coulter-Immunotech, PN IM2718
IL-4 – PE	1:4 mit PermPuffer	10 µl / Röhrchen	Coulter-Immunotech, PN IM2719
TNF-α - PE	1:20 mit PermPuffer	10 µl / Röhrchen	Coulter-Immunotech, PN IM3279
IL-10 – PE	1:20 mit PermPuffer	10 µl / Röhrchen	BD Pharmingen, 20705A

3.2.1.1.2. Material intrazelluläre FACS-Analyse Monozyten

Stammlösungen der Reagenzien zur Stimulation:

Reagenz:	Stammlösung:	Endkonzentration:	Hersteller, Katalog-Nr.
Brefeldin A (BFA)	5 mg in 1ml DMSO (-20°C)	5000 µg/ml (10µg/2µl)	SIGMA, B 7651
LPS	0,5 mg in 1ml DMSO (-20°C)	500 µg/ml (1µg/2µl)	SIGMA, L2654

Frisch herzustellende Lösungen

Lösung:		zugeben zu:	Hersteller, Katalog-Nr.
Waschpuffer	5 ml FCS	500 ml PBS	
PermPuffer	2,5 ml Saponin 1:100	250 ml Waschpuffer	Ca. 12 ml / Röhrchen
CD14 FITC	unverdünnt	10µl je Röhrchen	BD Pharmingen, 345784
CD45 PERCP	unverdünnt	10µl je Röhrchen	BD Pharmingen, 345809
TNF-α PE	mit PermPuffer 1:20	20µl je Röhrchen	Coulter-Immunotech, PN IM3279
IL-1β PE	mit PermPuffer 1:15	20µl je Röhrchen	RD IC201P
IL-6 PE	mit PermPuffer 1:20	20µl je Röhrchen	RD IC206P
IL-8 PE	mit PermPuffer 1:20	20µl je Röhrchen	RD IC208P
IL-10 PE	mit PermPuffer 1:20	20µl je Röhrchen	BD Pharmingen, 20705A
IL-12 PE	unverdünnt	10 µl je Röhrchen	BD Pharmingen, 559329

3.2.1.2. Methoden intrazelluläre FACS-Analyse

3.2.1.2.1. Allgemeines zur Analyse von Lymphozyten und Monozyten

Probenaufbereitung

Heparinisiertes venöses Vollblut (1:1000) wurde unter sterilen Bedingungen gewonnen und innerhalb von 4-6 Stunden verarbeitet. Es wurde zu jedem Abnahmezeitpunkt ebenfalls Serum für die spätere Bestimmung von Zytokin-Konzentrationen im Überstand mittels Cytometric Bead Array (CBA) akquiriert.

Oberflächenfärbung

Bei jeder Probe wurden die relativen Proportionen von T- und B-Lymphozyten und Monozyten durch Immunphänotypisierung bestimmt, wobei die Methode mit Vollblut-Lyse in leicht modifizierter Form verwendet wurde (Motley et al. 1996).

Mit monoklonalen Antikörpern gefärbte Zellen wurden mit dem FACScan-Durchflußzytometer der Firma Becton Dickinson analysiert und die Ergebnisse als Prozentsätze von positiven Zellen in der Zellsuspension dargestellt.

Anwendung fand das durchflußzytometrische intrazelluläre Protokoll, welches von Jung et al. erstmals beschrieben wurde (1993) und von Prussin et al. geringfügig modifiziert wurde (Prussin et al. 1995; Prussin 1997).

3.2.1.2.2. Lymphozyten

Zellstimulation

Für die In-vitro-Zellstimulation wurden von jeder Person 4 x 100µl Blut zu 900 µl RPMI 1640 Kulturmedium (Seromed/Biochrom, Berlin, Deutschland) hinzugegeben, versetzt mit 10% hitzeinaktiviertem fetalem Kälberserum (FCS) (Biochrom, Berlin, Deutschland).

Die Zytokinproduktion wurde untersucht mittels Analyse von unstimulierten Zellen im Vergleich zu Zellen, die mit Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) und Ionomycin (beide Sigma-Aldrich, St.Louis, USA) stimuliert wurden. Zu diesen beiden Stimulanzen wurde Monensin (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) hinzugefügt, um den Export von neu synthetisiertem Zytokin vom Golgi-Apparat zu blockieren und damit die Menge von intrazellulärem Zytokin pro Zelle zu steigern (Jung et al. 1993).

Danach wurden die Zellen für 5 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

Fixierung

Die inkubierten Zellen wurden nach Resuspendierung in Falcon Tubes zweimal mit Waschpuffer (PBS / 5% FCS) gewaschen und jeweils 5 Minuten bei 4°C mit 1250 U/min abzentrifugiert. Nach Abkippen des Überstandes wurden die roten

Zellen mit 500µl kaltem Fixierpuffer (Leipziger Puffer 4% PFA) (Merck, Darmstadt, Deutschland und Serva, Heidelberg, Deutschland) 10 Minuten bei 4°C fixiert.

Im Folgenden wurden die Zellen je dreimal mit 3ml Waschpuffer gewaschen und je dreimal 5 Minuten bei 4°C mit 1250 U/min zentrifugiert, danach der Überstand verworfen.

Über Nacht erfolgte die Aufbewahrung der Zellen im Kühlschrank bei 4°C.

Markierung der Zellen für die Durchflußzytometrie

Am nächsten Tag wurden die Zellen einmal mit Waschpuffer gewaschen, abzentrifugiert (1250 U/min, 5 min, 4°C) und der Überstand verworfen. Durch Vortexen mit 1ml Permeabilisationspuffer (PBS / 5% FCS / 5% Saponin) (Merck, Serva) wurden die Zellen resuspendiert und anschließend für 10 min bei 4°C inkubiert. Nach Zusatz von 2ml Permeabilisationspuffer folgte das Zentrifugieren der Zellen (1250 U/min, 5 min, 4°C) und das Abgießen des Überstandes.

Im nächsten Schritt wurde die gleichzeitige Inkubation von 50µl-Aliquots von unstimulierten und stimulierten Kulturen mit den Oberflächen-Antikörpern CD3 PerCP (BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland), CD8 FITC (Coulter Immunotech, Krefeld, Deutschland) und den PE-gelabelten anti-Zytokin-Antikörpern IFN- γ , IL-2, IL-4, TNF- α (Coulter-Immunotech) und IL-10 (BD Pharmingen) durchgeführt. Alle Proben wurden im Dunklen bei 4°C für 25 min inkubiert.

Schließlich wurden die gefärbten Zellen je dreimal mit Permeabilisationspuffer gewaschen, abzentrifugiert (1250 U/min, 5 min, 4°C) und jeweils der Überstand verworfen.

Zum Abschluss wurden die Zellen mit 200 µl PBS resuspendiert und bis zur Messung innerhalb der nächsten zwei Stunden bei 4°C asserviert.

Durchflußzytometrische Messung und Analyse

Die Fluoreszenzintensität wurde mittels des FACScan-Durchflußzytometers (BD Pharmingen) mit gleicher Einstellung bei jeder Probe gemessen.

10000 Ereignisse (gezählte Zellen) wurden gemessen und mit Hilfe der CELL Quest Software (BD Pharmingen) ausgewertet.

Die Kompensationseinstellungen wurden mittels monoklonaler Einzel-Farb-Antikörper, z.B. CD3 oder CD8, in separaten Tubes, für jedes der Fluorochrome FITC, PE und PErCP bestimmt.

Bei der Analyse wurden Dot-Plots mit Forward Scatter (Größe der Zellen) gegen Side Scatter (Granularität der Zellen) verwendet und eine Lymphozyten-Region R1 gesetzt.

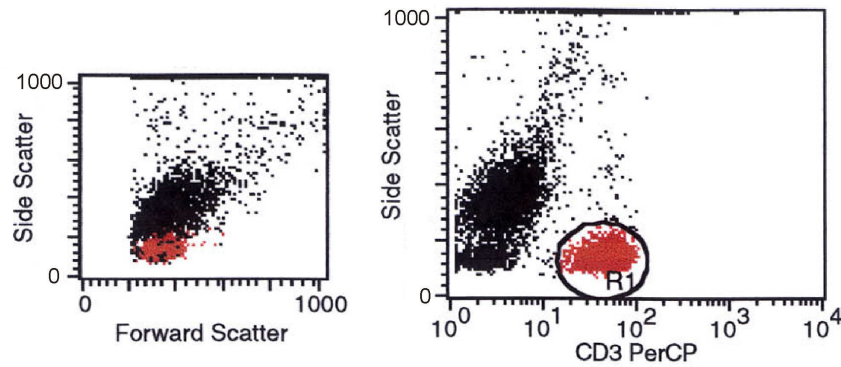


Abb. 5: Darstellung der Lymphozyten (rot) im Forward Scatter (x-Achse) / Side Scatter (y-Achse) (links) und Erstellung einer Lymphozyten Region R1 in der Darstellung CD3-Positivität (x-Achse) gegen Side Scatter (y-Achse) (rechts)

Die Dot-Plot Quadratstatistik wurde in Bezug auf CD8-positive (FL-1, FITC) oder CD8-negative, d.h. CD4-positive T-Zellen, gegen die Zytokin-Fluoreszenz (FL-2, PE) analysiert.

Zytokin-positive CD4⁺- oder CD8⁺-T-Zellen wurden über Setzen einer unteren Grenze für Fluoreszenzpositivität anhand der unstimulierten Zellen ermittelt. Die Daten wurden als Prozentanteile von CD4⁺- oder CD8⁺-T-Zellen mit Zytokinexpression innerhalb des Lymphozyten-Gates ausgedrückt.

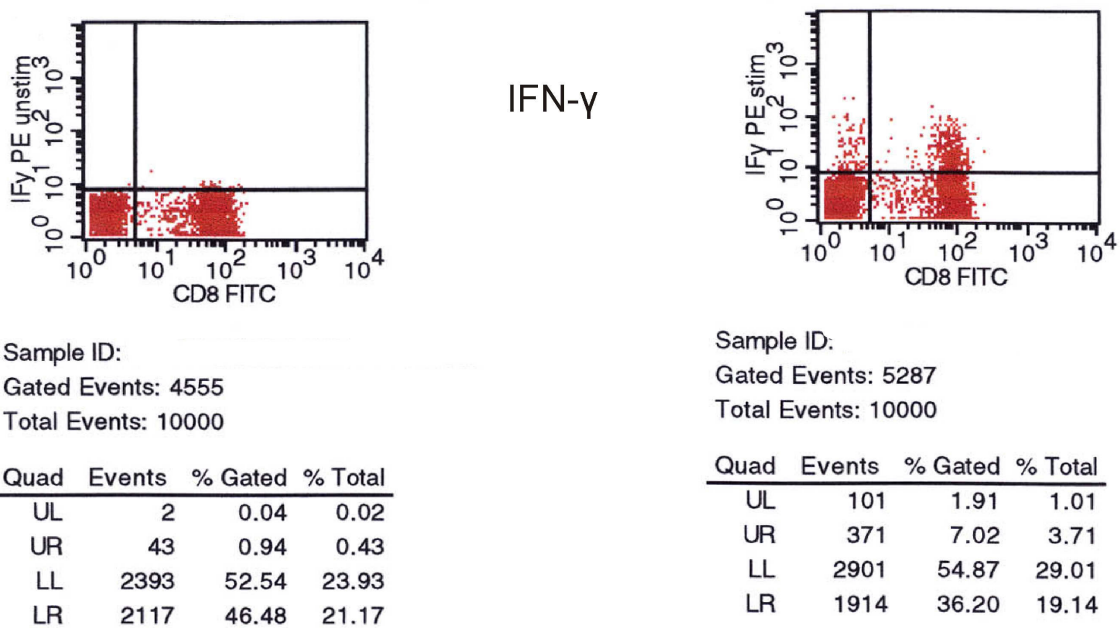


Abb. 6: Darstellung der Lymphozyten (rot) anhand CD8-Positivität (x-Achse) gegen Zytokin-Positivität hier für IFN- γ (y-Achse) vor Stimulation (links) und nach Stimulation (rechts) und daraus ermittelte Dot-Plot Quadratstatistiken (unten)

Für die Quantifizierung der Zytokin-Menge in der einzelnen positiven Zelle wurde die durchschnittliche Fluoreszenzintensität der positiven Ereignisse herangezogen.

3.2.1.2.3. Monozyten

Zellstimulation

Für jeden Probanden wurde jeweils 1ml Vollblut in zwei Polypropylen-Röhrchen zu 2µl Brefeldin A (BFA) (=10µg) (SIGMA) der Stammlösung (unstimuliert) bzw. 2µl BFA der Stammlösung und 2µl LPS (=1µg) (SIGMA) (stimuliert) hinzugefügt.

Alle Röhrchen wurden mit 10µg/ml BFA inkubiert, um eine intrazelluläre Anreicherung von neu synthetisierten Zytokinen innerhalb des Golgi-Apparates zu erreichen (Kwak et al. 2000).

Das unstimulierte Röhrchen diente als Baseline-Wert für die Bestimmung der intrazellulären Zytokin-Produktion und erhielt keinen Zusatz von LPS. Der Vergleich erfolgte mit dem zweiten Röhrchen, welches mit LPS (1µg/ml) stimuliert wurde.

Die Röhrchen wurden dann bei 37°C und 5% CO₂ auf einem Schüttler für 4 Stunden inkubiert.

Markierung der Zellen mit Oberflächenmarkern

Nach der Inkubation wurden Polystyren-Röhrchen mit 100µl von unstimuliertem bzw. in vitro LPS-stimuliertem Vollblut mit 10µl anti-CD14-FITC Oberflächenmarker (10µl/100µl Blut) (BD Pharmingen) versetzt. Zu einem unstimulierten Röhrchen wurden neben CD 14-FITC auch 10µl CD 45 PERCP (BD Pharmingen) hinzugefügt.

Dann wurden die Röhrchen für 30 Minuten bei Zimmertemperatur lichtgeschützt inkubiert.

Fixierung

Im Anschluss wurden die Zellen sofort zweimal mit 3 ml Waschpuffer gewaschen, abzentrifugiert (1250U/min, 4°C, 5min) und der Überstand verworfen, um die überschüssigen, nicht gebundenen Antikörper zu eliminieren. Danach wurden die Zellen mit 500µl kaltem Fixierpuffer (Leipziger Puffer 4% PFA) (Merck, Serva) behandelt und nach dem Vortexen für 10 Minuten bei 4°C fixiert. Die fixierten Zellen wurden dreimal mit Waschpuffer gewaschen und abzentrifugiert (1250 U/min, 5 min, 4°C). Nach Verwerfen des Überstandes wurden die Zellen über Nacht bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt.

Markierung der Zellen mit Zytokin-Antikörpern

Am nächsten Tag wurden die fixierten Zellen erneut einmal mit 3ml Waschpuffer gewaschen, abzentrifugiert (1250 U/min, 5 min, 4°C) und der Überstand wurde verworfen. Danach wurden die Röhren mit 1ml Permeabilisierungspuffer (PBS / 5% FCS / 5% Saponin) (Merck, Serva) aufgefüllt und die Zellen für 10 min bei 4°C lichtgeschützt inkubiert. Nach Zusatz von 2 ml Permeabilisierungspuffer wurden die Zellen zentrifugiert (1250 U/min, 5 min, 4°C) und der Überstand wurde abgegossen.

Den Röhren wurden anschließend 20µl der vorverdünnten Anti-Zytokin-PE-Antikörper gegen TNF- α (Coulter-Immunotech), IL-1 β , IL-6, IL-8 (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), IL-10 (BD Pharmingen) und 10µl der Anti-Zytokin-PE-Antikörper gegen IL-12 (BD Pharmingen) zugesetzt. Nach dem Vortexen wurden die Zellen für 30 Minuten bei 4°C im Kühlschrank inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen dreimal mit 3ml Permeabilisierungspuffer gewaschen, abzentrifugiert (1250 U/min, 5 min, 4°C) und der Überstand wurde jeweils verworfen.

Zuletzt wurden die Zellen mit 200 µl PBS resuspendiert und bis zur Messung innerhalb der nächsten zwei Stunden bei 4°C asserviert.

Durchflußzytometrische Messung und Analyse

Die fertigen Zell-Lösungen wurden mit dem FACScan Durchflußzytometer (BD Pharmingen) analysiert. Es wurde das Programm CELL Quest (BD Pharmingen) verwendet.

Die Identifizierung der Monozyten erfolgte über ein Gate auf CD14⁺ Zellen im FITC-Kanal und dem Side Scatter. Kontrolliert wurde dieses über eine Darstellung CD14-FITC gegen CD45-PERCP.

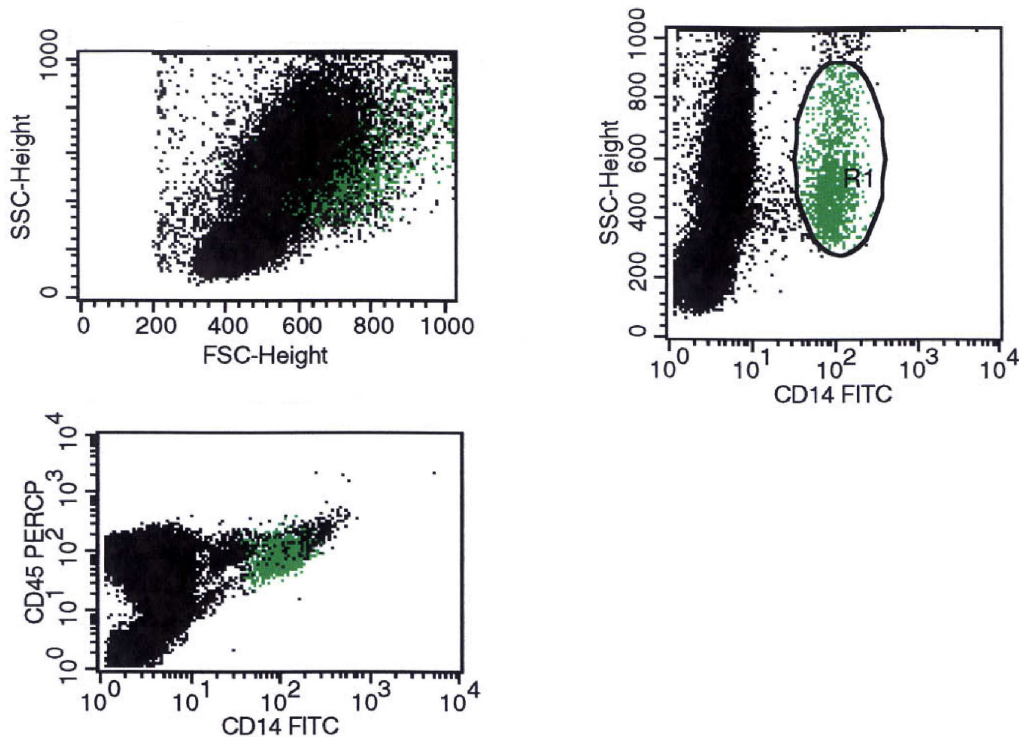


Abb. 7: Darstellung der Monozyten (grün) in Forward Scatter (x-Achse) gegen Side Scatter (y-Achse) (oben links), in CD14-Positivität (x-Achse) gegen CD45-Positivität (y-Achse) (unten links) und Erstellung einer Monozyten Region R1 in der Darstellung CD14-Positivität (x-Achse) gegen Side Scatter (y-Achse) (oben rechts)

Dargestellt wurden Zytokin-positive Zellen in einem Dot Plot CD14-FITC gegen Zytokinfluoreszenz-PE.

Wenn möglich, wurden für die Bestimmung der intrazellulären Zytokinproduktion 2500 CD14⁺-Monozyten-Gate-Ereignisse gemessen. Die Quadrant-Marker wurden dann im Dot-Plot so gesetzt, dass eine Trennung zwischen positiven und negativen Populationen definiert werden konnte. Zytokin-positive CD14⁺ Zellen wurden über das Setzen einer unteren Grenze für Fluoreszenzpositivität anhand der unstimulierten Zellen ermittelt.

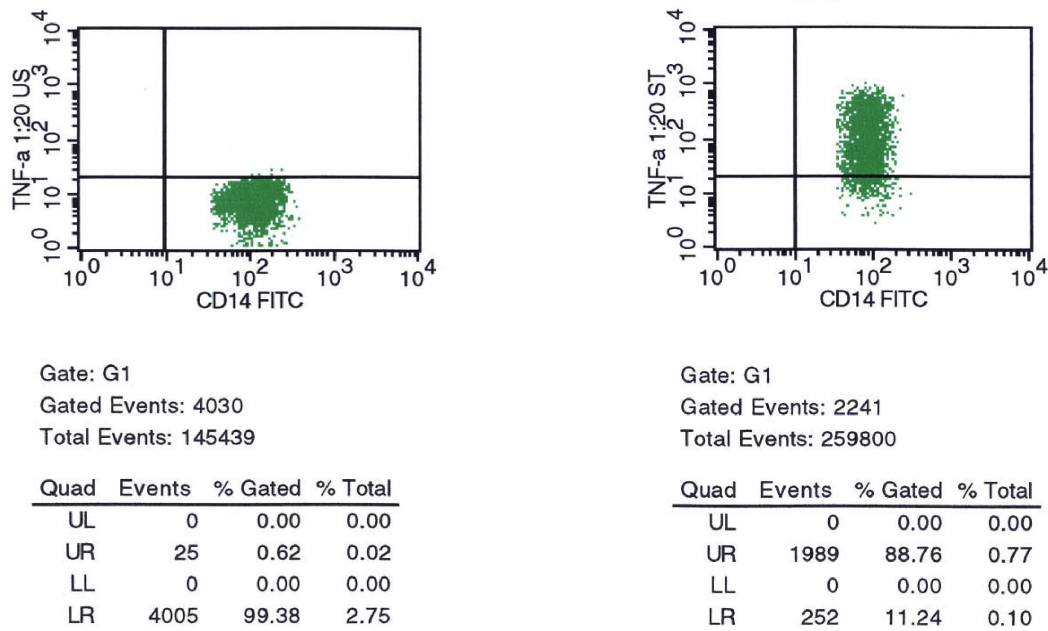


Abb. 8 : Darstellung der Monozyten (grün) anhand CD14-Positivität (x-Achse) gegen Zytokin-Positivität hier für TNF- α (y-Achse) vor Stimulation (links) und nach Stimulation (rechts) und daraus ermittelte Dot-Plot Quadratstatistiken (unten)

Die Ergebnisse wurden dann als prozentuale Anteile von Zytokin-positiven Monozyten in unstimulierten und LPS-stimulierten Kulturen ausgedrückt. Für die Quantifizierung der Zytokin-Menge in der einzelnen positiven Zelle wurde die durchschnittliche Fluoreszenzintensität der positiven Ereignisse herangezogen.

3.2.2. Cytometric Bead Array (CBA)

3.2.2.1. Allgemeine Informationen zum CBA

Neben der intrazellulären Zytokinbestimmung sollte eine Bestimmung einzelner Zytokine im Serum erfolgen. Hierzu wurde das bei jedem Patienten abgenommene Serum (siehe 3.1.3) verwendet und hiermit ein CBA (cytometric bead array) mit anschließender Durchflußzytometrie zur Bestimmung der Zytokinwerte im Serum durchgeführt. Diese Technik beruht auf einer Markierung der Proben mit „Perlen“ (beads), die zum einen mit einem fluoreszierenden Farbstoff (in diesem Fall PE) und zum anderen mit jeweils einem spezifischen Antikörper für die zu bestimmenden Zytokine markiert sind (Chen et al. 1999).

3.2.2.2. Material und Methoden CBA

Die Serumwerte der Zytokine IFN- γ , TNF- α , IL-2, IL-4, IL-5 und IL-10 bei HIES-Patienten und Kontrollen wurden mit dem TH1/TH2-Cytometric Bead Array-Kit (BD Pharmingen) gemäß den Instruktionen des Herstellers gemessen.

Erstellung der Zytokin Standardlösungen

Für die zu messenden Zytokine wurden Standard-Testreihen mit einzelnen Zytokin-Konzentrationen von 20 pg/ml bis 5000 pg/ml erstellt. Zu diesem Zweck wurden die Standardlösungen mit Lösungsmittel versehen und im Folgenden Verdünnungen des Standards auf 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128 und 1:256 der Ausgangskonzentration erstellt. Als Kontrolle lief eine Negativ-Probe mit einer Zytokin-Konzentration von 0 pg/ml bei jedem Test mit. Um aus diesen „capture beads“ die für die spätere Messung notwendigen „mixed capture beads“ zu erstellen, wurden die erstellten Lösungen vorsichtig gevortext und dann jeweils 10 μ l der erstellten capture beads in insgesamt 34 Tubes gefüllt (24 zu analysierende Proben + 9 Standards + 1 Negativkontrolle). Die Tubes wurden anschließend zentrifugiert, der Überstand anschließend aspiriert und verworfen. Danach wurden die Probengefäße entsprechend der verworfenen Menge mit Serum Enhancement Puffer aufgefüllt, gevortext und anschließend 30 Minuten bei Raumtemperatur und lichtgeschützt inkubiert.

Vorbereitung der Testlösung für die Flowzytometrie

50 μ l der „mixed capture beads“ wurden nun nach Vortexen in die für die Testung geeigneten Probengefäße gefüllt. Hinzu kamen 50 μ l der testeigenen PE-Reagenz und 50 μ l der Zytokin Standardlösungen bzw. bei den Patientenproben 50 μ l Testmaterial.

Die Probengefäße wurden danach für 3 Stunden bei Lichtschutz inkubiert. Danach wurde 1 ml testeeigener Waschpuffer zu jedem Testgefäß hinzugefügt und die Proben wurden für 5 Minuten zentrifugiert. Nach vorsichtiger Aspiration des Überstandes und Verwerfen desselben wurden 300 µl testeeigener Waschpuffer hinzugefügt und der Niederschlag resuspendiert.

Durchflußzytometrische Messung und Analyse

Die fertigen Zell-Lösungen wurden mit dem FACScan Durchflußzytometer (BD Pharmingen) analysiert. Es wurde das Programm CELL Quest (BD Pharmingen) verwendet.

Die Identifizierung der Beads erfolgte über eine Darstellung von Side Scatter gegen Forward Scatter.

Die PE-Fluoreszenzintensität der einzelnen Proben wurden dann im FL3-Kanal des Durchflußzytometers gemessen. Aus den Standardreihen der Zytokine und der Fluoreszenzintensität der Proben ließ sich die Plasmakonzentration der Proben bestimmen.

3.3. Material und Methoden Toll-like Rezeptoren (TLR)

Vorbereitung

Isolierte periphere mononukleäre Blutzellen (peripheral blood mononuclear cells, PBMCs) wurden in 96 Well-Plates mit je 3×10^5 Zellen pro 200 μl pro Well gegeben und mit RPMI / 10% FCS aufgefüllt.

Stimulation

Die Zellen wurden stimuliert mit Lipopolysaccharid (LPS) von *Escherichia coli* (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) (Sigma), Zymosan aus Hefezellwandextrakten (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$), Peptidoglykan von *Staphylococcus aureus* (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$), R848 (10 μM), Heat Killed *Listeria monocytogenes* (HKLM) (10^8 HKLM/ml) (alle von InvivoGen, CA, USA), Cytosin-phosphatidyl-Guanosin (CpG) ODN (3 $\mu\text{g}/\text{ml}$) (kleine Buchstaben: Phosphorothioat Verknüpfung; Großbuchstaben: Phosphodiester Verknüpfung 3' der Base; CpG-B ODN 2006: 5' tcgtcgttttgtcgtttgtcgtt 3'; CpG-A ODN 2216: 5' ggGGGACGATCGTCgggggG 3') (beide zur Verfügung gestellt von Coley Pharmaceuticals Wellesley, MA, USA), poly IC (25 $\mu\text{g}/\text{ml}$) (Amersham Biosciences, NJ, USA) und IL-1 β (50ng/ml) (R&D Systems).

Messung der Zytokinsekretion

Nach 36 Stunden wurde die Sekretion von IL-6, TNF- α , IL-12p40, IL-10 und IFN- α in seriellen Verdünnungen des Kulturüberstandes gemessen, wobei IL-12p40, IL-6, IL-10, TNF- α (alle von BD Pharmingen) und IFN- α (Bender MedSystems, Graz, Österreich) ELISA Kits gemäß den Instruktionen des Herstellers verwendet wurden (Renner et al. 2005).

3.4. Statistische Auswertung

Die experimentell erhobenen Ergebnisse wurde mit dem Statistikprogramm SPSS 14 bearbeitet. Zur Ermittlung möglicher Signifikanzen wurde der Mann-Whitney-Test für unabhängige Stichproben angewendet.

Als signifikant wurden p-Werte $< 0,05$ angesehen, als hoch signifikant p-Werte $< 0,01$.

4. Ergebnisse

4.1. Zytokinprofil in Lymphozyten und Monozyten

4.1.1. Intrazelluläre FACS Analyse

4.1.1.1. Lymphozyten

Um die Zytokinproduktion in CD4- und CD8-positiven Lymphozyten von HIES-Patienten zu untersuchen, wurden diese in vitro mit PMA, Ionomycin und Monensin stimuliert und dann die intrazelluläre Produktion mit der von gesunden Kontrollen verglichen.

Dabei zeigten sich Unterschiede für folgende Zytokine:

In CD4⁺-Lymphozyten der Patienten war die Produktion von **IFN- γ** signifikant und die Produktion von **IL-2**, **IL-4** und **TNF- α** hoch signifikant erniedrigt.

In CD8⁺-Lymphozyten ergaben sich für **IFN- γ** und **TNF- α** hoch signifikante Erniedrigungen für HIES-Patienten gegenüber den Kontrollen.

Eine signifikante Erhöhung ergab sich für **IL-10** in CD8⁺-Lymphozyten.

Nicht signifikant reduziert zeigten sich **IL-10** in CD4⁺-Lymphozyten und **IL-2** in CD8⁺-Lymphozyten, nicht signifikant erhöht **IL-4** in CD8⁺-Lymphozyten.

Zytokin positive
Zellen in %

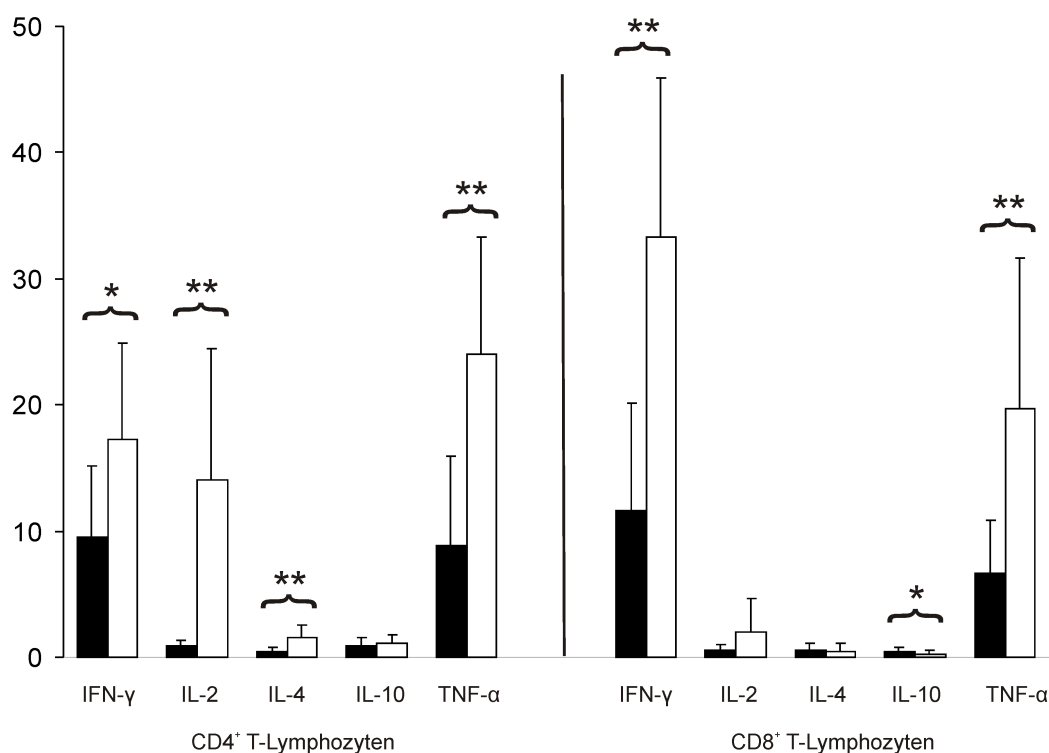


Abb. 9: Vergleich der prozentual stimulierten Zellen mit positivem Zytokin-Nachweis in CD4⁺- und CD8⁺-T-Lymphozyten. Nachweis der Zytokine IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-10 und TNF- α für Patienten (schwarz) und Kontrollen (weiß). Gezeigt werden die Mittelwerte und die Standardabweichung. *p<0,05 **p<0,01 mit Mann-Whitney-Test für unabhängige Stichproben.

	CD4 ⁺ -Lymphozyten					CD8 ⁺ -Lymphozyten				
	IFN- γ	IL-2	IL-4	IL-10	TNF- α	IFN- γ	IL-2	IL-4	IL-10	TNF- α
HIES-Patienten [% zytokin-pos. Zellen] \pm SD	9,6 (\pm 5,6)	0,9 (\pm 0,5)	0,4 (\pm 0,4)	0,9 (\pm 0,6)	8,8 (\pm 7,1)	11,6 (\pm 8,6)	0,6 (\pm 0,5)	0,6 (\pm 0,5)	0,5 (\pm 0,3)	6,7 (\pm 4,1)
Kontrollen [% zytokin-pos. Zellen] \pm SD	17,2 (\pm 7,7)	14,1 (\pm 10,3)	1,6 (\pm 1,0)	1,1 (\pm 0,7)	24,0 (\pm 9,3)	33,3 (\pm 12,6)	2,0 (\pm 2,6)	0,4 (\pm 0,7)	0,2 (\pm 0,4)	19,7 (\pm 12,0)
p-Wert	0,01	< 0,01	< 0,01	0,54	< 0,01	< 0,01	0,11	0,08	0,01	< 0,01

Tab. 6: Vergleich der prozentual stimulierten Zellen mit positivem Zytokin-Nachweis in CD4⁺- und CD8⁺-T-Lymphozyten für HIES-Patienten und Kontrollen. Gezeigt werden Mittelwerte \pm Standardabweichung und p-Werte mit Mann-Whitney-Test für unabhängige Stichproben.

4.1.1.2. Monozyten

Die Monozyten wurden in vitro mit LPS stimuliert und bei der Auswertung die zytokin-positiven Zellen für HIES-Patienten mit denen der Kontrollen verglichen.

Bei den Patienten war **IL-1 β** intrazellulär signifikant erniedrigt messbar gegenüber gesunden Kontrollen.

Die Zytokine **TNF- α** , **IL-8**, **IL-10** und **IL-12** zeigten sich erniedrigt gegenüber Kontrollen, **IL-6** wurde dagegen bei den Patienten erhöht gemessen. Diese Ergebnisse erreichten alle keine statistische Signifikanz.

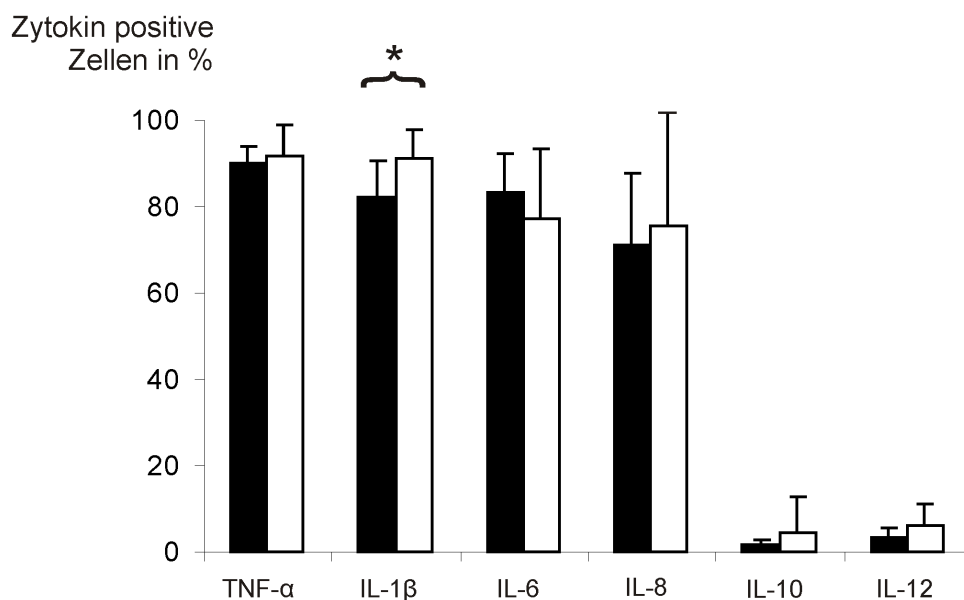


Abb. 10: Vergleich der prozentual stimulierten Zellen mit positivem Zytokin-Nachweis in Monozyten. Nachweis der Zytokine TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10 und IL-12 für Patienten (schwarz) und Kontrollen (weiß). Gezeigt werden die Mittelwerte + Standardabweichung. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ mit Mann-Whitney-Test für unabhängige Stichproben.

	TNF-α	IL-1β	IL-6	IL-8	IL-10	IL-12
HIES-Patienten [% zytokin-pos. Zellen] \pm SD	90,2 (\pm 3,6)	82,4 (\pm 7,9)	83,1 (\pm 9,0)	71,2 (\pm 16,5)	1,7 (\pm 1,1)	3,2 (\pm 2,7)
Kontrollen [% zytokin-pos. Zellen] \pm SD	91,9 (\pm 7,3)	91,2 (\pm 6,7)	77,3 (\pm 16,2)	75,7 (\pm 27,1)	4,6 (\pm 8,0)	6,1 (\pm 4,7)
p-Wert	0,13	0,01	0,59	0,18	0,91	0,22

Tab. 7: Vergleich der prozentual stimulierten Zellen mit positivem Zytokin-Nachweis in Monozyten für HIES-Patienten und Kontrollen. Gezeigt werden Mittelwerte \pm Standardabweichung und p-Werte berechnet mit Mann-Whitney-Test für unabhängige Stichproben.

4.1.2. CBA

Um das Zytokinprofil zu vervollständigen, wurden die Spiegel von sechs Zytokinen im Serum der sechs HIES-Patienten im Vergleich zu denen von Kontrollpersonen im Alter von 3-18 Jahren gemessen.

Dabei zeigte sich der Spiegel von **IL-5** bei Patienten gegenüber den Kontrollen hoch signifikant erhöht.

Erhöht gemessen wurden auch die Serum-Spiegel von **IFN- γ** , **IL-10** und **IL-2**. Für **TNF- α** und **IL-4** lagen die Werte der Patienten niedriger als bei den Kontrollpersonen. Diese Unterschiede erreichten alle keine statistische Signifikanz.

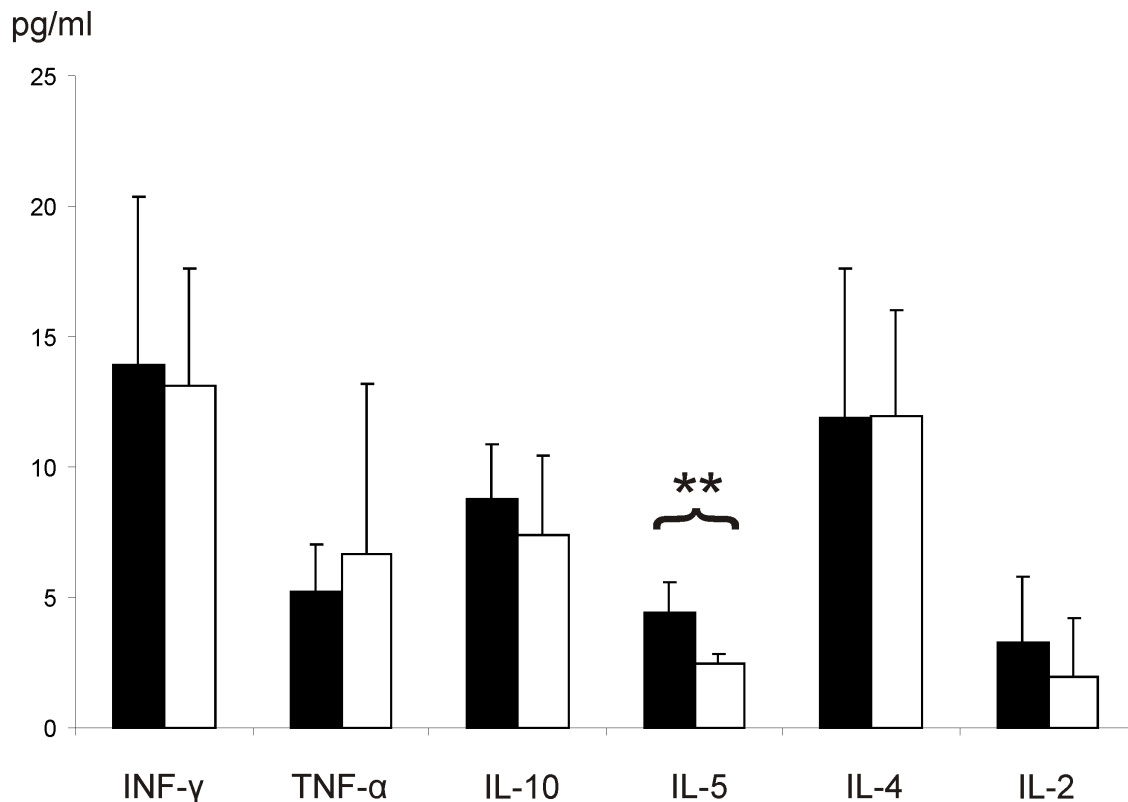


Abb. 11: Serumspiegel der Zytokine INF- γ , TNF- α , IL-10, IL-5, IL-4 und IL-2 für Patienten (schwarz) und Kontrollen (weiß) in pg/ml. Gezeigt werden die Mittelwerte + Standardabweichung. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ mit Mann-Whitney-Test für unabhängige Stichproben.

	IFN-γ	TNF-α	IL-10	IL-5	IL-4	IL-2
HIES-Patienten [pg/ml] \pm SD	13,9 (\pm 6,5)	5,2 (\pm 1,8)	8,8 (\pm 2,1)	4,4 (\pm 1,2)	11,9 (\pm 5,7)	3,3 (\pm 2,6)
Kontrollen [pg/ml] \pm SD	13,1 (\pm 7,3)	6,7 (\pm 6,7)	7,4 (\pm 16,2)	2,5 (\pm 27,1)	11,9 (\pm 8,0)	2,0 (\pm 4,7)
p-Wert	0,95	0,91	0,10	< 0,01	0,60	0,19

Tab. 8: Vergleich der Serumspiegel der Zytokine IFN- γ , TNF- α , IL-10, IL-5, IL-4 und IL-2 in pg/ml für HIES-Patienten und Kontrollen \pm Standardabweichung und p-Werte berechnet mit Mann-Whitney-Test für unabhängige Stichproben.

4.2. TLR Signalwege

Um einen möglichen Defekt im Bereich der TLR zu identifizieren, wurde im Rahmen dieser Arbeit die Reaktion der peripheren mononukleären Zellen auf verschiedene TLR Liganden bestimmt. Dazu erfolgte eine Stimulation der Zellen mit LPS (erkannt von TLR-4), Peptidoglykan von *Staphylococcus aureus*, Zymosan (Extrakt aus Zellwänden von Hefepilzen), hitzeinaktivierten (heat-killed) Listerien (alle erkannt von TLR-2 in Zusammenarbeit mit TLR-6 und TLR-1), poly IC (erkannt von TLR-3), R848 (erkannt von TLR-7 und TLR-8), CpG-A (aktiviert IFN- γ in plasmazytoiden dendritischen Zellen über TLR-9), CpG-B (aktiviert B-Lymphozyten über TLR-9) und IL-1 β . Anschließend wurde die Produktion verschiedener Zytokine (IL-6, IL-10, IL-12, TNF- α , IFN- α), die am Ende der entsprechenden TLR Signalkaskaden gebildet werden, gemessen.

Bei der Messung der Zytokinspiegel zeigten sich mehrere nach Stimulation mit TLR Liganden signifikant erhöht:

IL-12p40 auf Stimulation mit Zymosan und Peptidoglykan, **IL-10** stimuliert durch IL-1 β und **TNF- α** nach Stimulation mit LPS.

Außerdem zeigte sich ein hoch signifikant erniedrigter Wert für die Messung von **IFN- α** nach Stimulation mit hitzeinaktivierten Listerien (HKLM) gegenüber Kontrollen.

Ansonsten zeigten sich keine Unterschiede signifikanter Relevanz zwischen den Zytokinspiegeln von Patienten und Kontrollen. Die Werte waren sogar bei den Patienten im Schnitt leicht erhöht gegenüber der Kontrollgruppe.

a) IL-12 p40

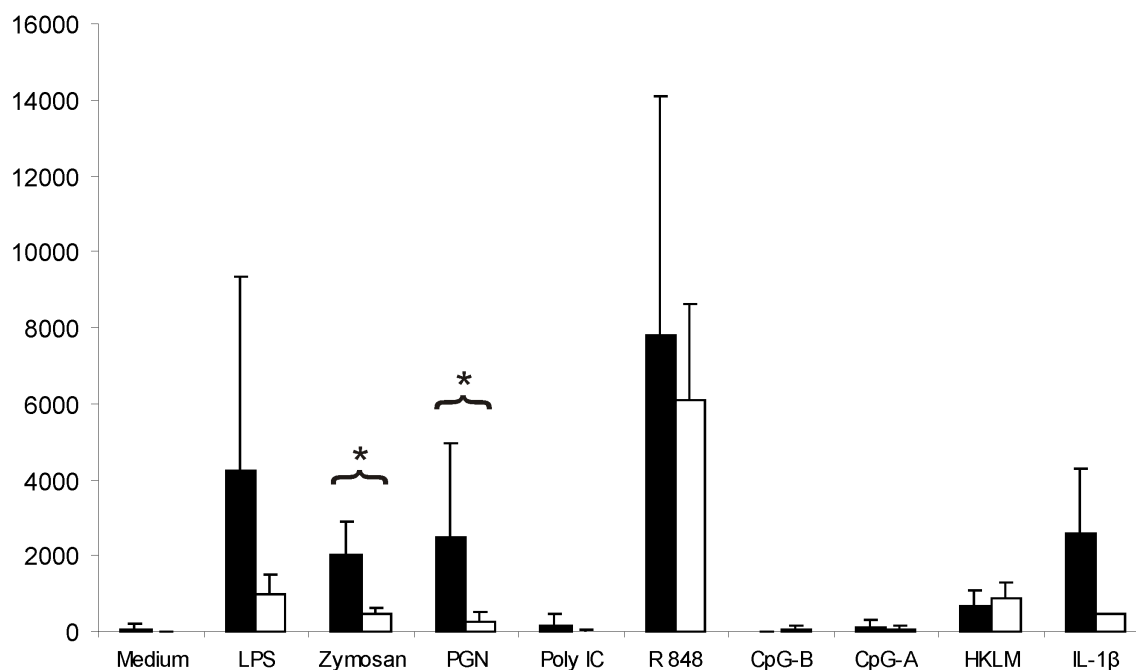
IL-12p40
pg/ml

Abb. 12: Zytokinspiegel von IL-12 p40 in pg/ml 36 Stunden nach TLR Stimulation mit LPS=Lipopolysaccharid, Zymosan, PGN=Peptidoglykan von Staphylococcus aureus, PolyIC, R848, CpG-B, CpG-A, HKLM=heat-killed Listerien und IL-1β bei HIES Patienten (schwarz) gegen Kontrollen (weiß). Gezeigt werden die Mittelwerte + Standardabweichung. *p<0,05 **p<0,01 mit Mann-Whitney-Test für unabhängige Stichproben.

IL-12 p40	Medium	LPS	Zymosan	PGN	Poly IC	R848	CpG-B	CpG-A	HKLM	IL-1β
HIES-Patienten [pg/ml] ± SD	64,2 (± 128,5)	4221,3 (± 5129,9)	1989,7 (± 916,8)	2472,5 (± 2489,4)	163,2 (± 326,3)	7795,2 (± 6311,5)	0,0 (± 0,0)	111,4 (± 222,8)	649,2 (± 418,3)	2575,4 (± 1726,1)
Kontrollen [pg/ml] ± SD	0,0 (± 0,0)	1006,2 (± 473,0)	444,1 (± 163,2)	275,4 (± 249,7)	14,7 (± 29,4)	6109,1 (± 2531,1)	64,2 (± 65,8)	55,1 (± 110,1)	866,7 (± 402,2)	483,8 (± 0,0)
p-Wert	0,69	0,20	0,03	0,03	0,89	1,00	0,11	0,89	0,49	0,34

Tab. 9: Zytokinspiegel von IL-12 p40 in pg/ml 36 Stunden nach TLR Stimulation mit LPS, Zymosan, PGN, PolyIC, R848, CpG-B, CpG-A, HKLM und IL-1β bei HIES Patienten gegen Kontrollen. Dargestellt werden die Mittelwerte ± Standardabweichung und p-Werte mit Mann-Whitney-Test für unabhängige Stichproben.

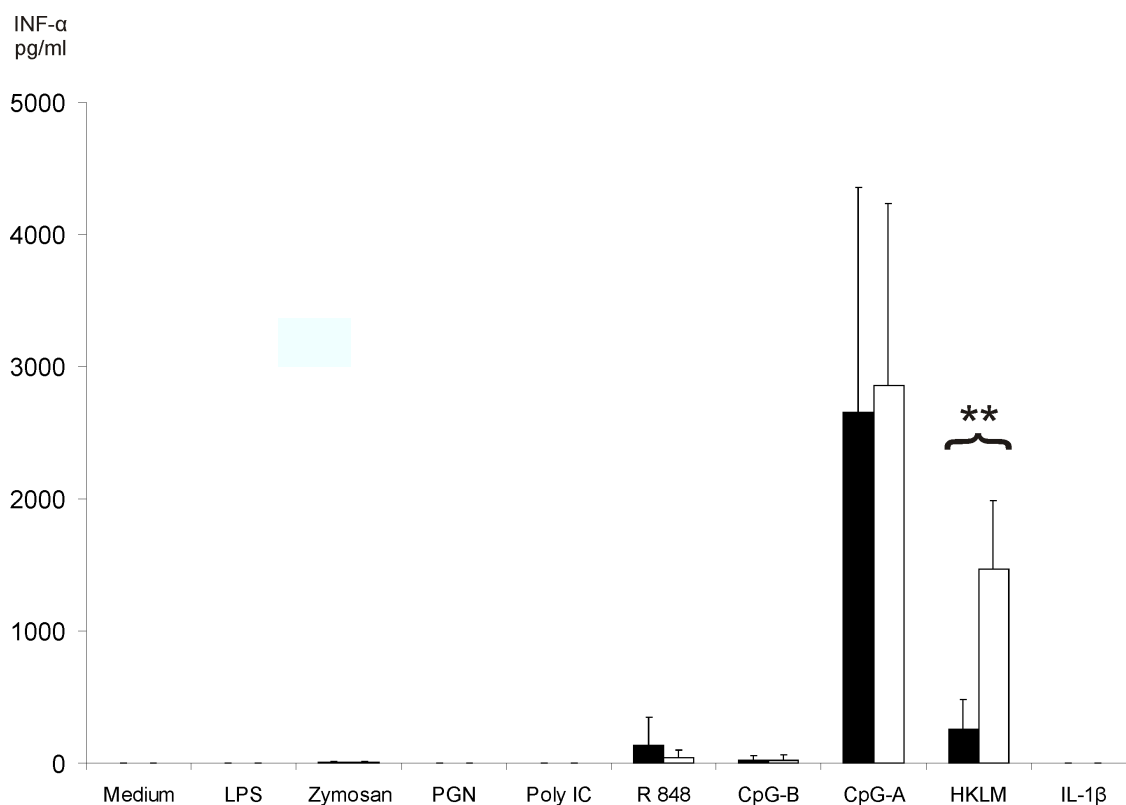
b) IFN- α 

Abb. 13: Zytokinspiegel von IFN- α in pg/ml 36 Stunden nach TLR Stimulation mit LPS=Lipopolysaccharid, Zymosan, PGN=Peptidoglykan von *Staphylococcus aureus*, PolyIC, R848, CpG-B, CpG-A, HKLM=heat-killed Listerien und IL-1 β bei HIES Patienten (schwarz) gegen Kontrollen (weiß). Gezeigt werden die Mittelwerte + Standardabweichung. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ mit Mann-Whitney-Test für unabhängige Stichproben.

INF- α	Medium	LPS	Zymosan	PGN	Poly IC	R848	CpG-B	CpG-A	HKLM	IL-1 β
HIES-Patienten [pg/ml] \pm SD	0,0 (\pm 0,0)	0,0 (\pm 0,0)	4,6 (\pm 11,2)	0,0 (\pm 0,0)	0,0 (\pm 0,0)	138,1 (\pm 207,9)	21,4 (\pm 35,1)	2653,2 (\pm 1701,7)	257,8 (\pm 224,1)	0,0 (\pm 0,0)
Kontrollen [pg/ml] \pm SD	0,0 (\pm 0,0)	0,0 (\pm 0,0)	4,6 (\pm 11,2)	0,0 (\pm 0,0)	0,0 (\pm 0,0)	44,7 (\pm 52,7)	23,7 (\pm 44,2)	2860,5 (\pm 1373,7)	1467,9 (\pm 521,6)	0,0 (\pm 0,0)
p-Wert	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,70	1,00	0,94	<0,01	1,00

Tab. 10: Zytokinspiegel von IFN- α in pg/ml 36 Stunden nach TLR Stimulation mit LPS, Zymosan, PGN, PolyIC, R848, CpG-B, CpG-A, HKLM und IL-1 β bei HIES Patienten gegen Kontrollen. Dargestellt werden die Mittelwerte \pm Standardabweichung und p-Werte mit Mann-Whitney-Test für unabhängige Stichproben.

c) IL-6

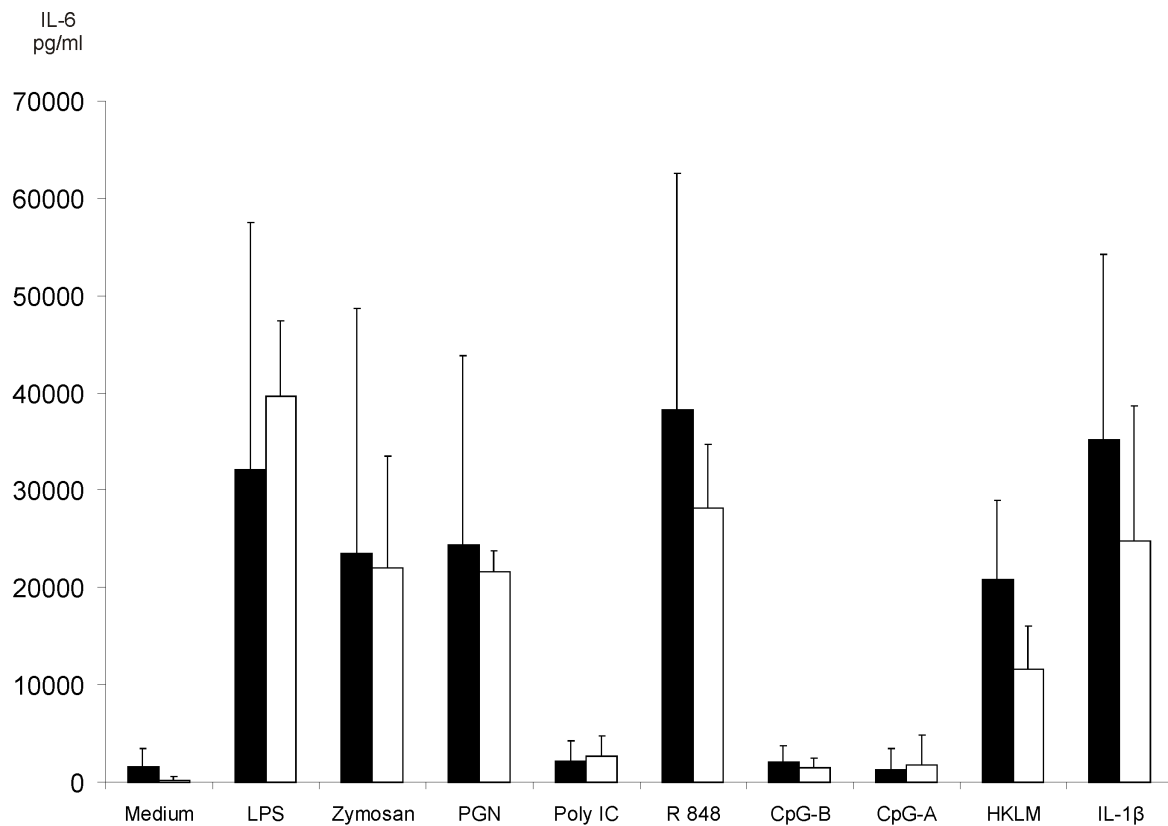


Abb. 14: Zytokinspiegel von IL-6 in pg/ml 36 Stunden nach TLR Stimulation mit LPS=Lipopolysaccharid, Zymosan, PGN=Peptidoglykan von *Staphylococcus aureus*, PolyIC, R848, CpG-B, CpG-A, HKLM=heat-killed Listerien und IL-1β bei HIES Patienten (schwarz) gegen Kontrollen (weiß). Gezeigt werden die Mittelwerte + Standardabweichung. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ mit Mann-Whitney-Test für unabhängige Stichproben.

IL-6	Medium	LPS	Zymosan	PGN	Poly IC	R848	CpG-B	CpG-A	HKLM	IL-1β
HIES-Patienten [pg/ml] ± SD	1620,0 (± 1831,0)	32122,7 (± 25389,7)	23536,4 (± 25113,8)	24375,7 (± 19449,5)	2174,8 (± 2103,1)	38227,9 (± 24297,4)	2113,1 (± 1691,2)	1292,3 (± 2145,3)	20836,5 (± 8098,3)	35172,8 (± 19024,8)
Kontrollen [pg/ml] ± SD	214,9 (± 416,1)	39674,6 (± 7737,7)	21969,7 (± 11525,5)	21609,0 (± 2150,1)	2648,6 (± 2106,3)	28166,7 (± 6492,1)	1481,4 (± 1033,3)	1745,5 (± 3138,2)	11594,3 (± 4487,3)	24829,3 (± 13878,7)
p-Wert	0,06	0,34	0,89	0,68	0,59	0,89	0,89	0,89	0,34	0,34

Tab. 11: Zytokinspiegel von IL-6 in pg/ml 36 Stunden nach TLR Stimulation mit LPS, Zymosan, PGN, PolyIC, R848, CpG-B, CpG-A, HKLM und IL-1β bei HIES Patienten gegen Kontrollen. Dargestellt werden die Mittelwerte ± Standardabweichung und p-Werte mit Mann-Whitney-Test für unabhängige Stichproben.

d) IL-10

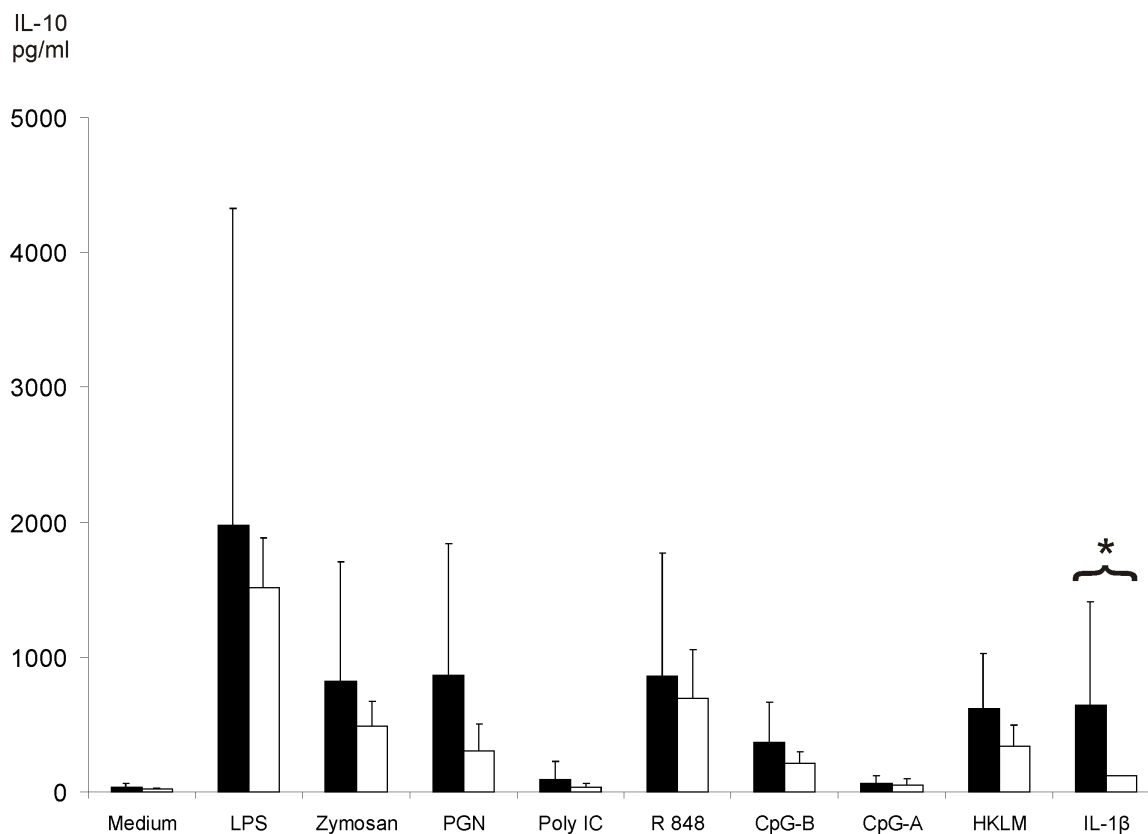


Abb. 15: Zytokinspiegel von IL-10 in pg/ml 36 Stunden nach TLR Stimulation mit LPS=Lipopolysaccharid, Zymosan, PGN=Peptidoglykan von *Staphylococcus aureus*, PolyIC, R848, CpG-B, CpG-A, HKLM=heat-killed Listerien und IL-1 β bei HIES Patienten (schwarz) gegen Kontrollen (weiß). Gezeigt werden die Mittelwerte + Standardabweichung. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ mit Mann-Whitney-Test für unabhängige Stichproben.

IL-10	Medium	LPS	Zymosan	PGN	Poly IC	R848	CpG-B	CpG-A	HKLM	IL-1 β
HIES-Patienten [pg/ml] \pm SD	35,4 (\pm 26,9)	1978,0 (\pm 2349,1)	822,4 (\pm 885,3)	861,6 (\pm 980,4)	93,4 (\pm 137,6)	854,1 (\pm 915,5)	370,9 (\pm 298,4)	61,9 (\pm 61,7)	616,2 (\pm 414,7)	644,4 (\pm 762,2)
Kontrollen [pg/ml] \pm SD	18,9 (\pm 10,4)	1517,1 (\pm 370,2)	491,6 (\pm 181,3)	306,0 (\pm 200,3)	35,1 (\pm 31,2)	697,6 (\pm 356,5)	214,6 (\pm 82,1)	48,0 (\pm 50,5)	337,4 (\pm 155,8)	30,3 (\pm 60,6)
p-Wert	0,49	0,34	0,89	0,69	0,89	0,89	0,49	0,49	0,34	0,03

Tab. 12: Zytokinspiegel von IL-10 in pg/ml 36 Stunden nach TLR Stimulation mit LPS, Zymosan, PGN, PolyIC, R848, CpG-B, CpG-A, HKLM und IL-1 β bei HIES Patienten gegen Kontrollen. Dargestellt werden die Mittelwerte \pm Standardabweichung und p-Werte mit Mann-Whitney-Test für unabhängige Stichproben.

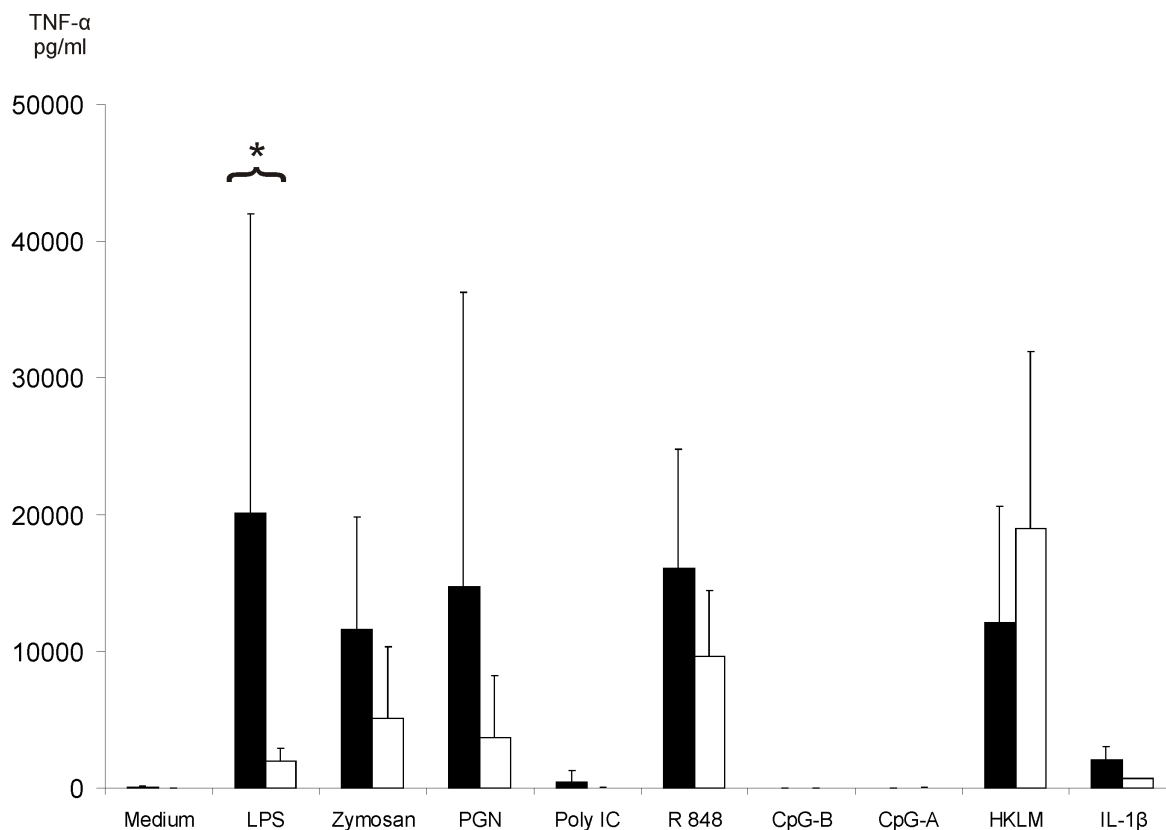
e) TNF- α 

Abb. 16: Zytokinspiegel von TNF- α in pg/ml 36 Stunden nach TLR Stimulation mit LPS=Lipopolysaccharid, Zymosan, PGN=Peptidoglykan von staphylococcus aureus, PolyIC, R848, CpG-B, CpG-A, HKLM=heat-killed Listerien und IL-1 β bei HIES Patienten (schwarz) gegen Kontrollen (weiß). Gezeigt werden die Mittelwerte + Standardabweichung. *p<0,05 **p<0,01 mit Mann-Whitney-Test für unabhängige Stichproben.

TNF- α	Medium	LPS	Zymosan	PGN	Poly IC	R848	CpG-B	CpG-A	HKLM	IL-1 β
HIES-Patienten [pg/ml] \pm SD	63,1 (\pm 112,3)	20144,5 (\pm 21818,5)	11582,7 (\pm 8271,4)	14711,0 (\pm 21561,6)	429,7 (\pm 850,3)	16054,2 (\pm 8726,8)	6,8 (\pm 13,7)	4,0 (\pm 8,1)	12142,0 (\pm 8456,6)	2028,1 (\pm 1031,6)
Kontrollen [pg/ml] \pm SD	0,0 (\pm 0,0)	1983,6 (\pm 907,8)	5068,8 (\pm 5297,7)	3700,5 (\pm 4491,3)	28,1 (\pm 49,3)	9656,9 (\pm 4811,2)	0,5 (\pm 0,5)	29,5 (\pm 58,5)	18975,8 (\pm 12954,1)	732,7 (\pm 0,0)
p-Wert	0,34	0,03	0,20	0,34	1,00	0,69	0,89	0,69	0,69	0,40

Tab. 13: Zytokinspiegel von TNF- α in pg/ml 36 Stunden nach TLR Stimulation mit LPS, Zymosan, PGN, PolyIC, R848, CpG-B, CpG-A, HKLM und IL-1 β bei HIES Patienten gegen Kontrollen. Dargestellt werden die Mittelwerte \pm Standardabweichung und p-Werte mit Mann-Whitney-Test für unabhängige Stichproben.

5. Diskussion

Das HIES ist ein primärer Immundefekt, der gekennzeichnet ist durch Infektionen von Lunge und Haut vor allem durch Staphylokokken und ein Ekzem bei erhöhtem Serum IgE (Davis et al. 1966, Buckley et al. 1972). Als Besonderheit treten beim HIES weitere nicht-immunologische Symptome insbesondere des Skelettsystems auf, die die Erkrankung als Multisystemerkrankung definieren (Grimbacher et al. 1999a).

Die Schwierigkeit, diese Erkrankung ätiologisch einzuordnen, bestand und besteht daher darin, eine ursächliche Pathologie zu finden, die den gesamten Symptomenkomplex bei HIES erklärt.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass ein verändertes Zytokinprofil bei HIES besteht, welches einen Teil der Symptomatik schlüssig erklärt und nicht auf einem Defekt der TLR beruht.

5.1. Verändertes Zytokinprofil bei HIES

Um das Zytokinprofil bei HIES möglichst differenziert darzustellen, wurden für diese Arbeit Zytokine intrazellulär in T-Lymphozyten und Monozyten sowie Spiegel ausgewählter Zytokine im Serum gemessen.

Dabei zeigten sich bei den untersuchten Patienten in CD4⁺-Lymphozyten die Zytokine IFN- γ , IL-2, IL-4 und TNF- α und in CD8⁺-Lymphozyten die Zytokine IFN- γ und TNF- α intrazellulär signifikant vermindert im Vergleich zu gesunden Kontrollen.

Eine signifikante Erhöhung fand sich für IL-10 in CD8⁺-Lymphozyten.

Für IL-2 und IL-4 in CD8⁺-Lymphozyten und für IL-10 in CD4⁺-Lymphozyten zeigten sich keine Unterschiede.

Bei der intrazellulären Messung in Monozyten war IL-1 β signifikant vermindert. Die intrazelluläre Produktion von TNF- α , IL-6, IL-8, IL-10 und IL-12 war nicht signifikant verändert gegenüber gesunden Kontrollen.

Außerdem fiel bei den gemessenen Zytokinen im Serum ein signifikant erhöhter Spiegel von IL-5 auf, während sich für IFN- γ , TNF- α , IL-2, IL-4 und IL-10 keine signifikanten Unterschiede ergaben.

Die vorliegende Arbeit konnte ein stark verändertes Zytokinprofil bei HIES zeigen und bestätigt bezüglich des signifikant vermindert gemessenen intrazellulären IFN- γ Ergebnisse anderer Studien, die eine verminderte T_H1-Antwort, vor allem gekennzeichnet durch eine verminderte IFN- γ -Produktion bzw. Sekretion, beschrieben haben (Netea et al. 2005, Ito et al. 2003, Netea et al. 2002, Borges et al. 2000, Paganelli et al. 1991, Del Prete et al. 1989).

Im Gegensatz hierzu hatten Arbeiten anderer Gruppen keine Veränderung der IFN- γ -Produktion und Sekretion gegenüber Kontrollen ergeben (Vercelli et al. 1990, Rodriguez et al. 1998, Ohga et al. 2003, Martinez et al. 2004).

IFN- γ spielt eine wichtige Rolle in der zellvermittelten Immunität, wobei vor allem die Funktion von Makrophagen gefördert wird (Holländer et al. 2005b, Borish et al. 2003). So könnte eine Erniedrigung des vorhandenen IFN- γ zu der nicht effektiven Immunantwort im Rahmen des HIES beitragen.

Auch wird IFN- γ ein wichtiger Einfluss auf die Chemotaxis neutrophiler Granulozyten zugeschrieben (Ito et al. 2003), welche bereits bei HIES in einzelnen Studien als eingeschränkt beschrieben wurde (Hill et al. 1974a, Hill et al. 1974b, Van Scoy et al. 1975, Blum et al. 1977, Ito et al. 2003). Die Chemotaxis zeigte sich bei einer Gruppe von Patienten nach Gabe von IFN- γ verbessert (Jeppson et al. 1991).

Die intrazelluläre Produktion von IL-2 wurde bisher erst einmal untersucht, zeigte sich dort aber in CD4⁺-T-Zellen unauffällig (Ito et al. 2003).

Das intrazellulär in CD4⁺-Lymphozyten vermindert gemessene IL-2 spielt eine große Rolle in der gerichteten Immunantwort. Es dient als wichtiger T-Lymphozyten-Wachstumsfaktor, bewirkt aber auch eine verstärkte Synthese von Effektorzellen (Borish et al. 2003, Holländer et al. 2005b). Auch hier könnte eine verminderte Produktion eine Rolle bei der ineffektiven Erregerabwehr im Rahmen des HIES spielen.

Die gemessene signifikante Erniedrigung der intrazellulären Produktion von TNF- α in Lymphozyten ist bisher nicht vorbeschrieben. TNF- α bewirkt vor allem die Aktivierung von Neutrophilen und vermittelt Adhärenz, Chemotaxis, Degranulation und Freisetzung von Sauerstoffradikalen (respiratory burst). An Endothelzellen induziert es Adhäsionsmoleküle wie ICAM-1, VCAM-1 und E-Selektin (Borish et al. 2003). Eine Einschränkung der Funktion von neutrophilen Granulozyten könnte daher erheblich zur Symptomatik des HIES beitragen.

Zu einem geringen Teil ist TNF- α auch an der IL-2 vermittelten Produktion von IFN- γ beteiligt (Beutler et al. 1989) und könnte die reduzierte Aktivierbarkeit von IFN- γ produzierenden Lymphozyten noch zusätzlich verstärken.

Auch die in Monozyten nachgewiesene intrazelluläre Verminderung von IL-1 β dürfte einen Teil zur eingeschränkten Infektabwehr beitragen, hier möglicherweise auch zur Infektion ohne systemische Infektzeichen und „kalten“ Abszessen, die für HIES typisch sind. IL-1 β spielt dabei eine wichtige Rolle bei der Verstärkung der Inflammation und auch bei der systemischen Antwort des Körpers wie z.B. der Entwicklung von Fieber (Dinarello 2005, Holländer et al. 2005b, Borish et al. 2003).

Die nicht gesteigerte T_H2-Antwort, insbesondere in Bezug auf IL-4, wie sie die vorliegende Arbeit zeigt, wurde bereits mehrfach beschrieben (Ito et al. 2003, Gudmundsson et al. 2002, Rodriguez et al. 1998, Vercelli et al. 1990). CD4⁺-Lymphozyten der hier untersuchten HIES-Patienten produzierten sogar weniger

IL-4 als gesunde Kontrollen. Dies steht im Gegensatz zu bisherigen Studien und auch zu der Beobachtung des erhöhten Serum-IgEs der HIES-Patienten. IL-4 gilt als Gegenspieler von IFN- γ bei der Regulation des IgE und sollte bei verminderter Produktion eigentlich zu einer Erniedrigung des IgE führen (Borish et al. 2003, Holländer et al. 2005b). Die im CBA gemessenen Serumspiegel von IL-4 zeigten keinen Unterschied zwischen Patienten und gesunden Kontrollen.

Die signifikante Erhöhung von IL-10 in CD8⁺-Lymphozyten dürfte hier keine große Rolle spielen. IL-10 wird zwar teilweise als Teil der T_H2-Antwort beschrieben (Holländer et al. 2005b), mittlerweile gilt IL-10 aber als möglicher Aktivator bzw. Suppressor von T_H1- und T_H2-Antwort (Couper et al. 2008). Insgesamt scheint auch die Produktion in CD4⁺-Lymphozyten eine deutlich gewichtigere Rolle bei der Beeinflussung der Immunantwort zu spielen (Trinchieri 2007).

Bei den mittels CBA gemessenen Serumspiegeln ausgewählter Zytokine fiel eine signifikante Erhöhung des Serumspiegels von IL-5 auf. Eine erhöhte basale Sekretion von IL-5 wurde auch von Montoya et al. bei HIES bereits beobachtet (2003).

Diesem Zytokin wird eine wichtige Rolle bei der Entstehung einer Eosinophilie zugeschrieben (Simon et al. 2004). Überproduktion von IL-5 scheint deshalb verbunden zu sein mit Eosinophilie im Blut und hohen Zahlen von infiltrierenden Eosinophilen, die ein histopathologisches Kennzeichen der ekzematösen Hautläsionen bei HIES sind (Chamlin et al. 2002).

Erklären lässt sich diese Erhöhung von IL-5 zumindest teilweise durch die verminderte Produktion von IFN- γ . Es gibt starke Hinweise, dass IFN- γ die Entwicklung von IL-5- und IL-4-produzierenden T_H2-Zellen behindert und direkt auf B-Lymphozyten wirkt und so einen Klassenwechsel auf IgE und IgG₁-Isotypen unterdrückt (Geha et al. 2003). Unterproduktion von IFN- γ , wie bei den hier beschriebenen Patienten beobachtet, würde die Inhibition vermindern und könnte so zu erhöhten IgE-Spiegeln und über IL-5 zu einer höheren Zahl von Eosinophilen führen.

Neben dieser Wirkung auf die eingeschränkte Infektabwehr spielt die verringerte intrazelluläre Produktion von IFN- γ und IL-2 eine zweite wichtige Rolle. Vor allem IFN- γ hat großen Einfluss auf die Antikörper-Bildung, indem es den Isotypen-Wechsel zu IgG₄ und IgE hemmt (Holländer et al. 2005b, Borish et al. 2003). Ein Fehlen bzw. eine Verminderung des IFN- γ und damit der T_H1-Antwort trägt so zur vermehrten IgE-Bildung bei und ist ein wichtiger Faktor beim namensgebenden Symptom des HIES.

Die Hauptproduzenten von IFN- γ sind T-Lymphozyten (Borish et al. 2003, Holländer et al. 2005b), so dass sich eine Verminderung des intrazellulären

IFN- γ in einem erniedrigten Serumspiegel des Zytokins niederschlagen sollte. Dieser Spiegel wurde in dieser Studie gleich dem von Kontrollen gemessen. Da die intrazelluläre IFN- γ -Menge in Monozyten ähnlich denen der Kontrollen war, könnte eine mögliche Erklärung in einer Mehrproduktion durch andere Zellen, z.B. NK-Zellen (Borish et al. 2003, Holländer et al. 2005b) oder dendritische Zellen, liegen (Bonmort et al. 2007). Auch ist vorstellbar, dass trotz des erniedrigten intrazellulären Zytokins bei HIES-Patienten normale Basalspiegel von IFN- γ erreicht werden, während die Mehrproduktion im Rahmen von Infektionsprozessen nicht suffizient erfolgen kann.

Gleiches gilt für die normal gemessenen Serumspiegel von IL-2 bei deutlich vermindertem intrazellulärem Zytokin in CD4⁺-Lymphozyten, dem wichtigsten Produzenten von IL-2 (Gaffen et al. 2004).

Insgesamt zeigt sich im Rahmen der hier dargestellten Untersuchungen von HIES-Patienten ein deutlich verändertes Zytokinprofil, das einige wichtige Symptome des HIES erklären kann: Die verminderte Stimulierbarkeit von IFN- γ , IL-2 und TNF- α produzierenden Lymphozyten und IL-1 β produzierenden Monozyten bedingt eine eingeschränkte Infektabwehr und liefert in Zusammenschau mit der nicht veränderten T_H2-Antwort und dem erhöhten Spiegel von IL-5 auch eine Erklärung für das erhöhte Serum IgE und die Eosinophilie bei HIES-Patienten. Zudem kann eine eingeschränkte Funktion der neutrophilen Granulozyten, insbesondere der Chemotaxis, durch dieses veränderte Zytokinprofil mitverursacht sein. Diese scheint aber nicht immer nachweisbar zu sein und ist wohl nicht Ursache für die erhöhte Erregerempfindlichkeit, sondern eine verstärkende Begleiterscheinung.

Einschränkungen bei der Beurteilung von Zytokinprofilen beruhen sicherlich zu einem wesentlichen Teil auf der hohen physiologischen Flexibilität dieses Systems in Abhängigkeit verschiedenster exogener und endogener Stimuli. Die im Rahmen dieser Arbeit dargestellten Untersuchungsergebnisse sind aufgrund differierender Messzeitpunkte und Stimulanzen nicht immer mit den in der Literatur bereits beschriebenen Zytokinmessungen bei HIES-Patienten vergleichbar. Dies stellt eine naheliegende Erklärung für die teils divergierenden Ergebnisse, z.B. bezüglich IFN- γ und IL-2 Produktion, dar.

Außerdem ist wegen bis vor kurzem fehlender Möglichkeiten, das „klassische“ HIES genetisch nachzuweisen, in Frage zu stellen, ob es sich in jeder Studie um wirkliche HIES-Patienten gehandelt hat. Hierbei ist stets die insgesamt geringe Zahl an HIES-Patienten weltweit zu bedenken, so dass in den einzelnen Studien wie auch in dieser nur kleine Patientenzahlen untersucht werden konnten.

Diese Studie zeigt mit den angeführten Einschränkungen ein deutlich verändertes Zytokinprofil, das einen Teil der immunologischen Symptome bei HIES erklären kann, aber nicht das HIES als Multisystemerkrankung.

5.2. Ausschluss eines Defektes der TLR Signalwege

Der Rückschluss von einem veränderten Zytokinprofil auf einen möglichen Defekt im Bereich der TLR erscheint naheliegend. Eine verminderte Erregererkennung wie bei einem Defekt in diesem Bereich und eine dementsprechend veränderte Signalkaskade könnte an ihrem Ende eine veränderte Zytokinproduktion und die bei HIES beschriebene eingeschränkte Abwehr einzelner Pathogene erklären.

In dieser Dissertation wurde die Zytokinantwort über TLR Signalwege auf verschiedenste Stimulanzen untersucht.

Dabei zeigte sich eine im Vergleich zu gesunden Kontrollen normale Zytokinausschüttung, nur IFN- α wurde nach Stimulation mit hitzeinaktivierten Listerien (HKLM) signifikant vermindert gemessen. Bei der Bildung von TNF- α , IL-6, IL-10 und IL-12p40 auf HKLM-Stimulation zeigten sich keine Unterschiede. Ansonsten wiesen die HIES-Patienten keine reduzierte Zytokinausschüttung auf TLR Stimulation auf.

So ließen sich insbesondere für TLR-2, dessen Defekt ein ähnliches Erregerprofil wie das HIES mit hoher Empfindlichkeit gegen *Staphylococcus aureus* und Pilzinfektionen (Takeuchi et al. 2000, Lorenz et al. 2000, Roeder et al. 2004) zeigen würde, insgesamt normale Antworten auf drei Stimuli beobachten, die über TLR-2 erkannt werden: Zymosan (Extrakt aus Zellwänden von Hefepilzen), Peptidoglykan (von *Staphylococcus aureus*, erkannt in Verbindung mit TLR-6) und hitzeinaktivierte Listerien.

Es lässt sich deshalb vermuten, dass es keine wesentlichen funktionellen Defekte in den getesteten TLR oder den Adaptern MyD88, TRIF, MAL oder TRAM oder in den Signalmolekülen wie IRAK-4, NEMO und $\text{I}\kappa\text{B}-\alpha$ gibt, die über verschiedene Signalwege zur NF κ -B Aktivierung führen (Renner et al. 2005).

Dies deckt sich mit den Ergebnissen von Hawn et al., die einzelne TLR untersuchten und dabei ebenfalls keine Defekte fanden (2005).

Die gemessenen Zytokinspiegel waren teilweise sogar höher als bei den Kontrollen. Hier zeigte sich eine signifikante Erhöhung von IL-12p40 nach Stimulation mit Zymosan und Peptidoglykan, von IL-10 auf IL-1 β -Stimulation und von TNF- α nach LPS.

Trotz weniger Untersuchungen bisher zu der Bedeutung von TLR bei HIES wurde sowohl die Erhöhung von IL-12 auf Peptidoglykan als auch die von TNF- α nach LPS-Stimulation bereits vorbeschrieben (Hawn et al. 2005, Yeganeh et al. 2008).

Eine Erklärung für diese teilweise erhöhten Antworten auf TLR-Stimulation ist bisher noch nicht gefunden. Möglicherweise bedingt ein verändertes

Zytokinprofil, wie es bei HIES vorliegt, über akzessorische Signalwege eine höhere Aktivierbarkeit der TLR Signalwege (Hawn et al. 2005).

Bei der Beurteilung der im Rahmen dieser Arbeit gefundenen Ergebnisse ist allerdings zu bedenken, dass mit der durchgeführten Methodik nur große Defekte in den Signalwegen der TLR ausgeschlossen werden können. Mutationen, die die Funktion der TLR nur partiell verändern, lassen sich möglicherweise nur durch sensitivere oder spezifischere Methoden identifizieren. Außerdem ist auch in diesem Fall die relativ geringe Zahl an Patienten anzuführen, die eine allgemeine Aussage nicht möglich macht.

Fasst man die durchgeführten Experimente zusammenfassen, wurde in dieser Arbeit ein stark verändertes Zytokinprofil vor allem der T-Lymphozyten nachgewiesen, das aber nicht durch einen großen Defekt der TLR Signalwege bedingt ist.

Letztendlich können die beschriebenen Zytokinveränderungen einen Teil der Symptome bei HIES erklären, aber nicht das Bild einer Multisystemerkrankung, wie es bei HIES vorliegt (Grimbacher et al. 1999a).

5.3. Mutationen des STAT3-Gens bei HIES

Erst kürzlich gelang die ätiologische Einordnung des HIES. Es wurden verschiedene heterozygote Mutationen im STAT3-Gen (STATs = Signal Transducers and Activators of Transcription) bei HIES Patienten identifiziert (Renner et al. 2007, Holland et al. 2007, Minegishi et al. 2007, Renner et al. 2008) und somit die vermutete genetische Grundlage der Erkrankung bestätigt. Diese Mutationen sind bei einem Großteil der „klassischen“ HIES-Patienten nachweisbar und betreffen unterschiedliche Bereiche des STAT3-Gens wie DNA-Bindung oder Transaktivierung. Dabei scheinen die unterschiedlichen Mutationen keine phänotypischen Unterschiede zu verursachen (Renner et al. 2008).

STATs spielen eine große Rolle in der zytokinvermittelten Signalverarbeitung. Nach Bindung der Zytokine an ihre Rezeptoren werden rezeptor-assoziierte JAKs (Janus Kinasen) aktiviert, die wiederum STATs phosphorylieren, die dann dimerisieren und in den Zellkern translozieren, wo sie Zielgene aktivieren (Darnell et al. 1994). Bisher wurden sieben verschiedene STATs identifiziert (Copeland et al. 1995).

Veränderungen der STAT3-Aktivität haben Einfluss auf verschiedenste Organsysteme, da sie eine Rolle in den verschiedensten Zytokinsignalwegen spielen: Bei der IL-6 Familie (IL-6, IL-11, IL-27, IL-31, LIF, OSM, CNTF, Cardiotrophin-1), der IFN-Familie (IL-10, IL-19, IL-20, IL-22, IL-24, IL-26,

IFN- α/β , IFN- γ), der IL-2 Familie (IL-2, IL-7, IL-9, IL-15, IL-21), IL-5, IL-23, CSF3/G-CSF, EGF, CSF1 und Leptin (Kisseleva et al. 2002, Darnell 1997, Levy et al. 2002).

Eine durch die Mutationen von STAT3 bedingte Verminderung von IL-17 produzierenden T_H17-Zellen (Yang et al. 2007, Nishihara et al. 2007, Renner et al. 2008, Milner et al. 2008) scheint direkt zur bei HIES beschriebenen Empfindlichkeit gegen Staphylococcus aureus und Candida Spezies beizutragen (Huang et al. 2004, Acosta-Rodriguez et al. 2007).

Ein weiterer Grund für die erhöhte Infektanfälligkeit könnte eine Veränderung der Knochenmarkfunktion sein. So zeigen Mäuse mit STAT3-Defizienz im Knochenmark eine Eosinophilie und ein Überwiegen reifer Granulozyten bzw. einen Mangel an unreifen Granulozyten im Knochenmark. Weiterhin beobachtet man eine eingeschränkte Chemotaxis dieser Granulozyten (Panopoulos et al. 2006), wie sie von einigen Studien auch bei HIES-Patienten beschrieben wurde (Hill et al. 1974a, Hill et al. 1974b, Van Scoy et al. 1975, Blum et al. 1977, Donabedian et al. 1983, Ito et al. 2003).

Neben den immunologischen Konsequenzen scheint STAT3 auch wichtig für den funktionierenden Stoffwechsel von Knochen und Bindegewebe zu sein. Neben der eingeschränkten Infektabwehr ist möglicherweise eine erhöhte Fragilität des Bronchialsystems für die bei HIES typische Bildung von Pneumatozelen verantwortlich (Hokuto et al. 2004, Gao et al. 2004, Severgnini et al. 2004). Auch der Knochenstoffwechsel ist durch einen Mangel an STAT3 betroffen und liefert eine mögliche Erklärung für die Skelettveränderungen bei HIES (Zhang et al. 2005, Itoh et al. 2006).

Ein wichtiger Punkt in der Symptomatik des HIES ist aber durch die gefundenen STAT3-Mutationen noch nicht geklärt. Das in dieser Arbeit gefundene veränderte Zytokinprofil mit dem erhöhten Serum IgE ist durch Veränderungen der STAT3-Signalwege bisher nicht schlüssig erklärbar.

Eine Verringerung der T_H1-Antwort ist möglicherweise auf eine Mitbeteiligung von STAT3 bei der Aktivierung der T_H1-Antwort über IL-12 und IL-18 zurückzuführen (Sugimoto et al. 2003, Dinarello 1999, Jacobson et al. 1995); hier sind IL-12 und IL-18 vor allem für die Bildung von IFN- γ ein wichtiger Faktor (Yoshimoto et al. 1998, Dinarello 1999, Munder et al. 1998, Trinchieri 1995). So könnte durch die verringerte STAT3-Aktivität auch eine verminderte intrazelluläre Aktivierung von IFN γ bedingt sein. Dies steht in Einklang mit mehreren Studien, die eine Störung der IL-12/IL-18/IFN- γ -Achse beschrieben ohne Mangel an IL-12 (Borges et al. 2000, Netea et al. 2005).

Bei allen sechs in dieser Studie untersuchten HIES-Patienten ließen sich Mutationen des STAT3-Gens nachweisen (Renner et al. 2008, Schimke *in Vorbereitung*) und viele der bekannten Symptome dadurch begründen.

Nachdem die ätiologische Einordnung des klassischen HIES gelungen ist, ist es nun wichtig, den Zusammenhang zwischen STAT3-Mutationen und verändertem Zytokinprofil bei HIES zu klären.

6. Zusammenfassung

Das Hyper IgE-Syndrom ist ein seltener primärer Immundefekt, gekennzeichnet durch rezidivierende Staphylokokken-Infektionen der Lunge und der Haut, chronisches Ekzem und erhöhtes IgE im Serum.

Diese Arbeit untersuchte bei sechs Patienten mit „klassischem“ autosomal-dominantem HIES das intrazelluläre Zytokinprofil einzelner Zytokine in Lymphozyten und Monozyten.

Hierbei fanden sich signifikant erniedrigte Mengen von IFN- γ und TNF- α in CD4⁺ - und CD8⁺-Lymphozyten bei Patienten mit HIES gegenüber gesunden Kontrollen. In CD4⁺-Lymphozyten fanden sich bei HIES-Patienten signifikant erniedrigte Mengen von IL-2 und IL-4 gegenüber Kontrollen. IL-10 in CD8⁺-Lymphozyten war dagegen signifikant erhöht messbar.

IL-2 und IL-4 in CD8⁺-Lymphozyten und IL-10 in CD4⁺-Lymphozyten zeigten sich nicht verändert gegenüber den Kontrollen.

Die intrazelluläre Messung von IL-1 β in Monozyten ergab eine signifikante Verminderung bei den HIES-Patienten gegenüber gesunden Kontrollen, für TNF- α , IL-6, IL-8, IL-10 und IL-12 fanden sich keine relevanten Unterschiede.

Bei der Messung einzelner Zytokine im Serum mittels CBA wurde ein signifikant erhöhter Spiegel von IL-5 bei Patienten gegenüber Kontrollen nachgewiesen. Bei den Werten für IFN- γ , TNF- α , IL-2, IL-4 und IL-10 stellten sich keine Unterschiede dar.

Bei der Beurteilung von Zytokinspiegeln nach Stimulation mit TLR-Liganden zeigte sich IFN- α auf hitzeinaktivierte Listerien signifikant vermindert. IL-12p40 (auf Zymosan und Peptidoglykan), IL-10 (auf IL-1 β) und TNF- α (auf LPS) waren signifikant erhöht.

Diese Arbeit zeigt damit ein vor allem in Lymphozyten verändertes Zytokinprofil bei HIES, das durch eine verminderte T_H1-Antwort und die Verminderung mehrerer inflammatorischer Zytokine gekennzeichnet ist. Diese bedingt eine erhöhte Infektanfälligkeit und ein Überwiegen der T_H2-Antwort mit erhöhtem Serum IgE und Eosinophilie.

Ein wesentlicher Defekt der TLR Signalwege konnte als Ursache dieser Einschränkungen ausgeschlossen werden, vielmehr scheinen die TLR Signalwege teilweise leichter aktivierbar zu sein als bei gesunden Kontrollen.

Durch die kürzlich erfolgte Beschreibung mehrerer Mutationen des STAT3-Gens bei der „klassischen“ Variante des HIES ist die ätiologische Einordnung des HIES gelungen. Allerdings sind die Zusammenhänge zwischen STAT3-

Mutationen, verändertem Zytokinprofil und erhöhter TLR Antwort bei HIES noch weiter zu untersuchen.

Es bleibt zu hoffen, dass die gewonnenen Erkenntnisse eine kausale Behandlung des HIES ermöglichen und so zu einer Verbesserung der Lebensqualität und Lebenserwartung der Patienten in Zukunft beitragen.

7. Literatur

- Acosta-Rodriguez EV, Rivino L, Geginat J, Jarrossay D, Gattorno M, Lanzavecchia A, Sallusto F, Napolitani G (2007)** Surface phenotype and antigenic specificity of human interleukin 17-producing T helper memory cells. *Nat Immunol.* 2007 Jun;8(6):639-46.
- Aihara Y, Mori M, Katakura S, Yokota S (1998)** Recombinant IFN-gamma treatment of a patient with hyperimmunoglobulin E syndrome triggered autoimmune thrombocytopenia. *J Interferon Cytokine Res.* 1998 Aug;18(8):561-3.
- Akira S, Takeda K (2004)** Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol.* 2004 Jul; 4(7):499-511.
- Bell JK, Mullen GE, Leifer CA, Mazzoni A, Davies DR, Segal DM (2003)** Leucine-rich repeats and pathogen recognition in Toll-like receptors. *Trends Immunol.* 2003 Oct; 24(10):528-33.
- Belohradsky BH, Däumling S, Kiess W, Griscelli C (1987)** Das Hyper-IgE-Syndrom (Buckley- oder Hiob-Syndrom). *Ergeb Inn Med Kinderheilkd.* 1987; 55:1-39.
- Beutler B, Cerami A (1989)** The biology of cachectin/TNF - a primary mediator of the host response. *Annu Rev Immunol.* 1989;7:625-55.
- Blum R, Geller G, Fish LA (1977)** Recurrent severe staphylococcal infections, eczematoid rash, extreme elevations of IgE, eosinophilia, and divergent chemotactic responses in two generations. *J Pediatr.* 1977 Apr; 90(4):607-9.
- Bong CN, Huang SC, Wang CL, Liu PM, Chen HH, Yang KD (2005)** Cyclosporin A therapy in a case with hyperimmunoglobulin E and nephrotic syndrome. *J Microbiol Immunol Infect.* 2005 Feb; 38(1):60-4.
- Bonmort M, Ullrich E, Mignot G, Jacobs B, Chaput N, Zitvogel L (2007)** Interferon-gamma is produced by another player of innate immune responses: the interferon-producing killer dendritic cell (IKDC). *Biochimie.* 2007 Jun-Jul;89(6-7):872-7.

- Borges WG, Augustine NH, Hill HR (2000)** Defective interleukin-12/interferon-gamma pathway in patients with hyperimmunoglobulinemia E syndrome. *J Pediatr.* 2000 Feb;136(2):176-180.
- Borish LC, Steinke JW (2003)** 2. Cytokines and chemokines. *J Allergy Clin Immunol.* 2003 Feb;111(2 Suppl):460-475.
- Buckley RH, Wray BB, Belmaker EZ (1972)** Extreme hyperimmunoglobulinemia E and undue susceptibility to infection. *Pediatrics.* 49 (1) :59-70.
- Buckley RH, Becker WG (1978)** Abnormalities in the regulation of human IgE synthesis. *Immunol Rev.* 1978;41:288-314.
- Buckley RH, Sampson HA (1981)** The hyperimmunoglobulinemia E syndrome. in *Clinical Immunology Update*, Franklin EC, ed., Elsevier North Holland, New York, pp. 147-167.
- Buckley RH (2001)** The hyper-IgE syndrome. *Clin Rev Allergy Immunol.* 20(1):139-54.
- Chamlin SL, McCalmont TH, Cunningham BB, Esterly NB, Lai CH, Mallory SB, Mancini AJ, Tamburro J, Frieden IJ (2002)** Cutaneous manifestations of hyper-IgE syndrome in infants and children. *J Pediatr.* 2002 Oct; 141(4):572-5.
- Chehimi J, Elder M, Greene J, Noroski L, Stiehm ER, Winkelstein JA, Sullivan KE (2001)** Cytokine and chemokine dysregulation in hyper-IgE syndrome. *Clin Immunol.* 2001 Jul;100(1):49-56.
- Chen R, Lowe L, Wilson JD, Crowther E, Tzeggai K, Bishop JE, Varro R (1999)** Simultaneous Quantification of Six Human Cytokines in a Single Sample Using Microparticle-based Flow Cytometric Technology. *Clin Chem.* Sep;45(9):1693-1694.
- Copeland NG, Gilbert DJ, Schindler C, Zhong Z, Wen Z, Darnell JE Jr, Mui AL, Miyajima A, Quelle FW, Ihle JN, et al. (1995)** Distribution of the mammalian Stat gene family in mouse chromosomes. *Genomics.* 1995 Sep 1;29(1):225-8.
- Couper KN, Blount DG, Riley EM (2008)** IL-10: the master regulator of immunity to infection. *J Immunol.* 2008 May 1;180(9):5771-7.

- Darnell JE Jr, Kerr IM, Stark GR (1994)** Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science*. 1994 Jun 3;264(5164):1415-21.
- Darnell JE Jr. (1997)** STATs and gene regulation. *Science*. 1997 Sep 12; 277(5332):1630-5.
- Davis SD, Schaller J and Wedgewood RJ (1966)** Job's Syndrome. Recurrent, "cold", staphylococcal abscesses. *Lancet*. 1 (7445):1013-1015.
- Däumling S, Buriot D, Trung PH, Griscelli C, Lalama MC, Belohradsky BH (1980)** Das Buckley Syndrom: Rezdivierende, schwere Staphylokokkeninfektionen, Ekzem und Hyperimmunglobulinämie E. *Infection*. 1980;8 Suppl 3:248-54.
- Del Prete G, Tiri A, Maggi E, De Carli M, Macchia D, Parronchi P, Rossi ME, Pietrogrande MC, Ricci M, Romagnani S (1989)** Defective in vitro production of gamma-interferon and tumor necrosis factor-alpha by circulating T cells from patients with the hyper-immunoglobulin E syndrome. *J Clin Invest*. 1989 Dec;84(6):1830-1835.
- Dinarello CA (1999)** Interleukin-18. *Methods*. 1999 Sep;19(1):121-32.
- Dinarello CA (2005)** Interleukin-1 β . *Crit Care Med*. 2005 Dec;33(12 Suppl):S460-2.
- Donabedian H, Gallin JI (1982)** Mononuclear cells from patients with the hyperimmunoglobulin E-recurrent infection syndrome produce an inhibitor of leukocyte chemotaxis. *J Clin Invest*. 1982 May;69(5) :1155-1163.
- Donabedian H, Gallin JI (1983)** The hyperimmunoglobulin E recurrent-infection (Job's) syndrome. A review of the NIH experience and the literature. *Medicine. (Baltimore)* 1983 Jul;62(4):195-208.
- Erlewyn-Lajeunesse MD (2000)** Hyperimmunoglobulin-E syndrome with recurrent infection: a review of current opinion and treatment. *Pediatr Allergy Immunol*. 2000 Aug; 11(3) :133-41.
- Etzioni A, Shehadeh N, Brecher A, Yorman S, Pollack S (1997)** Cyclosporin A in hyperimmunoglobulin E syndrome. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 1997 Apr; 78(4):413-4.

- Farkas LG (1994)** Anthropometry of the head and face in medicine. Raven Press, New York
- Gaffen SL, Liu KD (2004)** Overview of interleukin-2 function, production and clinical applications. *Cytokine*. 2004 Nov 7;28(3):109-23.
- Gahr M, Muller W, Allgeier B, Speer CP (1987)** A boy with recurrent infections, impaired PMN-chemotaxis, increased IgE concentrations and cranial synostosis - a variant of the hyper-IgE syndrome? *Helv Paediatr Acta*. 1987 Oct;42(2-3):185-190.
- Gao H, Guo RF, Speyer CL, Reuben J, Neff TA, Hoesel LM, Riedemann NC, McClintock SD, Sarma JV, Van Rooijen N, Zetoune FS, Ward PA (2004)** Stat3 activation in acute lung injury. *J Immunol*. 2004 Jun 15;172(12):7703-12.
- Geha RS, Jabara HH, Brodeur SR (2003)** The regulation of immunoglobulin E class-switch recombination. *Nat Rev Immunol*. 2003 Sep;3(9):721-32.
- Gennery AR, Flood TJ, Abinun M, Cant AJ (2000)** Bone marrow transplantation does not correct the hyper IgE syndrome. *Bone Marrow Transplant*. 2000 Jun; 25(12):1303-5.
- Grimbacher B, Holland SM, Gallin JI, Greenberg F, Hill SC, Malech HL, Miller JA, O'Connell AC, Puck JM (1999a)** Hyper-IgE syndrome with recurrent infections - an autosomal dominant multisystem disorder. *N Engl J Med*. 1999 Mar 4; 340(9):692-702.
- Grimbacher B, Schaffer AA, Holland SM, Davis J, Gallin JI, Malech HL, Atkinson TP, Belohradsky BH, Buckley RH, Cossu F, Espanol T, Garty BZ, Matamoros N, Myers LA, Nelson RP, Ochs HD, Renner ED, Wellinghausen N, Puck JM (1999b)** Genetic linkage of hyper-IgE syndrome to chromosome 4. *Am J Hum Genet*. 1999 Sep;65(3):735-44.
- Gudmundsson KO, Sigurjonsson OE, Gudmundsson S, Goldblatt D, Weemaes CM, Haraldsson A (2002)** Increased expression of interleukin-13 but not interleukin-4 in CD4+ cells from patients with the hyper-IgE syndrome. *Clin Exp Immunol*. 2002 Jun;128(3):532-7.
- Hashimoto C, Hudson KL, Anderson KV (1988)** The Toll gene of Drosophila, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. *Cell*. 1988 Jan 29; 52(2):269-79.

- Hawn TR, Ozinsky A, Williams LM, Rodrigues S, Clark A, Pham U, Hill HR, Ochs H, Aderem A, Liles WC (2005)** Hyper-IgE syndrome is not associated with defects in several candidate toll-like receptor pathway genes. *Hum Immunol.* 2005 Jul;66(7):842-847.
- Hill HR, Ochs HD, Quie PG, Clark RA, Pabst HF, Klebanoff SJ, Wedgwood RJ (1974a)** Defect in neutrophil granulocyte chemotaxis in Job's syndrome of recurrent "cold" staphylococcal abscesses. *Lancet.* 1974 Sep 14;2(7881):617-619.
- Hill HR, Quie PG (1974b)** Raised serum-IgE levels and defective neutrophil chemotaxis in three children with eczema and recurrent bacterial infections. *Lancet.* 1974 Feb 9;1(7850):183-187.
- Hoffmann JA (2003)** The immune response of *Drosophila*. *Nature.* 2003 Nov 6;426(6962):33-8.
- Hokuto I, Ikegami M, Yoshida M, Takeda K, Akira S, Perl AK, Hull WM, Wert SE, Whitsett JA (2004)** Stat-3 is required for pulmonary homeostasis during hyperoxia. *J Clin Invest.* 2004 Jan;113(1):28-37.
- Holländer GA, Barthlott T, Keller MP, Krenger W, Piali L (2005a)** Das natürliche Immunsystem . In Wahn U, Seger R, Wahn V (ed): *Pädiatrische Allergologie und Immunologie*, 4.Auflage ed. München, Jena; Urban & Fischer Verlag, S.7-10
- Holländer GA, Barthlott T, Keller MP, Krenger W, Piali L (2005b)** Zytokine und ihre Netzwerke. In Wahn U, Seger R, Wahn V (ed): *Pädiatrische Allergologie und Immunologie*, 4.Auflage ed. München, Jena; Urban & Fischer Verlag, S.147-182
- Holland SM, DeLeo FR, Elloumi HZ, Hsu AP, Uzel G, Brodsky N, Freeman AF, Demidowich A, Davis J, Turner ML, Anderson VL, Darnell DN, Welch PA, Kuhns DB, Frucht DM, Malech HL, Gallin JI, Kobayashi SD, Whitney AR, Voyich JM, Musser JM, Woellner C, Schäffer AA, Puck JM, Grimbacher B (2007)** STAT3 mutations in the hyper-IgE syndrome. *N Engl J Med.* 2007 Oct 18;357(16):1608-19.
- Huang W, Na L, Fidel PL, Schwarzenberger P (2004)** Requirement of interleukin-17A for systemic anti-*Candida albicans* host defense in mice. *J Infect Dis.* 2004 Aug 1;190(3):624-31.

- Ito R, Mori M, Katakura S, Kobayashi N, Naruto T, Osamura Y, Aihara Y, Yokota S (2003)** Selective insufficiency of IFN-gamma secretion in patients with hyper-IgE syndrome. *Allergy*. 2003 Apr; 58(4):329-336.
- Itoh S, Udagawa N, Takahashi N, Yoshitake F, Narita H, Ebisu S, Ishihara K (2006)** A critical role for interleukin-6 family-mediated Stat3 activation in osteoblast differentiation and bone formation. *Bone*. 2006 Sep; 39(3):505-12.
- Iwasaki A, Medzhitov R (2004)** Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat Immunol*. 2004 Oct;5(10):987-95.
- Jacobson NG, Szabo SJ, Weber-Nordt RM, Zhong Z, Schreiber RD, Darnell JE Jr, Murphy KM (1995)** Interleukin 12 signaling in T helper type 1 (Th1) cells involves tyrosine phosphorylation of signal transducer and activator of transcription (Stat)3 and Stat4. *J Exp Med*. 1995 May 1;181(5):1755-62.
- Janeway CA Jr, Medzhitov R (2002)** Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol*. 2002; 20:197-216.
- Jeppson JD, Jaffe HS, Hill HR (1991)** Use of recombinant human interferon gamma to enhance neutrophil chemotactic responses in Job syndrome of hyperimmunoglobulinemia E and recurrent infections. *J Pediatr*. 1991 Mar; 118(3):383-7.
- Jung T, Schauer U, Heusser C, Neumann C, Rieger C (1993)** Detection of intracellular cytokines by flow cytometry. *J Immunol Methods*. 1993 Feb 26;159(1-2):197-207.
- Kaisho T, Akira S (2006)** Toll-like receptor function and signaling. *J Allergy Clin Immunol*. 2006 May; 117(5):979-87.
- Kawai T, Akira S (2006)** TLR signaling. *Cell Death Differ*. 2006 May; 13(5):816-25.
- King CL, Gallin JI, Malech HL, Abramson SL, Nutman TB (1989)** Regulation of immunoglobulin production in hyperimmunoglobulin E recurrent-infection syndrome by interferon gamma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989 Dec; 86(24):10085-9.

- Kisseleva T, Bhattacharya S, Braunstein J, Schindler CW (2002)** Signaling through the JAK/STAT pathway, recent advances and future challenges. *Gene*. 2002 Feb 20;285(1-2):1-24.
- Kwak DJ, Augustine NH, Borges WG, Joyner JL, Green WF, Hill HR (2000)** Intracellular and extracellular cytokine production by human mixed mononuclear cells in response to group B streptococci. *Infect Immun*. 2000 Jan;68(1):320-7.
- Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart JM, Hoffmann JA (1996)** The dorsoventral regulatory gene cassette spätzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell*. 1996 Sep 20; 86(6):973-83.
- Levy DE, Lee CK (2002)** What does Stat3 do? *J Clin Invest*. 2002 May; 109(9):1143-8.
- Lorenz E, Mira JP, Cornish KL, Arbour NC, Schwartz DA (2000)** A novel polymorphism in the toll-like receptor 2 gene and its potential association with staphylococcal infection. *Infect Immun*. 2000 Nov;68(11):6398-401.
- Martinez AM, Montoya CJ, Rugeles MT, Franco JL, Patino PJ (2004)** Abnormal expression of CD54 in mixed reactions of mononuclear cells from hyper-IgE syndrome patients. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2004 Mar;99(2):159-165.
- Medzhitov R, Janeway CA Jr. (1997a)** Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Curr Opin Immunol*. 1997 Feb; 9(1):4-9.
- Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA Jr. (1997b)** A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature*. 1997 Jul 24; 388(6640):394-7.
- Milner JD, Brenchley JM, Laurence A, Freeman AF, Hill BJ, Elias KM, Kanno Y, Spalding C, Elloumi HZ, Paulson ML, Davis J, Hsu A, Asher AI, O'Shea J, Holland SM, Paul WE, Douek DC (2008)** Impaired T(H)17 cell differentiation in subjects with autosomal dominant hyper-IgE syndrome. *Nature*. 2008 Apr 10;452(7188):773-6.
- Minegishi Y, Saito M, Tsuchiya S, Tsuge I, Takada H, Hara T, Kawamura N, Ariga T, Pasic S, Stojkovic O, Metin A, Karasuyama H (2007)** Dominant-negative mutations in the DNA-binding domain of STAT3 cause hyper-IgE syndrome. *Nature*. 2007 Aug 30;448(7157):1058-62.

- Montoya CJ, Lopez JA, Velilla PA, Rugeles C, Patino PJ, Garcia de Olarte DM (2003)** Evaluation as a function of granulocytes in hyperimmunoglobulinemia E syndrome with recurrent infections. *Biomedica* 2003 Mar;23(1):60-76.
- Motley D, Meyer MP, King RA, Naus GJ (1996)** Determination of lymphocyte immunophenotypic values for normal full-term cord blood. *Am J Clin Pathol.* 1996 Jan;105(1):38-43.
- Munder M, Mallo M, Eichmann K, Modolell M (1998)** Murine macrophages secrete interferon gamma upon combined stimulation with interleukin (IL)-12 and IL-18: A novel pathway of autocrine macrophage activation. *J Exp Med.* 1998 Jun 15;187(12):2103-8.
- Nester TA, Wagnon AH, Reilly WF, Spitzer G, Kjeldsberg CR, Hill HR (1998)** Effects of allogeneic peripheral stem cell transplantation in a patient with job syndrome of hyperimmunoglobulinemia E and recurrent infections. *Am J Med.* 1998 Aug; 105(2):162-4.
- Netea MG, Schneeberger PM, de Vries E, Kullberg BJ, van der Meer JW, Koolen MI (2002)** Th1/Th2 cytokine imbalance in a family with hyper-IgE syndrome. *Neth J Med.* 2002 Oct; 60(9): 349-353.
- Netea MG, Kullberg BJ, van der Meer JW (2005)** Severely impaired IL-12 / IL-18 / IFNgamma axis in patients with hyper IgE syndrome. *Eur J Clin Invest.* 2005 Nov;35(11):718-721.
- Nishihara M, Ogura H, Ueda N, Tsuruoka M, Kitabayashi C, Tsuji F, Aono H, Ishihara K, Huseby E, Betz UA, Murakami M, Hirano T (2007)** IL-6-gp130-STAT3 in T cells directs the development of IL-17+ Th with a minimum effect on that of Treg in the steady state. *Int Immunol.* 2007 Jun;19(6):695-702.
- Ohga S, Nomura A, Ihara K, Takahata Y, Suga N, Akeda H, Shibata R, Okamura J, Kinukawa N, Hara T (2003)** Cytokine imbalance in hyper-IgE syndrome: reduced expression of transforming growth factor beta and interferon gamma genes in circulating activated T cells. *Br J Haematol.* 2003 Apr;121(2):324-331.
- Paganelli R, Scala E, Capobianchi MR, Fanales-Belasio E, D'Offizi G, Fiorilli M, Aiuti F (1991)** Selective deficiency of interferon-gamma production in the hyper-IgE syndrome. Relationship to in vitro IgE synthesis. *Clin Exp Immunol.* 1991 Apr;84(1):28-33.

- Panopoulos AD, Zhang L, Snow JW, Jones DM, Smith AM, El Kasmi KC, Liu F, Goldsmith MA, Link DC, Murray PJ, Watowich SS (2006)** STAT3 governs distinct pathways in emergency granulopoiesis and mature neutrophils. *Blood*. 2006 Dec 1;108(12):3682-90.
- Prussin C, Metcalfe DD (1995)** Detection of intracytoplasmic cytokine using flow cytometry and directly conjugated anti-cytokine antibodies. *J Immunol Methods*. 1995 Dec 15;188(1):117-128.
- Prussin C (1997)** Cytokine flow cytometry: understanding cytokine biology at the single-cell level. *J Clin Immunol*. 1997 May;17(3):195-204.
- Renner ED (2002a)** 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) *Mediz. Dissertation München*
- Renner ED, Belohradsky BH, Grimbacher B (2002b)** Hyper-IgE-Syndrom. *Monatsschr Kinderheilkd* 150 :1168 - 1179.
- Renner ED, Puck JM, Holland SM, Schmitt M, Weiss M, Frosch M, Bergmann M, Davis J, Belohradsky BH, Grimbacher B (2004)** Autosomal recessive hyperimmunoglobulin E syndrome: a distinct disease entity. *J Pediatr*. 2004 Jan;144(1):93-99.
- Renner ED, Pawlita I, Hoffmann F, Hornung V, Hartl D, Albert M, Jansson A, Endres S, Hartmann G, Belohradsky BH, Rothenfusser S (2005)** No indication for a defect in toll-like receptor signaling in patients with hyper-IgE syndrome. *J Clin Immunol*. 2005 Jul;25(4):321-8.
- Renner ED, Torgerson TR, Rylaarsdam S, Anover-Sombke S, Golob K, LaFlam T, Zhu Q, Ochs HD (2007)** STAT3 mutation in the original patient with Job's syndrome. *N Engl J Med*. 2007 Oct 18;357(16):1667-8.
- Renner ED, Rylaarsdam S, Anover-Sombke S, Rack AL, Reichenbach J, Carey JC, Zhu Q, Jansson AF, Barboza J, Schimke LF, Leppert MF, Getz MM, Seger RA, Hill HR, Belohradsky BH, Torgerson TR, Ochs HD (2008)** Novel signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) mutations, reduced T(H)17 cell numbers, and variably defective STAT3 phosphorylation in hyper-IgE syndrome. *J Allergy Clin Immunol*. 2008 Jul;122(1):181-7.

- Rodriguez MF, Patino PJ, Montoya F, Montoya CJ, Sorensen RU, Garcia de Olarde D (1998)** Interleukin 4 and interferon-gamma secretion by antigen and mitogen-stimulated mononuclear cells in the hyper-IgE syndrome: no TH-2 cytokine pattern. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 1998 Nov;81(5 Pt 1):443-447.
- Roeder A, Kirschning CJ, Rupec RA, Schaller M, Korting HC (2004)** Toll-like receptors and innate antifungal responses. *Trends Microbiol.* 2004 Jan;12(1):44-9.
- Schimke LF (in Vorbereitung)** Phänotypische und genotypische Differenzierung von Patienten mit autosomal-dominantem Hyper-IgE-Syndrom (HIES) und Patienten mit milder HIES-Variante *Mediz. Dissertation* München
- Severgnini M, Takahashi S, Roza LM, Homer RJ, Kuhn C, Jhung JW, Perides G, Steer M, Hassoun PM, Fanburg BL, Cochran BH, Simon AR (2004)** Activation of the STAT pathway in acute lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2004 Jun;286(6):L1282-92.
- Shirafuji Y, Matsuura H, Sato A, Kanzaki H, Katayama H, Arata J (1999)** Hyperimmunoglobulin E syndrome: a sign of TH1/TH2 imbalance? *Eur J Dermatol.* 1999 Mar;9(2):129-131.
- Simon D, Braathen LR, Simon HU (2004)** Eosinophils and atopic dermatitis. *Allergy.* 2004 Jun; 59(6):561-70.
- Slack JL, Schooley K, Bonnert TP, Mitcham JL, Qwarnstrom EE, Sims JE, Dower SK (2000)** Identification of two major sites in the type I interleukin-1 receptor cytoplasmic region responsible for coupling to pro-inflammatory signaling pathways. *Biol Chem.* 2000 Feb 18; 275(7):4670-8.
- Sugimoto N, Nakahira M, Ahn HJ, Micallef M, Hamaoka T, Kurimoto M, Fujiwara H (2003)** Differential requirements for JAK2 and TYK2 in T cell proliferation and IFN-gamma production induced by IL-12 alone or together with IL-18. *Eur J Immunol.* 2003 Jan;33(1):243-51.
- Takeuchi O, Hoshino K, Akira S (2000)** Cutting edge: TLR2-deficient and MyD88-deficient mice are highly susceptible to *Staphylococcus aureus* infection. *J Immunol.* 2000 Nov 15;165(10):5392-6.

- Trinchieri G (1995)** Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity. *Annu Rev Immunol.* 1995;13:251-76.
- Trinchieri G (2007)** Interleukin-10 production by effector T cells: Th1 cells show self control. *J Exp Med.* 2007 Feb 19;204(2):239-43.
- Van Scoy RE, Hill HR, Ritts RE, Quie PG (1975)** Familial neutrophil chemotaxis defect, recurrent bacterial infections, mucocutaneous candidiasis, and hyperimmunoglobulinemia E. *Ann Intern Med.* 1975 Jun;82(6):766-71.
- Vercelli D, Jabara HH, Cunningham-Rundles C, Abrams JS, Lewis DB, Meyer J, Schneider LC, Leung DY, Geha RS (1990)** Regulation of immunoglobulin (Ig)E synthesis in the hyper-IgE syndrome. *J Clin Invest.* 1990 May;85(5):1666-1671.
- Wakim M, Alazard M, Yajima A, Speights D, Saxon A, Stiehm ER (1998)** High dose intravenous immunoglobulin in atopic dermatitis and hyper-IgE syndrome. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 1998 Aug; 81(2):153-8.
- Yang XO, Panopoulos AD, Nurieva R, Chang SH, Wang D, Watowich SS, Dong C (2007)** STAT3 regulates cytokine-mediated generation of inflammatory helper T cells. *J Biol Chem.* 2007 Mar 30;282(13):9358-63.
- Yeganeh M, Henneke P, Rezaei N, Ehl S, Thiel D, Matamoros N, Pietrogrande C, Espanol T, Litzman J, Franco JL, Sanal O, Kilic SS, Breborowicz A, Plebani A, Renner E, Rothenfusser S, Hawn TR, Woellner C, Grimbacher B (2008)** Toll-like receptor stimulation induces higher TNF-alpha secretion in peripheral blood mononuclear cells from patients with hyper IgE syndrome. *Int Arch Allergy Immunol.* 2008;146(3):190-4.
- Yoshimoto T, Takeda K, Tanaka T, Ohkusu K, Kashiwamura S, Okamura H, Akira S, Nakanishi K (1998)** IL-12 up-regulates IL-18 receptor expression on T cells, Th1 cells, and B cells: synergism with IL-18 for IFN-gamma production. *J Immunol.* 1998 Oct 1;161(7):3400-7.
- Zhang Z, Welte T, Troiano N, Maher SE, Fu XY, Bothwell AL (2005)** Osteoporosis with increased osteoclastogenesis in hematopoietic cell-specific STAT3-deficient mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005 Mar 18;328(3):800-7.

8. ABKÜRZUNGEN

Chemokine	Chemotactic Cytokines
CBA	Cytometric Bead Array
CNTF	Ciliary Neurotrophic Factor
CpG	Cytosin-phosphatidyl-Guanosin
CSF	Colony Stimulating Factor
DNA	Deoxyribonucleic Acid (= Desoxyribonukleinsäure)
EGF	Epidermal Growth Factor
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FCS	Fetal Calf Serum (= fetales Kälberserum)
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
GM-CSF	Granulocyte Makrophage Colony Stimulating Factor
HIES	Hyper-IgE-Syndrom
HIV	Human Immunodeficiency Virus
IgE	Immun(o)globulin E
IL	Interleukin
INF	Interferon
IRAK	Interleukin-1 Receptor Associated Kinase
JAK	Janus Kinase
LIF	Leukemia Inhibitor Factor

LMU	Ludwig-Maximilians-Universität
LPS	(bakterielles) Lipopolysaccharid
MHC	Major Histocompatibility Complex
MyD88	Myeloid Differentiation Primary Response Protein 88
NIH	National Institutes Of Health
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NO	Stickstoffmonoxid
OMIM	Online Mendelian Inheritance in Man
OSM	Oncostatin M
PAMP	Pathogen Associated Molecular Patterns
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cell
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin Chlorophyll Protein
PMA	Phorbol 12-Myristate 13-Acetate
PRR	Pattern Recognition Receptors
RNA	Ribonucleic Acid (= Ribonukleinsäure)
SD	Standard Deviation (= Standardabweichung)
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription
T_H1-Zellen	T-Helfer-Lymphozyten Typ 1
TIRAP	TIR-Domain-Containing Adapter Protein
TLR	Toll-like Rezeptor(en)
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor

TRAM	Trif-Related Adapter Molecule
Trif	TIR-Domain-Containing Adapter Inducing IFN- β
TYK	Tyrosin Kinase

9. Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name	Ingo Roland Pawlita
Geburtsdatum	03.01.1979
Geburtsort	Aachen
Eltern:	Dr. Ing. Peter Pawlita, Ingenieur Ingrid Pawlita, Lehrerin

Ausbildung

1985 – 1989	Besuch der Grundschule am Schererplatz München
1989 – 1998	Besuch des Karlsgymnasiums München
1999 – 2005	Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München November 2005: 3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
2005 – 2006	Promotionsstudium im Fach Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München
seit August 2006	Assistenzarzt im Dr. von Haunerschen Kinderspital der Ludwig-Maximilians-Universität München