Universitätsklinikum Ulm

Klinik für Kinder- und Jugendmedizin

Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. med. K.-M. Debatin

Präsentation, Therapie und Outcome von Patienten mit ZAP-70 Defekt. Eine retrospektive Single-center Analyse.

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

vorgelegt von

Philipp Friederichsen

aus Düsseldorf

2022

Amtierender Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Wirth

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Manfred Hönig
2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Ramin Lotfi

Tag der Promotion: 19.10.2023

Inhaltsverzeichnis

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen ……..V

1 Einleitung 1

1.1 Kombinierte Immundefekte 2

1.2 Funktion und Morphologie der T-Lymphozyten 4

1.3 Der T-Zell-Rezeptor und seine Funktion 6

1.4 Normale T-Zellentwicklung im Thymus 8

1.5 ZAP-70 Defekt 10

1.5.1 Pathologische T-Zellentwicklung im Thymus bei ZAP-70 Defekt 11

1.5.2 Genese der humoralen und zellulären Immundefizienz bei ZAP-70 Defekt. 14

1.5.3 ZAP-70 knock-out Maus 15

1.5.4 Diagnostik 16

1.5.5 Therapie 17

1.6 Prinzip der Stammzelltransplantation 17

1.6.1 Besonderheiten der Stammzelltransplantation bei schwerem kombiniertem Immundefekt 19

1.7 SCID-Neugeborenen-Screening 21

1.8 Fragestellung 22

2 Patienten, Material und Methoden 24

2.1 Studiendesign 24

2.2 Patienten 24

2.3 Datenerhebung 25

2.3.1 Immunphänotypisierung in der Durchflusszytometrie 25

2.3.2 Chimärismusanalyse 27

2.4 TREC-Untersuchung 29

2.4.1 Probengewinnung 29

2.4.2 DNA-Extraktion aus Patientenproben 29

2.4.3 Quantitative PCR 30

2.4.4 Einordnung der Messergebnisse 31

2.5 Auswertung 31

3 Ergebnisse 32

3.1 Klinische Befunde zum Diagnosezeitpunkt 32

3.2 Immunologische Befunde zum Diagnosezeitpunkt 33

3.3 Genetische Befunde 35

3.4 Überleben der Patienten 38
3.5 Details der hämatopoetischen Stammzelltransplantation 38
3.6 Toxizität und Graft versus Host Disease 41
3.7 Immunologische Rekonstitution nach HSZT 42
3.8 Klinische Entwicklung der überlebenden Patienten nach HSZT 44
4 Diskussion 46
4.1 Klinische Präsentation 46
4.2 Immunologische Präsentation 48
4.3 Befunde zur Familienanamnese 50
4.4 Genetische Befunde zum Diagnosezeitpunkt 50
4.5 Hämatopoetische Stammzell-Transplantation 51
4.6 Immunologische Rekonstitution nach HSZT 53
4.6.1 Klinische Entwicklung nach HSZT 55
4.7 TREC-Screening 56
4.8 Einordnung des ZAP-70 Defektes 57
5 Zusammenfassung 59
6 Literaturverzeichnis 61
7 Anhang 66
7.1 TREC-Messung 66
8 Danksagung 67
9 Lebenslauf 68

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

AA no: Aminoacid number

AG: Antigen

AG Kulozik: Arbeitsgemeinschaft Kulozik

APC: Antigen-presenting cells

ATG: Anti-Thymozyten-Globulin

BU: Busulfan

CD: Cluster of Differentiation

CID: combined immunodeficiency

CK: Kreatinkinase

CMV: Cytomegalievirus

CSA: Cyclosporin A

C-SH2: carboxy-terminal SH2 domain

CTL: Cytotoxische Zelle

CT-Wert; cycle-threshold-Wert

DNA: Desoxyribonukleinsäure

FACS: flourescence-activated cell sorting

FISH: Flourescence-in-situ-Hybridisierung

FLU: Fludarabin

FYN: fibroblast yes-related non receptor kinase

GVHD: Graft versus Host Disease

HLA: humanes Leukozytenantigensystem

HSZT: hämatopoetische Stammzelltransplantation

I-A: interdomain A

I-B: interdomain B

IG: Immunglobulin

IL: Interleukin

ILR: Interleukin-Rezeptor

IUIS: International Union of Immunological Societies

KM: Knochenmark

KREC: kappa deleting recombination excision circles

LCK: lymphocyte-specific protein-tyrosine kinase

MEPH: Melphalan

MFD: matched family donor

MHC: Major histocompatibility complex

MMF: Mycophenolatmofetil

MMFD: mismatched family donor

MMR: Mumps Masern Röteln

MO: Alter in Monate

MUD: matched unrelated donor

NFAT: nuclear factor of activated T-cells

NFκB: nuclear factor of kappa light chain gene enhancer in B-cells

NK-Zellen: natürliche Killerzellen

ND: nicht durchgeführt

N-SH2: n-terminal SH2 Domain

PCR: Polymerase Kettenreaktion

PBSC: peripheral blood stem cell

PIDTC: Primary immune deficiency treatment consortium

PHA: Phytohemagglutinin

PKC: Proteinkinase C

PMA: Phorbol-myrisat-acetat

PRÄTCR: Prä-T-Zell-Rezeptor

PTK: Protein-Tyrosin-Kinase

ROC: Receiver operating characteristic

SCID: severe combined immunodeficiency

STR: short-tandem-repeat

SYK: spleen tyrosine kinase

TCR: T-Zell-Rezeptor

TNF: Tumornekrosefaktor

TREO: Treosulfan

TT: Thiotepa

TREC: T-cell receptor excision circles

UPN: unique personal number Universitätsklinik Ulm

1 Einleitung

Das Immunsystem des Menschen ist auf unspezifischen und spezifischen Abwehrmechanismen aufgebaut. Einzeln, tatsächlich aber meist gemeinsam bekämpfen sie infektiöse Erreger und sind somit verantwortlich für den Schutz vor Infektionen. Die unspezifischen Mechanismen werden von der Haut-Schleimhautbarriere, der Phagozytose und dem Komplementsystem gebildet. Dem gegenüber steht die spezifische Abwehr, repräsentiert durch B- und T-Zellen. Die B-Zellen produzieren Antikörper und stellen die spezifische humorale Immunantwort dar. Die spezifische zelluläre Immunantwort wird durch die zytotoxischen T-Zellen ausgeführt. Essentielles Bindeglied zwischen beiden Systemen sind die T-Helferzellen die mit Hilfe von Zytokinen und Zell-Zell-Kontakten sowohl B- als auch zytotoxische T-Zellen stimulieren. Betrachtet man den Ablauf der spezifischen Immunantwort wird die zentrale Bedeutung der T-Helferzellen deutlich. Körperfremde Antigene werden durch antigenpräsentierende Zellen (APC) aufgenommen, intrazellulär verarbeitet und mittels MHC Molekülen auf der Oberfläche exprimiert. Die APC interagiert nun mit einer T-Helferzelle. Die T-Helferzelle bindet mit einem für das Antigen spezifischen T-Zell Rezeptor das fremde Antigen und aktiviert nun über Zytokine sowohl die B-Zellen (humorale Immunantwort) als auch zytotoxische T-Zellen (zelluläre Immunantwort) (Wahn u. a. 2005; Murphy u. a. 2014). Die Interaktion einer T-Helferzelle mit B-Zellen ist somit essentiell für eine spezifische humorale Immunantwort.

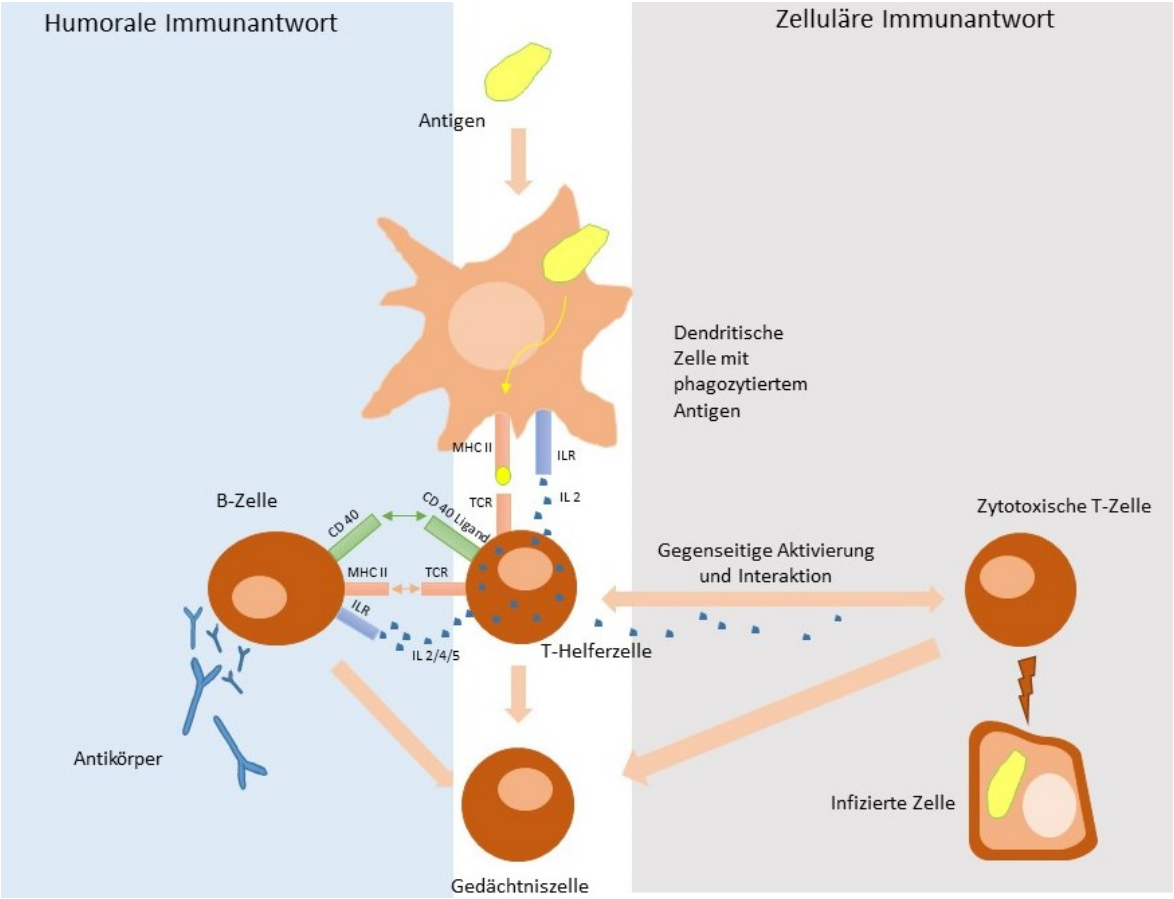


Abbildung 1.: Schematische Darstellung der humoralen und zellulären Immunantwort, Universitätsklinikum Ulm. (TCR, T-cell-receptor; ILR, Interleukin-receptor; IL, Interleukin; MHC, major histocompatibilty complex, (Nach (Murphy u. a. 2014))

Ist dieser Ablauf an einer oder mehreren Stellen gestört, ist die Immunantwort unzureichend, und es kann das Bild eines Immundefektes entstehen. Der ZAP-70 Defekt als Thema dieser Arbeit erfordert eine genauere Betrachtung der kombinierten Immundefekte.

1.1 Kombinierte Immundefekte

Angeborene Immundefekte werden durch Keimbahnmutationen, die zu einem Funktionsverlust oder -gewinn des kodierten Proteins führen, hervorgerufen.

Sie können dominant oder rezessiv sein, autosomal oder X-chromosomal und mit vollständiger oder unvollständiger Penetranz auftreten. Klinisch präsentieren sich Patienten mit einer erhöhten Anfälligkeit für Infektionskrankheiten und/oder mit einem breiten Spektrum von autoimmunen, autoinflammatorischen, allergischen oder malignen Krankheitsbildern. Derzeit gibt es 406 verschiedene Erkrankungen mit 430 verschiedenen Gendefekten welche in der Klassifikation der International Union of Immunological Societies (IUIS) aus dem Jahre 2019 aufgelistet sind. Dabei werden die Immundefekte in insgesamt 10 Gruppen aufgeteilt (Bousfiha u. a. 2020).

Tabelle 1.: Einteilung der Immundefekte nach IUIS; (PID, primary immunodeficiency disorder; Nach (Bousfiha u. a. 2020))

Einteilung der Immundefekte nach IUIS (2019)
1. Immunodeficiencies affecting cellular and humoral immunitiy a) Severe combined immunodeficiencies (SCID), defined by CD3 lymphopenia b) Combined immunodeficiencies (CID), generally less profound than SCID
2. CID with associated or syndromic features
3. Predominantly antibody deficiencies
4. Diseases of immune dysregulation
5. Congenital defects of phagocyte number of function, or both
6. Defects in intrinsic and innate immunity
7. Autoinflammatory disorders
8. Complement deficiencies
9. Bone marrow failure
10. Phenocopies of PID

Kombinierte Immundefekte sind per Definition Immundefekte, bei denen sowohl die spezifische zelluläre als auch die humorale Immunantwort betroffen sind.

Bei schweren kombinierten Immundefekten (severe combined immunodeficiency, SCID) ist die Zell-Zahl der T-Zellen entweder deutlich reduziert oder aber die Funktion der vorhandenen T-Zellen ist stark eingeschränkt. Die B-Zell Funktion ist, selbst bei regelrechter Entwicklung dieser Zellen, aufgrund der der ausbleibenden Aktivierung durch die T-Zellen relevant kompromittiert (Bousfiha u. a. 2020). Betroffene Patienten präsentieren sich mit rezidivierenden und ungewöhnlich schweren Infektionen und zeigen eine erhöhte Anfälligkeit für opportunistische Infektionen (Picard u. a. 2009). Häufige Erreger dieser opportunistischen Infektionen sind CMV oder Pneumocystis jiroveci (Mackay, Rosen, und Buckley 2000; A. Fischer 2000). Häufig tritt eine Gedeihstörung als klinisches Zeichen hinzu. Ohne eine zelluläre Therapie wie z.B. einer HSZT versterben die Patienten in den ersten Lebensmonaten. Die Häufigkeit des Auftretens wird aktuell 1:58 000 geschätzt (Kobrynski 2021).

Bei kombinierten Immundefekten (combined immunodeficiency, CID) ist trotz eines Mangels eine Restfunktion der T-Zellen erhalten, sodass die Patienten meist erst später erkranken und insgesamt weniger schwere Verläufe zeigen. Die erhaltene Restfunktion der T-Zellen ermöglicht eine Aktivierung der B-Zellen und somit eine humorale Immunantwort (Bousfiha u. a. 2020).

1.2 Funktion und Morphologie der T-Lymphozyten

T-Lymphozyten sind mobile Zellen im Organismus, die sensibel auf pathologische Oberflächenveränderungen von Körperzellen reagieren. Auf ihrer Oberfläche exprimieren sie den TCR-CD3 Rezeptorkomplex.

In Ihrer Entwicklung durchlaufen sie verschiedene Stationen in Knochenmark und anschließend im Thymus. Sie sind sowohl für die Stimulation von B-Zellen, als auch für die zellvermittelte spezifische Immunität verantwortlich,

indem sie ihre Zielantigene über T-Zell-Rezeptoren an der Oberfläche in Verbindung mit MHC-/HLA-Molekülen erkennen (Wahn u. a. 2005). Proteinsequenzen von fremdartigen Substanzen werden mittels eines MHC I- oder MHC II – Proteinkomplexes auf der Zelloberfläche der APC präsentiert. Dabei exprimiert ein überwiegender Anteil der kernhaltigen Zellen den MHC I Proteinkomplex. MHC II findet sich auf antigenpräsentierenden Zellen wie Makrophagen, Monozyten, dendritischen Zellen und B-Zellen (Murphy u. a. 2014). Diese Proteinkomplexe können in Verbindung mit den MHC-Molekülen von T-Lymphozyten per Schlüssel-Schloss-Prinzip erkannt werden. Findet gleichzeitig eine Co-Stimulanz durch weitere Oberflächenproteine, Co-Rezeptoren oder Zytokine statt, kommt es zu einer Aktivierungskaskade und die T- Zelle wird aktiviert.

Neben der Aktivierung führt die Bindung des TCRs an einen MHC-Protein-Komplex auch zur Differenzierung in weitere Subpopulationen der CD4 positiven Zellen. Diese Differenzierung wird durch co-stimulatorische Begleitfaktoren und die Gewebslokalisation der Aktivierung zielgerichtet beeinflusst. Dies führt zur Bildung verschiedener T-Zelltypen von T-Zellen mit unterschiedlichen spezialisierten Funktionen. Effektor T-Zellen bekämpfen Krankheitserreger bei der ersten Exposition; Gedächtnis-T-Zellen ermöglichen Schutz vor zukünftigen Infektionen. CD4+ T-Zellen können sich in spezialisierte Effektor Subtypen differenzieren, darunter T-Helfer Typ 1 (Th1), Th2, Th17, follikuläre T-Helferzellen und regulatorische T-Zellen. Diese Subtypen regulieren die Immunreaktion um verschiedene Arten von Krankheitserregern gezielt bekämpfen zu können. Dabei interagieren sie über Zytokine und Oberflächenproteine mit Makrophagen und B-Lymphozyten und anderen Zellen der spezifischen und unspezifischen Immunfunktion. Der Prozess der Ausdifferenzierung spezifischer T-Zell-Subtypen resultiert in einer Feinabstimmung des Immunsystems mit gleichzeitigem Schutz vor

unangemessener, möglichweise überschießender Aktivierung (Hwang u. a. 2020).

Cytotoxische T-Zellen (CTL) sind durch ein CD8-Molekül gekennzeichnet. Sie patrouillieren durch den Körper und sind in der Lage infizierte körpereigene Zellen zu erkennen. Wird der T-Zell-Rezeptor (TCR) auf ihrer Oberfläche durch eine von Krankheitserregern befallenen Zelle aktiviert, schüttet die CTL Perforine und Granzyme aus, die die Zielzelle töten. Ein weiterer Mechanismus zum Abtöten der Zielzelle ist das Auslösen eines programmierten Zelltodes (Apoptose) durch die CTL (Rocha und Tanchot 2004).

1.3 Der T-Zell-Rezeptor und seine Funktion

Die präzise Regulierung des T-Zell-Aktivierungsprozesses ist von entscheidender Bedeutung für eine „ausgeglichene“ Immunantwort (Courtney, Lo, und Weiss 2018).

Die Aktivierung von T-Zellen erfordert extrazelluläre stimulierende Signale, die hauptsächlich durch T-Zell-Rezeptor-Komplexe (TCR) empfangen und über verschiedene Signalwege weitergeleitet werden. Der TCR erkennt Antigene auf MHC-Komplexen unter Mitwirkung von CD4- oder CD8- Co-Rezeptoren (Shah u. a. 2021). Darüber hinaus greifen Membranproteine, wie das Lymphozytenfunktion-assoziierte Antigen 1, regulierend in die Aktivierung der T-Zellen über den TCR ein (Hwang u. a. 2020). Der T-Zell Rezeptor besteht aus TCR α/β-Ketten und dem CD3 Komplex mit heteromeren γ-, δ-, ε-, und ζ- Untereinheiten. Der CD3-Rezeptorkomplex fungiert als Signalüberträger und vermittelt das durch den TCR ausgelöste Signal über Immunrezeptor-Tyrosin-basierte Aktivierungsmoleküle (ITAMs). Dabei werden die ITAMs in Reaktion auf ihre Bindung an den TCR durch Proteintyrosinkinasen (PTKs) phosphoryliert welche nun anderen Effektor-

Molekülen ermöglichen mit dem TCR-Rezeptor-Komplex zu interagieren und somit die weiter unten aufgeführten Signalübertragungswege zu initiieren (Hwang u. a. 2020; Shah u. a. 2021). PTKs spielen somit bei der Signal-Übertragung des T-Zell Rezeptors eine zentrale Rolle. Dabei sind vor allem PTKs der SRC-Familie wie LCK und FYN und die PTKs der SYK-Familie inklusive ZAP-70 involviert (Halkias u. a. 2014; Hwang u. a. 2020; Shah u. a. 2021). Aktiviertes LCK oder FYN, phosphoryliert die ITAMs an den oben beschriebenen CD3 -Untereinheiten. Die Phosphorylierung von CD3ζ ergibt eine Bindungsstelle für ZAP-70, woraufhin LCK oder FYN ZAP-70 wiederum durch Phosphorylierung aktivieren und an den TCR-Rezeptorkomplex binden. Die Bindung von ZAP-70 an den aktivierten TCR-Komplex führt durch Rekrutierung und Aktivierung von weiteren Proteinen zur Bildung eines Signalkomplexes im Bereich des TCR an der Plasmamembran (Hwang u. a. 2020). Bei der daraus folgenden Signalübertragung sind verschiedene, aktivierende Signalwege involviert; der Ras-extracellular signal-related kinase (ERK)-activator protein (AP)-1 Signalweg, der inositol triphosphat (IP3)-Ca2+ nuclear factor of activated T cells (NFAT) Signalweg, der Proteinkinase C (PKC)θ-IκB Kinase (IKK)-Nuklearfaktor (NFκB) Signalweg und der tuberous sclerosis complex (TSC) mammalian target of rapamycin (mTOR) Signalweg (Courtney, Lo, und Weiss 2018). Diese aktivierenden Signalwege führen zu einer Aktivierung der T-Zelle und somit zu Effekten wie die Transkription von Interleukin-2, die Aktivierung von NfκB, die intrazelluläre Calcium-Freisetzung oder der Aktivierung von Tumorsuppressor-Genen (Shah u. a. 2021). Neben den aktivierenden Signalwegen regulieren inhibierende Signalwege eine überschießende Funktion und führen zu einer „Feinjustierung“ der TCRs (Hwang u. a. 2020).

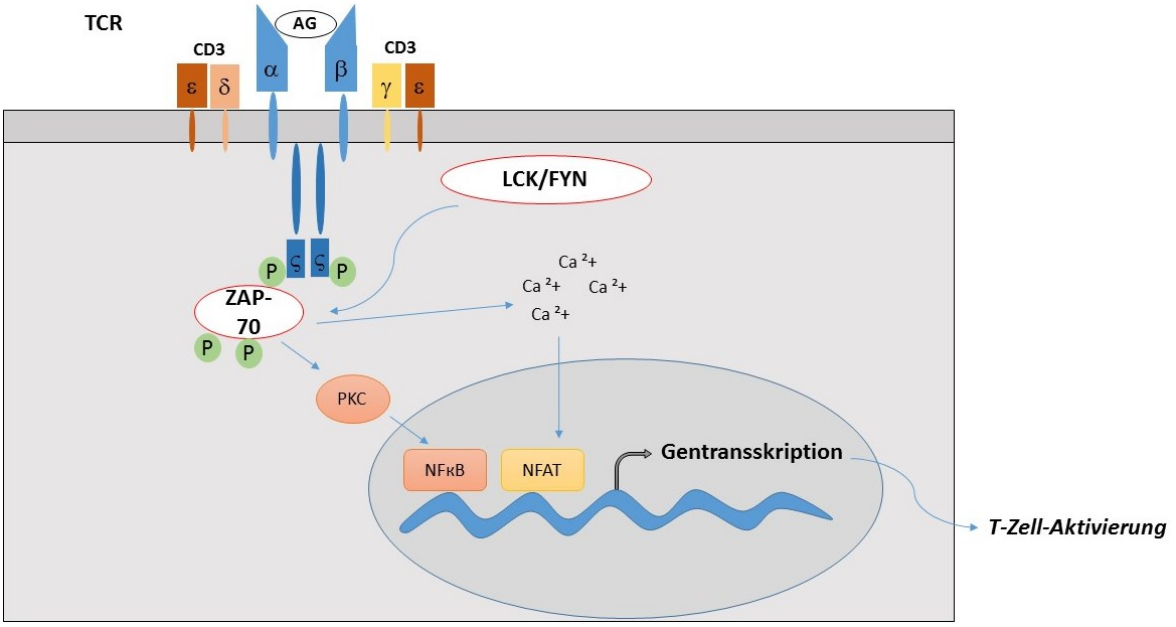


Abbildung 2.: Vereinfachte Darstellung der Signalübertragung des T-Zellrezeptors, Universitätsklinikum Ulm. (Ag, Antigen; TCR, T-Zell Rezeptor; P, Phosphat; PKC, Proteinkinase C; NFAT, nuclear factor of activated t-cells; NFkB, nuklear factor kappa B, nach (Huse 2009))

1.4 Normale T-Zellentwicklung im Thymus

Um die Auswirkungen des ZAP-70 Defektes auf die Reifung der T-Lymphozyten zu verstehen, soll im folgenden Abschnitt eine genauere Betrachtung der regelrechten T-Zellentwicklung im Thymus erfolgen.

Reife T-Lymphozyten entwickeln sich aus Vorläuferzellen, die aus dem Knochenmark in den Thymus eingewandert sind. Den frühesten identifizierbaren T-Zell Vorläufern im Thymus fehlt die Expression von CD4 und CD8, weshalb sie als CD4-CD8- doppelt-negative (DN) Thymozyten bezeichnet werden. DN-Thymozyten durchlaufen eine Reihe von mindestens vier Entwicklungsstadien, die durch die Expression von CD44 und CD25

definiert sind: DN1 (CD44+ CD25-), DN2 (CD44+CD25+), DN3 (CD44-CD25+) und DN4 (CD44-CD25-). Zellen im Stadium DN3 durchlaufen einen Prozess, der als β-Selektion bezeichnet wird. Bei diesem Prozess werden Zellen ausgewählt, die das Gen ihrer TCR-β-Kette produktiv umgebaut haben und somit in Form des prä-TCR einen Komplex mit CD3-Molekülen bilden können. Dieser Komplex führt zum Überleben der Zelle und zur weiteren Differenzierung durch Hochregulierung und Expression von CD4 und CD8. Zellen, die die β-Selektion nicht erfolgreich durchlaufen, sterben durch Apoptose. Nach dem DN-Stadium exprimieren die Thymozyten CD8 und werden zu unreifen einfach-positiven (ISP) CD8+ Thymozyten bevor sie CD4 exprimieren und sich zu CD4+ CD8+ doppelt-positiven (DP) Thymozyten entwickeln (Xiong, Armato, und Yankee 2011). Diese doppelt positiven Thymozyten durchlaufen im Anschluss die positive Selektion. Dabei werden nur Thymozyten weiterentwickelt, die MHC-1 oder MHC-2 Moleküle, welche von kortikalen Thymusepithelzellen exprimiert werden, binden können. Bei Thymozyten die an MHC-1 binden wird im Folgenden die Expression von CD4 unterdrückt. Bei Thymozyten die an MHC-2 binden wir die Expression von CD8 negativ reguliert. Die jetzt einzeln positiven Thymozyten durchlaufen in der Medulla-Region des Thymus im Anschluss die negative Selektion. Dabei werden körpereigene Antigene von medullären Thymusepithelzellen auf MHC-Molekülen präsentiert. T-Zellen die an diese Moleküle binden werden erkannt und apoptotisch eliminiert. Ziel der negativen Selektion ist es die Ausbildung autoreaktiver T-Zellen zu verhindern (Germain 2002; Murphy u. a. 2014; Hwang u. a. 2020). Thymozyten, die die positive und negative Selektion passiert haben verlassen den Thymus als naive T-Zellen.

Die Arbeit von (Wang u. a. 2010) zeigt, dass die intrathymische T-Zellentwicklung besonders von zwei Thyrosinkinasen, ZAP-70 und SYK (spleen thyrosine kinase) abhängig ist. Grundsätzlich gesehen kommt SYK dabei eine hohe Bedeutung im Rahmen der frühen Entwicklungs-Schritte im

thymalen Kortex zu; ZAP-70 reguliert vor allem die spätere Ausdifferenzierung zu einfach positiven Thymozyten sowie, wie oben beschrieben, die TCR-Aktivierung.

Um eine möglichst große Diversifizierung der TCRs und somit die Erkennung von möglichst vielen verschiedenen Antigenen zu ermöglichen kommt es im Rahmen der intrathymischen T-Zell-Entwicklung zu geordneten Rekombinationsereignissen der variablen (V), diversen (D) und Verbindungs- (J) Regionen der TCR-DNA. Dieser Vorgang wird als VDJ-Re-arrangement bezeichnet (Germain 2002). Er betrifft zuerst die somatische DNA, die für die beta-Kette codiert, dann den Genlokus der alpha-Kette. Dieser Prozess mündet in einem vielfältigen Repertoire an T-Zell Rezeptoren und ist ein elementarer Bestandteil der spezifischen zellulären Immunantwort (Murphy u. a. 2014). Im Rahmen des oben beschriebenen Rekombinations-Vorgangs werden DNA-Abschnitte aus der somatischen DNA ausgeschnitten und können als TRECs (T-cell excision circles) in den Zellen gemessen werden (Ribeiro und Perelson 2007).

1.5 ZAP-70 Defekt

Eine genetisch bedingte Variante des kombinierten Immundefektes basiert auf einer autosomal rezessiven Mutation im Gen, das für die intrazellulären Tyrosinkinase ZAP-70 (= Zeta-assoziiertes Protein, Molekulargewicht 70 kD) kodiert. Patienten mit einem Funktionsverlust von ZAP-70 zeigen in der Immunphänotypisierung einen Mangel von CD8+ T-Zellen und das gleichzeitige Vorliegen von funktionseingeschränkten CD4+ T-Zellen im peripheren Blut. Diese CD4+ T-Zellen sind aufgrund des Defekts unfähig, durch eine TCR-abhängige Stimulation aktiviert zu werden (Melissa E. Elder 1997; Wang u. a. 2010).

Die klinische Präsentation von Patienten mit ZAP-70 Defekten ist unspezifisch und kann von anderen SCID-Formen klinisch nicht abgegrenzt werden (Turul u. a. 2009). Die an ZAP-70 Defekt erkrankten Patienten entwickeln in der Regel rezidivierende und atypisch schwere Infektionen des Gastro-Intestinaltrakts, schwere Atemwegsinfektionen, Soor in den ersten Lebensmonaten sowie im weiteren Verlauf Gedeihstörungen. Die meisten Patienten haben dabei einen radiologisch oder sonographisch nachweisbaren Thymus, was die Patienten mit ZAP-70 Defekt von den meisten anderen SCID-Entitäten unterscheidet (Mackay, Rosen, und Buckley 2000; Sharifinejad u. a. 2020).

1.5.1 Pathologische T-Zellentwicklung im Thymus bei ZAP-70 Defekt

Untersucht man Zellen des Thymusgewebes von Patienten mit ZAP70 Defekt, sieht man eine normale Anzahl von doppelt positiven CD4+/CD8+ Thymozyten sowie einfach positiven CD4+ Thymozyten, jedoch kaum CD8+ Thymozyten (Melissa E. Elder 1997; Au-Yeung u. a. 2018). Wie bereits oben erwähnt sind die Proteinkinasen SYK und ZAP-70 an verschiedenen Stationen der intra-thymischen T-Zell-Entwicklung mit unterschiedlicher Gewichtung bezüglich der Funktion beteiligt. SYK reguliert vor allem die „frühen“ Entwicklungsschritte hin zum doppelt-positiven Thymozyten im Kortex des Thymus, ZAP-70 hat seine Hauptfunktion in der Ausdifferenzierung zum einfach positiven Thymozyten in der Medulla-Region (Au-Yeung u. a. 2018). Wie oben beschrieben gibt es während der Entwicklung der T-Zelllinie im Thymus zwei wichtige Kontrollpunkte (Au-Yeung u. a. 2018): 1. Die TCR-β-Selektion während des Stadium DN3, die auf eine gezielt umgestaltete TCR-β-Kette hinausläuft welche sich mit der prä-Tα-Kette paart, um so den prä-TCR zu bilden; und 2. die positive Selektion, die Thymozyten auswählt, die ein

nützliches, auf das körpereigene MHC-Profil beschränktes TCR-Repertoire exprimieren. ZAP-70 und SYK leisten jeweils unterschiedliche, jedoch entscheidende Beiträge zu diesen Entwicklungsschritten. Die relative Gewichtung der ZAP-70- gegenüber der SYK-Expression an diesen beiden Kontrollpunkten wurde in vergleichenden in-vitro Populationsstudien von ZAP-70-negativen und SYK-negativen Knochenmarkzellen in strahlenbehandelten Wirts-Zellen und in fötalen Thymusorgan-Kulturen mit spezifischen Inhibitoren von Syk und ZAP-70 untersucht (Palacios und Weiss 2007; Wang u. a. 2010). Im Stadium der CD4-CD8- doppelt negativen T-Zell Population, die der β-Selektion vorausgeht, zeigte sich kein Unterschied der T-Zell-Populations-Größen zwischen ZAP-70-negtativen und SYK-negativen Zellen. Bei der Betrachtung der T-Zellpopulationen im Stadium anschließend an die TCR-β-Selektion zeigte sich bezüglich der SYK-negativen Zellen eine verminderte Anzahl gegenüber den ZAP-70- negativen Zellen. In ähnlicher Weise führt die Hemmung der katalytischen Aktivität von SYK zu einer größeren Beeinträchtigung bei der β-Selektion im Vergleich zur Hemmung von ZAP-70 allein. Die gleichzeitige Deletion oder Hemmung beider Kinasen führt zu einer nahezu vollständigen Blockade der Entwicklung der T-Zellpopulationen anschließend an die β-Selektion. Die β-Selektion scheint somit stärker von SYK als von ZAP-70 abzuhängen (Hwang u. a. 2020).

Im Gegensatz zur β-Selektion zeigen ZAP-70-negative Zellen gegenüber SYK-negativen Zellen deutlich verringerte Populationen von T-Zellen die die positive Selektion zur einfach positiven T-Zelle durchlaufen haben. ZAP-70 ist somit vor allem an der Ausdifferenzierung zur einfach positiven T-Zelle beteiligt.

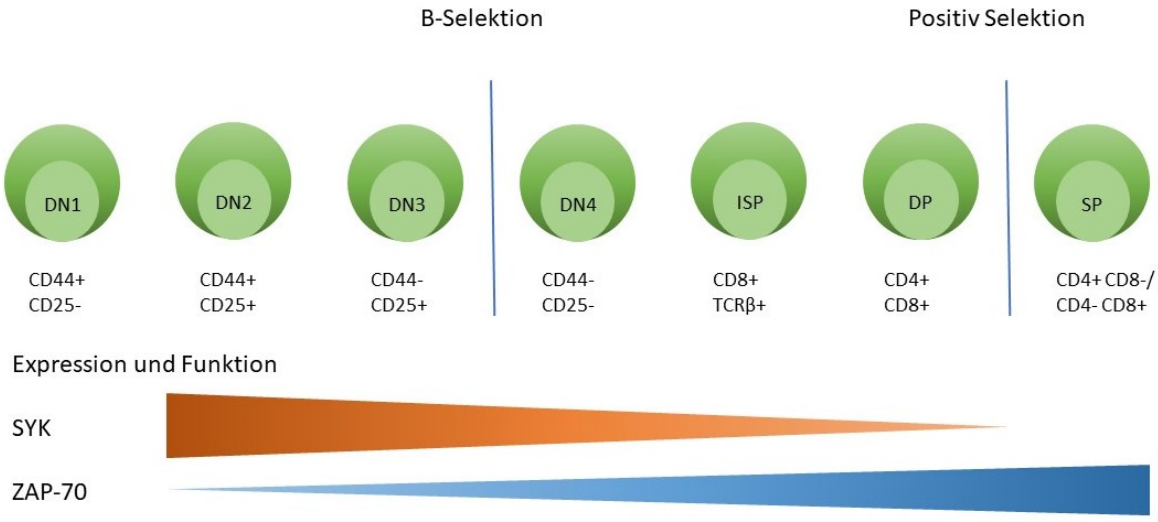


Abbildung 3. Vereinfachte Darstellung der Ausdifferenzierung der CD4-positiven und CD8-positiven T-Zellen, Universitätsklinikum Ulm. (DN, double negativer Thymozyt; ISP, unreifer einfach positiver Thymozyt; DP, doppelt positiver Thymozyt; SP, einfach positiver Thymozyt; TCR, T-Zell-Rezeptor; Nach (Wang u. a. 2010; Hwang u. a. 2020))

Wie in der unten detailliert aufgeführten knock-out-mouse Arbeit von (Negishi u. a. 1995) gezeigt, kommt es bei vollständiger Blockade von ZAP-70 in Mäusen zu einem Stopp der T-Zellentwicklung im Stadium der doppelt positiven Thymozyten. Weder einzeln positive CD4+- noch CD8+-Thymozyten konnten bei den Mäusen nachgewiesen werden. Konträr dazu zeigen sich bei Menschen mit ZAP-70 Defekt meist normale Zellpopulationen von CD4+ Thymozyten bei nicht vorhanden CD8+ Thymozyten-Populationen. (Wang u. a. 2010) untersuchten in ihrer Arbeit das Vorliegen und die Funktion von SYK und ZAP-70 im Thymus. Dabei konnte SYK hauptsächlich im Kortex, dem Ort der T-Zelldifferenzierung bis zum DP-Stadium, aber auch in weitaus geringerer Dichte in der Medulla, wo die Ausdifferenzierung der T-Zellen zum SP-Stadium stattfindet, nachgewiesen werden. Demgegenüber wurde ZAP-70 größtenteils in der Medulla und nur spärlich im Kortex

gefunden. Insgesamt konnte gezeigt werden, dass die beiden Proteinkinasen „überlappend“ in den jeweiligen Regionen des Thymus exprimiert sind. Bei einem Funktionsverlust der Kinase-Aktivität von ZAP-70 in der Medulla-Region kann diese somit zum Teil durch die Kinase-Aktivität von SYK kompensiert werden wodurch die Ausdifferenzierung zum einfach positiven Thymozyten ermöglicht wird. Diese Kompensation zeigt dabei eine deutliche Affinität für die Ausdifferenzierung der CD4+ T-Zellen; die Ursache dieser Affinität bleibt aktuell weiter unklar (Wang u. a. 2010; Au-Yeung u. a. 2018).

1.5.2 Genese der humoralen und zellulären Immundefizienz bei ZAP-70 Defekt

CD4+ T-Zellen durchlaufen bei gesunden Menschen einen weiteren Entwicklungsschritt und indem sie zur IL- produzierenden T-Helferzelle aktiviert werden. Dieser Schritt wird durch das erste Zusammentreffen des T-Zellrezeptors mit einem auf einer APC präsentierten spezifischen Antigen eingeleitet und führt zu einer T-Zellaktivierung. Darauffolgend kommt es zur Expression eines IL-2 Rezeptors mit gleichzeitiger IL-2 Synthese. IL-2 dient jetzt als Stimulanz für andere T-Zellen und löst so eine Aktivierung und Proliferation von T-Helferzellen aus. An dieser TCR-abhängigen T-Zellaktivierung ist ZAP-70, wie oben beschrieben, maßgeblich beteiligt, was zu Folge hat, dass bei einem Defekt von ZAP-70 die Aktivierung der CD4+ T-Zellen ausbleibt und somit keine IL-produzierenden T-Helferzellen entwickelt werden. Der ZAP-70 Defekt hat somit Auswirkungen auf die Funktion der T-Helferzellen auch wenn die intra-thymische Entwicklung, wie oben beschrieben, ohne Signalweitergabe über ZAP-70 zu funktionieren scheint (M. E. Elder 1998; Wang u. a. 2010; Murphy u. a. 2014).

Die T-Helferzellen lassen sich in verschiedene Untergruppen unterteilen und interagieren mit anderen Bestanteilen des Immunsystems. Typ1-Helferzellen

schütten nach Antigenkontakt Zytokine wie IL-2 oder TNF-alpha aus und aktivieren dadurch Makrophagen, die ein bedeutender Bestandteil der zellvermittelten unspezifischen Immunantwort darstellen. Typ2-Helferzellen regulieren die humorale Immunantwort, indem sie mit B-Zellen interagieren und diese über Ausschüttung von IL-2, -4, -8 zur Bildung von Antikörpern anregen (Murphy u. a. 2014).

Durch die fehlende Aktivierung der CD4+-Helferzellen bei Patienten mit ZAP-70 Defekt fehlt ein wesentlicher Bestandteil der gegenseitigen Stimulationsabläufe zwischen T-Zelle und APC. Hierdurch wird der Einfluss des ZAP-70 Defekts sowohl auf die Ausreifung und Funktion von T-Lymphozyten als auch die Funktion der B-Zellen deutlich und zeigt wieso Erkrankungen mit Defekten der T-Zell Aktivierung, wie der ZAP-70 Defekt, letztendlich sowohl den zellulären als auch den humoralen Anteil der spezifischen Immunabwehr betreffen.

1.5.3 ZAP-70 knock-out Maus

Um die Bedeutung der an der Lymphozyten-Reifung beteiligten Tyrosinkinasen im vivo zu verdeutlichen, lohnt sich die Betrachtung des Lymphozytenphänotyps der ZAP-70 knock-out Maus. In dieser Arbeit, von (Negishi u. a. 1995) durchgeführt, wurden Mäuse untersucht, denen das gesamte Gen-Segment für ZAP-70 ausgeschaltet wurde und deshalb kein ZAP-70 Protein bilden konnten. In der immunologischen Untersuchung der Mäuse zeigte sich, dass sie weder einfach-CD8+ noch einfach CD4+ Zellen gebildet. Die intra-thymische Entwicklung wurde durch den Effekt ab dem Stadium CD3+/CD4+/CD8+ geblockt. Dazu ließ sich nach TCR-Stimulation kein intrazellulärer Calcium-Anstieg als Marker für eine funktionierende TCR-abhängige Signaltransduktion feststellen. Diese phänotypischen und funktionalen Defekte der T-Zellen ohne ZAP-70 konnten durch die Expression

von menschlichem ZAP-70 in Mäuse-T-Zellen kompensiert werden. Es zeigte sich im Anschluss die Ausbildung von einfach-CD4+ und einfach-CD8+ T-Zellen. Darüber hinaus erfolge ein intrazellulärer Kalziumanstieg nach TCR-Stimulation.

In der Betrachtung dieses Versuchs zeigt sich ein Kontrast zwischen dem Effekt des ZAP-70 Defekts in Mäusen und Menschen. Im Mausmodell wurde die intra-thymische T-Zell Entwicklung ab dem Stadium des CD3+/CD4+/CD8+ geblockt, beim Menschen mit ZAP-70 Defekt zeigen sich konträr zum Mausmodell normale Zellzahlen für CD4+ T-Zellen im peripheren Blut. Wie bereits oben erwähnt vermuten (Wang u. a. 2010) hier, dass beim Menschen das Fehlen von ZAP-70 im Thymus partiell durch die Proteinkinase SYK kompensiert wird und somit eine Ausdifferenzierung zu CD4+ T-Zellen möglich ist.

1.5.4 Diagnostik

Patienten mit klinischem Verdacht auf einen kombinierten Immundefekt und fehlenden oder reduzierten CD8+ T-Zellen bei vorhandenen CD4+ T-Zellen sind verdächtig auf das Vorliegen eines ZAP-70-Defektes.

Diese Information wird in der sogenannten Immunphänotypisierung gewonnen. Im in vitro Versuch proliferieren die T-Zellen weder auf allogene Antigene, noch auf Mitogene wie PHA oder Antikörper wie anti-CD3 Mab. (Melissa E. Elder 1997; Alain Fischer u. a. 2010).

Da die Signalübertragung des TCR gestört ist, zeigt sich keine reaktive intrazelluläre Calciummobilisation nach TCR-Stimulus. Bei Umgehung und Überbrückung der oben beschriebenen proximalen Schritte der T-Zell Aktivierung mit Phorbol-myristat-acetat (PMA) (PMA: aktiviert

Tyrosinkinasen) und Ionomycin zeigt sich eine regelrechte Proliferation. (M. E. Elder 1998).

Zellzahl und Funktion der NK-Zellen sind bei Patienten mit ZAP-70 Defekt weitgehend normal (Murphy u. a. 2014). Die B-Zellen liegen in normaler Anzahl vor, ihre Funktion ist jedoch sekundär aufgrund der oben genannten Beziehungen mit den T-Helferzellen gestört.

Die Diagnose eines ZAP-70 Defekts wird mit der Sequenzierung des ZAP-70 Gens genetisch bestätigt (Sharifinejad u. a. 2020).

Differentialdiagnostisch sind bei diesem Immunphänotyp z.B. der MHC-1 Defekt und der CD8a-Defekt zu berücksichtigen (Wahn u. a. 2005).

1.5.5 Therapie

Die hämatopoetische Stammzelltransplantation (HSZT) ist die momentan einzig etablierte kurative Therapie für Patienten mit einem angeborenen primären kombinierten Immundefekt (Sharifinejad u. a. 2020). Ziel dieser Therapie ist mit der Etablierung eines funktionalen Immunsystems eine dauerhafte Heilung zu erzielen.

1.6 Prinzip der Stammzelltransplantation

Definitionsgemäß werden bei einer Stammzelltransplantation hämatopoetische Stammzellen von einem Spender auf einen Empfänger übertragen. Dabei wird die autologe von der allogenen Stammzelltransplantation unterschieden. Bei der autologen Stammzelltransplantation sind Spender und Empfänger die gleiche Person, bei der allogenen Stammzelltransplantation sind Spender und Empfänger unterschiedliche Individuen. Als Stammzellquelle können sowohl Knochenmark, Placenta-Restblut oder periphere Blutstammzellen verwendet

werden (Hönig, Schulz, und Friedrich 2011). Eine autologe Stammzelltransplantation komm somit für Patienten mit angeborenen genetischen Defekten der Blutzellen nicht als therapeutische Option in Frage, es sei denn es erfolgt ex vivo vor der Rückgabe eine Korrektur des genetischen Defektes. Dieses Verfahren wird autologe Gen-Therapie genannt (Sokolic, Kesserwan, und Candotti 2008). Dies wäre ein prinzipiell für Patienten mit ZAP-70 Defekt geeignetes Verfahren, ist jedoch in der klinischen Praxis bisher nicht etabliert. Auf dieses Verfahren soll daher hier nicht weiter eingegangen werden.

Bei der allogenen Knochenmarkspende wird dem Spender aus dem Beckenkamm ein Gemisch aus Knochenmark und Blut entnommen. Die so gewonnen Stammzellen können theoretisch ohne weitere Aufarbeitung dem Patienten transfundiert werden. Jedoch sind z.B. bei Blutgruppenunverträglichkeit weitere Aufarbeitungsschritte notwendig.

Für die Gewinnung der peripheren Blutstammzellen (PBSC) wird der Spender 5 Tage mit dem Hormon G-CSF vorbehandelt, um eine Auswanderung der Stammzellen aus dem Knochenmark ins Blut zu erwirken. Aus dem entnommenen Blut werden die Stammzellen durch eine Stammzell-Apharese herausgefiltert, aufbereitet und dem Patienten transfundiert (Wahn u. a. 2005).

Eine weitere Quelle zu Gewinnung hämatopoetischer Stammzellen ist die Stammzellgewinnung aus dem Nabelschnurblut. Hier wird direkt nach der Geburt des Kindes das in der Nabelschnur befindliche Blut entnommen. Im Plazentarestblut findet sich ein prozentual hoher Anteil an hämatopoetischen Stammzellen. Die mononukleäre Zellfraktion wird isoliert und kryokonserviert und steht in Nabelschnurbanken zur Transplantation zur Verfügung (Murphy u. a. 2014).

Für die Stammzelltransplantation kam als Stammzellquelle früher nur Knochenmark von HLA-identischen Familienmitgliedern in Frage. Heute

jedoch können Stammzellen von nicht-identischen Familienmitgliedern sowie von nicht verwandten HLA-kompatiblen Spendern transplantiert werden (Wahn u. a. 2005; Murphy u. a. 2014).

Um optimale Bedingungen für die HSZT zu schaffen und ein Anwachsen der Stammzellen (Engraftment) zu erzielen, werden die Patienten meist mit Chemotherapie vortherapiert (Konditionierung). Eines der Ziele dieser Therapie ist es, die Immunabwehr des Empfängers soweit zu supprimieren, dass eine Abstoßung des Transplantats verhindert wird. Darüber hinaus wird eine weitreichende Myeloablation angestrebt um die dysfunktionalen Stammzellen des Empfängers zu zerstören und so Möglichkeiten für ein dauerhaftes Ansiedeln der transplantierten Stammzellen im Knochenmark zu schaffen (Hönig, Schulz, und Friedrich 2011).

1.6.1 Besonderheiten der Stammzelltransplantation bei schwerem kombiniertem Immundefekt

Patienten, die an einem SCID leiden, zeigen eine stark eingeschränkte Funktion der spezifischen Immunfunktionen, die für die Transplantats-Abstoßung verantwortlich sind, sodass vor einer HSZT nicht zwingend eine Konditionierung durchgeführt werden muss. Dazu kommt, dass Differenzierungslinien des Knochenmarks, die nicht die Lymphozyten betreffen, vom Immundefekt nicht betroffen und funktionstüchtig sind. Deshalb ist eine Ansiedlung von Spenderstammzellen im Knochenmark nicht zwingend notwendig um ein funktionierendes Immunsystem aufzubauen (Hönig, Schulz, und Friedrich 2011).

Die Ausbildung eines neuen T-Zellsystems nach HSZT folgt zwei Wegen:

Reife T-Zellen, die mit den transplantierten Stammzellen in den Empfänger gelangen, proliferieren im peripheren Blut und in sekundär lymphatischen

Organen. Diese Zellen haben die positive und negative Selektion im Thymus des Spenders durchlaufen und sind somit potentiell reaktiv auf Antigene des Empfängers. Um eine Alloreaktion in Form einer GvHD (Graft versus Host Disease) zu vermindern oder zu vermeiden ist deshalb als GvHD-Prophylaxe oft eine pharmakologische Immunsuppression zur Suppression der T-Zellen erforderlich.

Nach einer HSZT wandern prä-thymische Lymphozytenvorläufer des gesunden Spenders in den Thymus des Empfängers ein. Dort durchlaufen sie verschiedene Entwicklungsschritte, bis sie als gereifte T-Zellen in das Blut entlassen werden. Die Zellen werden somit im Thymus des Empfängers selektiert wie im Abschnitt 1.4 beschrieben. Selbstreaktive T-Zellen wurden durch die Negativselektion eliminiert. Die so im Empfängerthymus gereiften T-Zellen lösen daher keine Alloimmunreaktion in Reaktion auf Gewebe des Empfängers aus. Ein Risiko für eine GvHD geht von diesen Zellen nicht aus (Hönig, Schulz, und Friedrich 2011). Die Reifung naiver reifer T-Zellen bedarf eines Zeitraums von 3-4 Monaten (Murphy u. a. 2014).

Die Übereinstimmung der HLA-Merkmale von Spender und Empfänger ist für die HSZT von großer Bedeutung. Wird ein HLA-identisches oder kompatibles Transplantat transplantiert, kann ein funktionierendes T-Zellsystem aus reifen Spenderzellen entstehen. Die periphere Expansion reifer T-Zellen erlaubt die rasche Etablierung eines T-Zellsystems innerhalb von wenigen Wochen. In der Regel wird dies unter einer pharmakologischen GvHD-Prophylaxe durchgeführt.

Ist das Transplantat nicht HLA-kompatibel, muss eine T-Zell-Depletion der Stammzellen erfolgen um eine erwartungsgemäß äußerst heftige bis tödliche Reaktion der transplantierten reifen T-Zellen auf Gewebe des Empfängers zu verhindern. In diesem Fall werden reife T-Zellen aus dem Transplantat weitestgehend entfernt und das neue T-Zellsystem muss im Thymus des

Empfängers aus T-Zell-Vorläufern aufgebaut werden. Mit dem Erscheinen der ersten funktionell wirksamen T-Zellen im peripheren Blut des Empfängers ist erst nach 3-4 Monaten (s.o.) zu rechnen. In dieser Zeit besteht somit eine hohe Gefährdung der Patienten durch vor allem virale Infektionen (Hönig, Schulz, und Friedrich 2011).

Ein entscheidender Faktor bei Therapie von SCID mit HSZT ist die frühe klinische und immunphänotypische Sicherung der Diagnose (Sharifinejad u. a. 2020). Das Transplantations-Outcome von Patienten ohne Vorbelastung durch Infektionen ist deutlich besser als bei Patienten, die durch Infektionen vorbelastet sind (Kwan u. a. 2014). Die genetische Analyse und Identifikation einer kausalen Mutation kann zusätzliche Sicherheit schaffen.

1.7 SCID-Neugeborenen-Screening

Um eine möglichst frühe Diagnosestellung zu ermöglichen, wurde am 01.08.2019 deutschlandweit ein Screening für SCID in das bereits bestehende Screening für angeborene Stoffwechselerkrankungen und Hormonstörungen eingegliedert.

Das Neonatalscreening für diese Erkrankung hat das Ziel, die neonatale T-Zell-Defizienz bereits bei Geburt zu erkennen, um hierdurch eine frühe Therapieeinleitung vor ersten (potentiell lebensbedrohlichen) Infektionen zu ermöglichen.

Die Nachweismethode des Screenings basiert auf der Bestimmung von Nebenprodukten der T- Zellentwicklung. Dabei wird der Mangel an TRECs (korreliert mit der T-Zelldefizienz) nachgewiesen.

TRECs (T-cell receptor excision circles) sind, wie oben beschrieben, ringförmige DNA-Fragmente die in T- Zellen während ihrer Reifung im Thymus im Rahmen des VDJ-Rearrangements gebildet werden. Diese

Fragmente können nicht repliziert werden und persistieren in den Zellen. Die Menge der im peripheren Blut nachweisbaren TRECS sind deshalb einen Parameter, der gut mit der Zahl der neu entstandenen T- Zellen und somit der Thymusfunktion korreliert.

TRECs werden in einer quantitativen PCR bestimmt. Für das Screening kann getrocknetes Filterkartenblut oder Blut verwendet werden, das im Rahmen der Fersenblutentnahme für das etablierte Neugeborenen-Screening entnommen wurde. Der methodische Erfolg wird mit Hilfe der erfolgreichen Expansion eines sogenannten „house-keeping-genes“, dem Beta-Actin als Positivkontrolle sichergestellt. Dieser zeigt sich erniedrigt, wenn z.B. die DNA-Qualität der Probe ungenügend ist oder andere Ursachen den Test negativ beeinflussen (Tagliaferri u. a. 2017).

1.8 Fragestellung

Ziel dieser Arbeit ist es, in einer retrospektiven Analyse die klinische Präsentation, den Immunphänotyp, die Genotypen, den Transplantationsverlauf und die immunologische Rekonstitution bei Patienten mit SCID aufgrund eines genetischen Defektes in ZAP-70 zusammenzufassen. Mit diesen Daten soll die Behandlung zukünftiger Patienten in Bezug auf Diagnostik, Spenderauswahl und Konditionierung optimiert werden. Eine weitere Frage unserer Arbeit ist es herauszufinden, ob die an einem ZAP-70 Defekt erkrankten, untersuchten Patienten im Rahmen eines TREC-Screenings aufgefallen wären.

Wie oben beschrieben stellt SCID eine seltene Erkrankung und der ZAP-70 eine kleine Untergruppe dieser Erkrankung dar. Bisher wurden weltweit insgesamt 49 Patienten mit ZAP-70 Defekt jeweils in Einzel- oder Geschwisterpaar-Beobachtungen analysiert. Die im Rahmen dieser Arbeit

untersuchte Kohorte von 7 Patienten ist daher die bisher einzige Kohortenanalyse von Patienten mit ZAP-70 Defekt.

2 Patienten, Material und Methoden

2.1 Studiendesign

Der vorliegenden Arbeit liegt eine retrospektive Datenanalysezugrunde. Es wurden die Krankenakten der an ZAP-70 Defekt erkrankten Patienten aus dem Archiv der Abteilung für Kinder- und Jugendmedizin der Universitätsklinik Ulm retrospektiv analysiert. Eingefrorenes Zell-Material einiger Patienten wurde im Rahmen dieser Arbeit in einem Labor der Universitätsklinik Heidelberg analysiert. Die im Rahmen der Arbeit analysierten Patienten wurden dabei, gemäß der Vorgabe der Ethikkommission der Universität Ulm, als UPN (unique personal number der Universitätsklinik Ulm) aufgeführt.

2.2 Patienten

Im ersten Teil der Studie wurden Daten von 7 Patienten ausgewertet. Einschlusskriterium war eine abgeschlossene oder andauernde Behandlung aufgrund eines ZAP-70 Defektes in der Abteilung für Kinder und Jugendmedizin am Universitätsklinikum Ulm. Hiervon waren 5 Patienten männlich und 2 Patientinnen weiblich. Die Diagnose einer ZAP-70 Defizienz erfolgte somit aufgrund folgender Kriterien: klinische Präsentation und laborchemische Konstellation eines kombinierten Immundefektes mit Nachweis einer Mutation in *ZAP70*, sowie im Anschluss durchgeführter Stammzelltransplantation. Die Endscheidung zur Sequenzierung von *ZAP70* wurde bei typischem Immunphänotyp gestellt: Mangel oder komplett fehlende CD8+ T-Lymphozyten bei normaler Anzahl vom CD4+ T-Lymphozyten. Ein Patient, der in den Unterlagen als Patient mit ZAP-70-Defizienz geführt wurde, musste ausgeschlossen werden, da er das Kriterium einer gesicherten Mutation für *ZAP70* nicht erfüllte und eine Nachuntersuchung nicht möglich war.

Einschlusskriterium für die TREC-Untersuchung waren a) das Vorliegen von geeignetem Material und b) eine vorliegende, unterschriebene Einverständnis-Erklärung der betreffenden Eltern. Schließlich konnte von 4 der 7 Patienten Material untersucht werden.

2.3 Datenerhebung

Die erforderlichen Daten für die retrospektive Analyse wurden aus den entsprechenden Krankenakten erfasst, hier standen Dokumente zu klinischen sowie laborchemischen Untersuchungsbefunden, Verlaufseinträgen, Anamneseerhebungen, Informationen von Spendern und Empfängern sowie Nachsorge- und Kontrolluntersuchungen zur Verfügung.

Es wurden insbesondere Daten zur klinischen Untersuchung bei Diagnosestellung, zu immunologischen, hämatologischen und infektiologischen Befunden vor und nach Stammzelltransplantation, sowie zu genetischen Untersuchungsergebnissen zusammengestellt.

Bezüglich der TREC-Untersuchung wurden die Ergebnisse der, im Rahmen dieser Arbeit in Auftrag gegebenen, laborchemischen Untersuchung des Labors der AG Kulozik an der Universitätsklinik Heidelberg verwendet.

2.3.1 Immunphänotypisierung in der Durchflusszytometrie

Im folgenden Abschnitt wird die Methodik zur immunophänotypischen Charakterisierung der Patienten, die ein wichtiger Bestandteil der Diagnosestellung darstellt, beschrieben. Diese Untersuchungen wurden im Routinelabor der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin durchgeführt. Die Ergebnisse wurden den schriftlich in der Patientenakte abgelegten Befunden entnommen. Für die Phänotypisierung der Lymphozyten erfolgte im ersten

Schritt eine Inkubation der Zellen mit Flourochrom-konjugierten Antikörpern. Hierbei wurden anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8 und anti-CD45RA/RO für die Phänotypisierung der T-Lymphozyten, anti-CD19 für B-Lymphozyten und antiCD16/56 für NK-Zellen verwendet. Die verwendeten monoklonalen Antikörper sind mit unterschiedlichen Flourochromen konjugiert.

Um die verschiedenen Lymphozytenpopulationen qualitativ und quantitativ zu analysieren werden die Lymphozyten nach der Markierung mit spezifischen Antikörpern für die Untersuchung in der Durchflusszytometrie aus einer Zellsuspension angesaugt und in einem Flüssigkeitsstrom vereinzelt an Laserquellen vorbeigeführt. Im ersten Schritt der auch als FACS (flourescence-activated cell sorting) bezeichneten Methode werden die Zellen durch Messen der abgelenkten und gestreuten Lasersignale nach den Eigenschaften Größe, Granularität und Intensität charakterisiert. Die Erfassung der Zelltyp-spezifischen Oberflächenmarker in der Durchflusszytometrie erfolgt mit der Detektion der Lichtemissionen der mit den Antikörpern an den Zellen gebundenen Fluoreszenzfarbstoffe in unterschiedlichen Wellenlängen nach Anregung durch einen Laser. Die dabei entstehenden Lichtemissionen werden dabei von einem optischen Detektionssystem registriert und in elektrische Signale konvertiert. Die Auswertung dieser Signale ermöglicht eine genaue Unterscheidung der untersuchten Zellen und erlaubt so eine qualitative und quantitative Einordung.

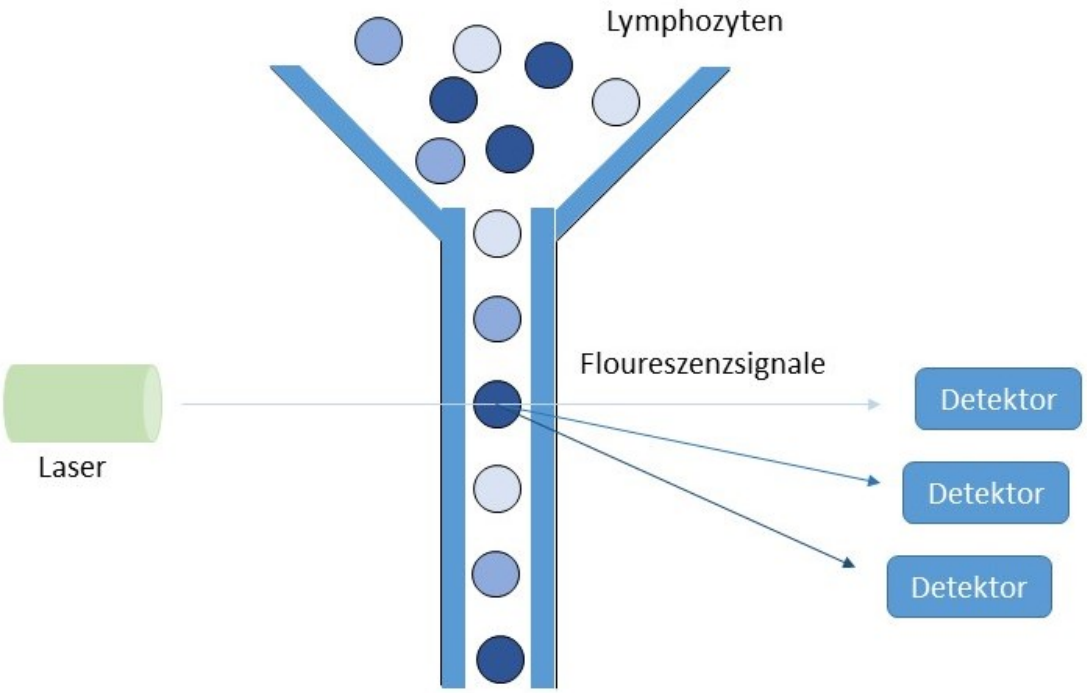


Abbildung 4.: Schematische Darstellung des Aufbaus eines Durchflusszytometers, Universitätsklinikum Ulm. In einem Durchflusskanal werden die markierten Lymphozyten aufgereiht und nacheinander durch einen Laserstrahl geführt. Die dadurch erzeugten Streu- und Floureszenzsignale werden von Detektoren erfasst und ausgewertet. (Nach (Valet 2003))

2.3.2 Chimärismusanalyse

In der Chimärismusanalyse werden die Anteile des Spenders und/oder des Empfängers im peripheren Blut nach durchgeführter Stammzelltransplantation bestimmt. Dies ist ein wichtiges Instrument zur Erfolgskontrolle der HSZT. Die Chimärismusanalyse der Leukozyten wurde im Vollblut mit Short-tandem-repeat (STR) Analyse oder bei Geschlechtsdifferenzen zwischen Spender und Empfänger mit einer Floureszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) durchgeführt. Im Falle von HLA-Differenzen zwischen Spender und Empfänger wurden die

Subpopulationen mit spezifischen Antikörpern gegen HLA-Allele gefärbt und in der Durchflusszytometrie parallel zu zelllinienspezifischen Eigenschaften charakterisiert. Hierdurch kann der Chimärismus auch auf Ebene der Lymphozytensubpopulationen bestimmt werden.

2.3.2.1 Floureszenz-in-situ-Hybridisierung

Bei der Floureszenz-in-situ-Hybridisierung binden Floureszenz-markierte DNA-Sonden an spezifische DNA-Spots auf den Geschlechtschromosomen. Diese Markierungen werden im Anschluss optisch im Mikroskop ausgewertet.

2.3.2.2 Short-tandem-repeat-Analyse

Short-tandem-repeats sind kurze, nicht-codierende Basenpaar-Muster, die im Genom repetitiv vorkommen. Inter-individuell zeigt sich eine hohe Varianz der Anzahl dieser Wiederholungen sodass sich Zellen durch die Anzahl der short-tandem-repeats an verschiedenen genetischen Lokalisationen eindeutig einem Individuum zuordnen lassen. Bei der Short-tandem-repeat-Analyse wird die Anzahl der short-tandem-repeats der zu untersuchenden Zellen durch eine DNA-Extraktion mit anschließender PCR bestimmt. Der Anteil der vom Spender und/oder Empfänger stammenden Zellen im peripheren Blut lässt sich somit quantifizieren.

2.4 TREC-Untersuchung

2.4.1 Probengewinnung

Insgesamt wurde Probenmaterial von 4 Patienten untersucht. Die in dieser Arbeit aufgeführten Messwerte der TREC-Untersuchung konnten aus vor der Transplantation kryo-konserviertem Material durchgeführt werden. Eine zusätzliche Blutentnahme war somit nicht notwendig. Die Eltern der Patienten gaben im Rahmen der Aufklärung zur Stammzelltransplantation ihre Einwilligung zur Kryokonservierung von Patientenzellen. Diese wurden im Rahmen von Routineabnahmen gewonnen und in flüssigem Stickstoff gelagert. Für die Bestimmung der TREC-Level aus konservierten Zellen liegen von den betreffenden Eltern unterschriebene Einverständniserklärungen vor.

Die in dieser Arbeit verwendete TREC-Untersuchungstechnik wurde für Filterkarten-Blut entwickelt, ist jedoch auch für kryo-konservierte Zellen verwendbar.

2.4.2 DNA-Extraktion aus Patientenproben

Das in der Folge beschriebene Verfahren wurde im Auftrag der Universität Ulm im immunologischen Labor der AG Kulozik der Universität Heidelberg explizit für diese Arbeit durchgeführt. Das Probematerial wurde in 96-well-Platten mit 13µl Lyse-Flüssigkeit (DNA Extract All Reagents Kit, Cat. Number 4402599, Applied Biosystems) für 3 Minuten bei 95° inkubiert. Im Anschluss wurde die Lyse mit einem Stabilisierungs-Reagens (DNA Extract all Reagents Kit, Cat Number 4402599, Applied Biosystems) gestoppt.

2.4.3 Quantitative PCR

Die TREC-Analyse wurde in einer real-time quantitativen PCR durchgeführt. Methodisch handelt es sich dabei um eine Vervielfältigungsmethode die auf dem Verfahren der PCR beruht. Während des Quantifizierungsprozesses verdoppelt sich die Menge der PCR nach jedem Zyklus. Die Menge der vorliegenden DNA wird durch Fluoreszenzfarbstoffe messbar gemacht. Dabei steigt die erfasste Fluoreszenz proportional mit der Menge der PCR-Produkte an. Für die Untersuchungen dieser Arbeit wurden das Verfahren mit TaqMan-Sonden verwendet. Diese Sonden lagern sich während der Primer-Hybridisierungs-Phase der PCR an die Einzelstrang-DNA an. Die Sonden weisen am 5`-Ende einen Reporter-Fluoreszenzfarbstoff und am 3`-Ende einen Quencher auf. Die fluoreszierende Eigenschaft des Reporters ist deaktiviert solange die Sonde komplett und der Reporter mit dem Quencher verbunden ist. Während der Polymerisationsphase der PCR kommt eine Taq-Polymerase zum Einsatz welche während der Synthese des Gegenstranges zusätzlich in der Lage ist, die Sonde von der DNA zu trennen und dabei zu zerlegen. Sobald der Reporter so von dem Quencher getrennt wird, wird die Fluoreszenz aktiviert. Diese kann dann in Echtzeit abgebildet und proportional zur Quantifizierungsprozess ausgewertet werden.

Die insgesamt 20 µl der Untersuchungslösung setzten sich dabei aus 10 µl Mastermix (SensiFast Probe Ho-Rox Kit, Bioline), 2 µl TREC forward-primer 10µM, 2 µl TREC reverse-primer 10 µM, 0,3 µl FAM-TAMRA-labeled TaqMan TREX probes 1:10 (Life Technologies, 0,8 µl BSA 1% und 2 µl DNA Extrakt zusammen.

Die interne Kontrolle einer erfolgreichen DNA-Extraktion wurde durch eine β-actin-Quantifizierung im Rahmen einer real-time quantitativen PCR durchgeführt. Die insgesamt 20 µl der Untersuchungslösung setzten sich dabei aus 10 µl Mastermix (SensiFast Probe Ho-Rox Kit, Bioline), 0.7 µl 1:3 VIC-

labeled Beta Actin TaqMan Gene Expression Assay (Nr Hs03023880, Order Nr 4,448,484, Life Technologies), β-actin-Primern und 2 µl DNA Extrakt zusammen.

Die quantitativen PCR-Reaktionen wurden auf einem StepOnePlus real-time PCR-System (Applied Biosystems) in 96-well-Platten durchgeführt und unterliefen einen Zyklus von 2 min bei 50°, 1 Zyklus von 10min bei 95° und 45 Zyklen von 30sec bei 95° und 30sec bei 60°.

2.4.4 Einordnung der Messergebnisse

Die TREC-spezifischen Ergebnisse der real-time PCR werden in der verwendeten Untersuchung in der Einheit copies/punch angegeben. Dies beschreibt die gemessene Anzahl an TREC-copies per 1.6mm Punch.

Der cut-off wurde bei 36 copies/punch festgelegt. Liegt das Messergebnis unter dem festgelegten cut-off wird eine weitere Diagnostik bei hochgradigem Verdacht auf SCID empfohlen.

Für Patienten, die den Cut-off nicht erreichten, wurde, zum Sicherstellen einer erfolgten DNA-Extraktion, eine Kontrolle mit beta-actin durchgeführt.

2.5 Auswertung

Nach der umfassenden, tabellarischen Aufnahme der Daten aus den vorliegenden Akten erfolgte die Auswertung.

Tabellen und Abbildungen wurden mit den Programmen MS Excel und MS PowerPoint erstellt.

Eine statistische Auswertung wurde aufgrund der geringen Fallzahl nicht durchgeführt.

3 Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurden die Daten zu 7 Patienten mit genetisch gesichertem ZAP-70 Defekt retrospektiv aufgearbeitet.

3.1 Klinische Befunde zum Diagnosezeitpunkt

Tabelle 2.: Klinische Befunde der Patienten mit ZAP-70 Defekt erhoben zum Zeitpunkt der Diagnosestellung, Universitätsklinik Ulm; (UPN: unique personal number Universitätsklinik Ulm; +, zutreffend; -, nicht nachgewiesen; kursiv, Erreger;)

UPN	Alter (Tage)	Respiratorisch	Gastrointestinal	Dermatologisch	Neurologisch	Hepato-splenomegalie
675	213	Pneumonie *Pneumozystis jirovecii*	Enteritis -	Exanthem *HHV6*	-	+
673	5	Bruder von UPN 631, positive Familienanamnese, postnatale Diagnosestellung				
631	184	Pneumonie *Pneumozystis jirovecii*	Enteritis *Rotavirus*	-	-	+
371	285	Pneumonie, ARDS	Enteritis *Astrovirus*	Exanthem *Coxsackie-A-Virus*	-	-
557	122	Pneumonie *CMV*	-	-	Enzephalitis *CMV*	+
757	372	Pneumonie *Coronaviren, Rhinoviren, Enteroviren, Pneumozystis jirovecii*	-	Exanthem *HHV6*	-	-
285	188	Pneumonie *CMV*	Enteritis *CMV*	Exanthem -	Enzephalitis *CMV*	+
		6/7	4/7	4/7	2/7	4/7

Bei UPN 673 wurde aufgrund der positiven Familienanamnese direkt nach der Geburt eine gezielte Diagnostik durchgeführt und der Patient zeigte zum Diagnosezeitpunkt keinerlei klinische Auffälligkeiten. Das Alter der übrigen 6 von 7 Patienten war zum Diagnosezeitpunkt zwischen 122 und 372 Tagen (Median 247).

Bei den Untersuchungen wurden bei allen Patienten mit Ausnahme von UPN 673 zum Diagnosezeitpunkt atypische Infektionen verschiedener Organsysteme festgestellt. Alle bei Diagnosestellung symptomatische

Patienten präsentierten Infektionen des Respirationstrakts. 3 der 7 Patienten zeigten opportunistische Infektionen: bei dem klinischen Bild einer Pneumonie wurde bei zwei Patienten Pneumozystis jirovecii und bei zwei weiteren Patienten CMV als ursächlich nachgewiesen.

4 von 7 Patienten zeigten gastrointestinale Infektionen, bei 3 der 4 Patienten wurden virale Erreger nachgewiesen (s. Tabelle 1). 4 von 7 präsentierten sich zum Diagnosezeitpunkt mit einem Exanthem möglicherweise mit viraler Genese. Eine Hepatosplenomegalie wurde bei 4 von 7 Patienten in der klinischen Untersuchung beschrieben.

3.2 Immunologische Befunde zum Diagnosezeitpunkt

Die Zahl der CD3 positiven T-Zellen war bei 4 von 7 Patienten im altersentsprechenden Normbereich, bei 2 Patienten oberhalb des Normbereiches und bei einem Patienten (UPN 371) reduziert. Bezüglich der CD4 positiven T-Zellen zeigten sich bei 4 von 7 Patienten Zahlen oberhalb der Norm. Bei 2 von 7 lagen diese im Normbereich und bei einem Patienten (UPN 371) unterhalb der Norm. Die CD8 positiven T-Zellen waren bei allen Patienten unterhalb des Normbereiches reduziert, wobei bei 3 von 7 Patienten keine CD8 positiven T-Zellen nachgewiesen werden konnten.

Die naiven T-Zellen definiert als CD3+/CD4+/CD45RA+ wurden bei 5 von 7 Pateinten erhoben, bei allen Patienten lag deren Wert unter der Norm. Die T-Zellfunktionen, dargestellt durch die in-vitro Reaktion auf PHA und CD3/CD28 waren bei allen Untersuchungen vermindert bis fehlend.

Die Zahl der nachgewiesenen B-Zellen (CD19+) war bei 3 von 7 Patienten oberhalb der Norm, die übrigen 4 von 7 Patienten hatten normwertige CD19 positive Zellen.

5 von 7 Patienten zeigten normwertige NK-Zellen (CD 16/56); bei 2 von 7 Patienten war die Zahl der NK-Zellen unterhalb der Norm.

Tabelle 3.: Immunologische Befunde der Patienten mit ZAP-70 Defekt zum Zeitpunkt der Diagnosestellung, Universitätsklinik Ulm; (UPN: unique personal number Universitätsklinik Ulm; nd, nicht durchgeführt; (), alters-entsprechende Normwerte; % vom Soll, definiert in Bezug auf Tageskontrolle/Normalperson; Normwerte gemäß:(Shearer u. a. 2003); *, vor Substitution; altersentsprechende Normwerte der Immunglobuline gemäß: (Tietz 1981)); PHA, Phythämagglutinin, NK, Natürliche-Killer

						T-Zell Funktion							
UPN	Alter (Tage)	CD3+ Zellen/µl	CD4+ Zellen/ µl	CD8+ Zellen/ µl	CD45RA % der CD4+	PHA % vom Soll	CD3/CD28 % vom Soll	NK-Zell Funktion % von Soll	CD19+ Zellen/µl	CD 16/56 Zellen/µl	IgG, g/L*	IgA, g/L*	IgM, g/L*
675	213	**5692** (1900-5900)	**5016** (1400-4300)	**132** (500-1700)	**33** (64-92)	0	0,01	nd	**3375** (610-2600)	**578** (160-950)	**5,7** (4-8)	**2,9** (1-7)	**0,82** (3,1-7,7)
673	5	**2783** (2500-5500)	**2703** (1600-4000)	**0** (560-1700)	**51** (61-94)	0,1	15	nd	**755** (300-2000)	**198** (170-1100)	**5,4** (8-10)	**0,6** (0-0,8)	**0,2** (0,6-1,6)
631	184	**2822** (2500-5600)	**2744** (1800-4000)	**0** (590-1600)	**47** (61-94)	0,1	1	nd	**980** (430-3000)	**78** (170-830)	**5,1** (2,7-6)	**2,5** (0-6,4)	**0,67** (2,8-6)
371	255	**1226** (1900-5900)	**911** (1400-4300)	**7** (500-1700)	nd	0,1	0,1	51	**1051** (610-2600)	**315** (160-950)	**4,3** (4-8)	**2,7** (1-7)	**0,88** (3,1-7,7)
557	122	**6907** (2500-5500)	**6180** (1800-4000)	**545** (590-1600)	**40** (61-94)	0,1	0,1	100	**4180** (430-3000)	**690** (170-830)	**2,69** (2,7-6)	**2,6** (0-6,4)	**0,25** (2,8-6)
757	372	**5780** (2100-6200)	**5780** (1300-3400)	**0** (620-2000)	**8** (64-92)	0	1	nd	**1426** (720-2600)	**82** (180-920)	**7,1** (5-9)	**5,0** (2-9,8)	**1,5** (3,5-8,1)
285	188	**7009** (2500-5600)	**5227** (1800-4000)	**201** (590-1600)	nd	1	1	nd	**3682** (430-3000)	**831** (170-830)	**11,8** (2,7-6)	**7,1** (0-6,4)	**4,89** (2,8-6)

Zellen

Die Serumspiegel der Immunglobuline wurden vor Substitution erhoben. Im Falle der IgG zeigten sich bei 5 von 7 Patienten normwertige Konzentrationen. 1 Patient (UPN 285) zeigte IgGs oberhalb der Norm, 1 Patient (UPN 673) Serumspiegel unterhalb der Norm. Die Serumspiegel für IgA waren ebenfalls bei 6 von 7 Patienten im Normbereich, bei UPN 285 oberhalb der Norm. Bezüglich der IgM Serumspiegel zeigten 6 von 7 Patienten Werte unterhalb der Norm, bei UPN 285 wurde ein normwertiger Serumspiegel festgestellt.

Die Funktion der NK-Zellen wurde bei zwei Patienten, UPN 371, 557, untersucht. Im Fall von UPN 371 lag die Funktion bei 51% vom Soll, bei UPN 557 bei 100%.

3.3 Genetische Befunde

Tabelle 4.: Genetische Befunde der Patienten mit ZAP-70 Defekt, Universitätsklinik Ulm; (UPN: unique personal number Universitätsklinik Ulm; +, zutreffend; -, nichtzutreffend; Konsanguinität: definiert als zutreffend bei Eltern im Verwandtschaft-Verhältnis Cousin und Cousine 1. Grades;)

UPN	Geographische Herkunft	Betroffene Geschwister	Familienanamnese fraglich positive Immundefizienz	Konsanguinität	Mutation
675	Türkisch	-	+	+	c.[1519G>A];[1519G>A]; p.[Ala507Thr];[Ala507Thr]
673	Türkisch	+	+	+	c.[1153C>T];[1153C>T]; p.[Arg385Cys];[Arg385Cys]
631	Türkisch	+	+	+	c.[1153C>T];[1153C>T]; p.[Arg385Cys];[Arg385Cys]
371	Türkisch	-	-	+	c.[1770C>T];[1770C>T]; p.[Arg594*];[Arg594]
557	Deutsch	+	+	+	g.IVS10-11G>A, c.1832_1833insCTTGAGCAG, p.K541_K542insLEQ j homozygot
757	Deutsch	-	-	-	c.1624-11G>A, polys 541-Lys542; insLeuGluGln homozygot
285	Türkisch	-	+	+	c.[1520C>T];[1520C>T]; p.[Ala507Val];[Ala507Val]
		3/7	5/7	6/7	

Die untersuchten Patienten sind unterschiedlicher geographischer Herkunft. 5 Patienten sind türkischer Herkunft, 2 Patienten deutscher Herkunft. Auffällig ist zudem, dass 5 von 7 Patienten eine positive Familienanamnese für Immundefekte aufweisen. In vier dieser Familien kam es zu einem krankheitsbedingten Tod eines nahen Angehörigen im Kindesalter. Diese Todesfälle wurden anamnestisch nicht genauer präzisiert und konnten somit in den unten aufgeführten Stammbäumen nicht abgebildet werden.

Die Familienanamnese erbrachte zudem, dass 6 von 7 Patienten Eltern mit konsanguinem Hintergrund haben.

Familienstammbäume der untersuchten Patienten:

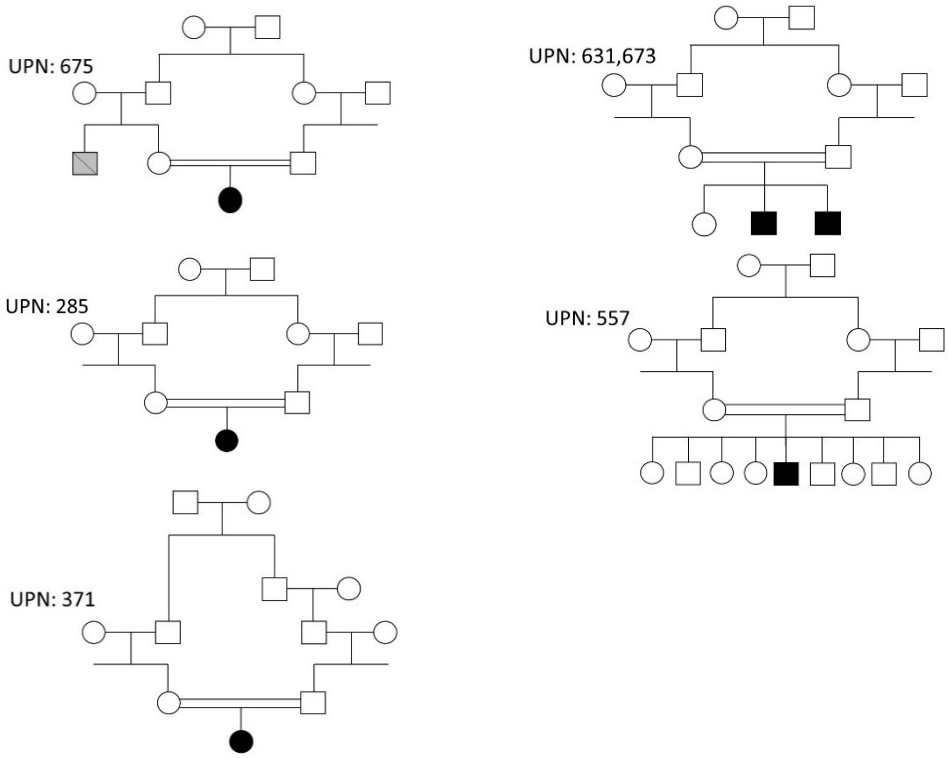


Abbildung 5.: Familienstammbäume der untersuchten Patienten mit konsanguinen Eltern, Universitätsklinikum Ulm; (UPN: unique personal number, Universitätsklinik Ulm; schwarz, Patient)

Die Eltern von Pat 757 sind anamnestisch nicht verwandt.

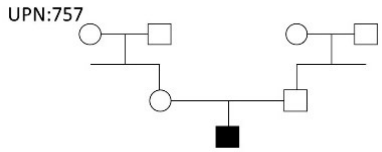


Abbildung 6.: Familienstammbaum des untersuchten Patienten mit anamnestisch nicht verwandten Eltern, Universitätsklinikum Ulm; (UPN: unique personal number, Universitätsklinik Ulm; schwarz, Patient)

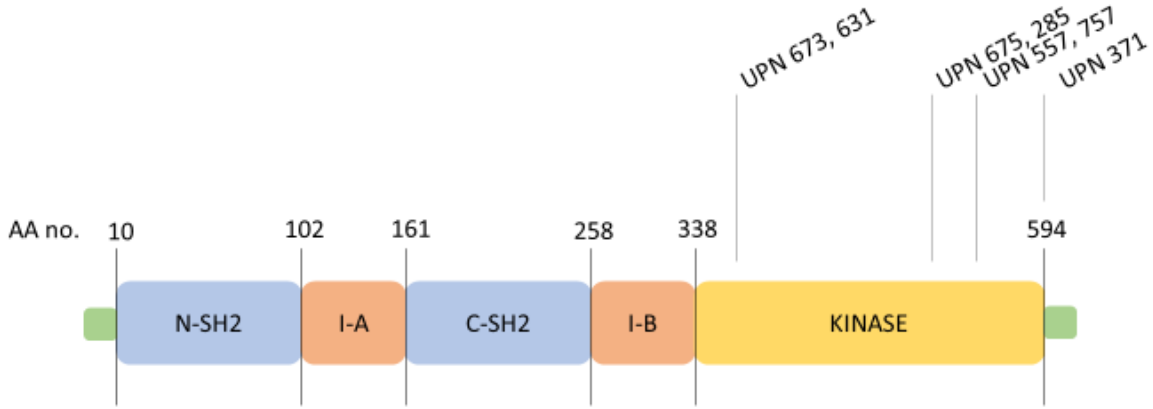


Abbildung 7.: Schematische Darstellung des ZAP-70 Proteins, Universitätsklinikum Ulm; (UPN: unique personal number Universitätsklinik Ulm; N-SH2, n-terminal SH2 domain; I-A, intderdomain A; C-SH2, carboxy-terminal SH2 domain; I-B, interdomain B; KINASE, Kinase domain; AA no, Aminoacid number; Nach (Ochs, MD, Dr.med, Smith, PhD, und Puck, MD 2013))

Abbildung 7 zeigt die Lokalisationen der Mutationen auf dem ZAP-70 Protein der untersuchten Patienten. Alle Mutationen sind in der Kinase-Domain lokalisiert. Bei allen Patienten wurden eine homozygote Mutation in ZAP-70 festgestellt.

3.4 Überleben der Patienten

Vor HSZT wurden alle untersuchten Patienten aufgrund der oben aufgeführten Infektionen – soweit möglich - antiinfektiös behandelt. Die klinischen Symptome mit den entsprechenden laborchemischen Parametern führten zur Indikationsstellung und somit zur Durchführung der HSZT. Ein Patient (UPN 675) verstarb in Folge der HSZT. Auf die Details wird im entsprechenden Abschnitt eingegangen.

3.5 Details der hämatopoetischen Stammzelltransplantation

Ein Patient, UPN 673, erhielt die HSZT mit einem Alter von 60 Tagen aufgrund der sehr frühen neonatalen Diagnose. Die übrigen Patienten erhielten die HSZT mit einem durchschnittlichen Alter von 312 Tagen (175 – 469).

Bei allen 7 Patienten wurde aufgrund der klinischen Präsentation dem Immunphänotyp und der Familienanamnese die Indikation zur HSZT gestellt. Diese erfolgte im Mittel 77 Tage (27-97) nach Diagnosestellung. Der Zeitraum von Zeitpunkt der Diagnosestellung bis zur Infusion des Transplantats lag bei durchschnittlich 67 Tagen.

Tabelle 5.: Details der Transplantation der Patienten mit ZAP-70 Defekt, Universitätsklinik Ulm; (UPN: unique personal number Universitätsklinik Ulm; MFD, matched family donor; MUD, matched unrelated donor; MMFD, mismatched family donor; PBSC, peripheral blood stem cell; KM, Knochemmark; HSZT, Hamatopoetische Stammzelltransplantation; Flu, Fludarabin Dosis in mg/m2; TT, Thiotepa Dosis mg/kg; Treo, Treosulfan Dosis in g/m2; Meph, Melphalan Dosis mg/m2; Bu, Busulfan Dosis in mg/kg; ATG, Anti-Thymozyten-Globulin; nd, nicht durchgeführt; Dosis in mg/kg/KG; +, zutreffend;)

UPN	Δ Alter Diagnose / Alter HSZT (Tage)	Alter HSZT (Tage)	Spender	Match	Konditionierung Substanz: Dosis	Graft	T-Zell Depletion	CD3+ kg/KG	Stammzell -zahl CD34+ kg/KG	ATG Dosis mg/kg	OKT3 Dosis mg/kg/KG
675	97	310	MMFD	5/10	Flu: 150 TT: 8 Treo: 42	PBSC	+	0,12 x 10^4	10,9 x 10^6	10	nd
673	60	60	MUD	10/10	nd	PBSC	nd	2,15 x 10^4	10,09 x 10^6	nd	nd
631	69	253	MUD	10/10	Flu: 160 Meph: 140	KM	nd	10980 x 10^4	12,2 x 10^6	9,5	nd
371	71	326	MMFD	4/8	Flu: 200 Bu: 16 TT: 10	PBSC	+	2,7 x 10^4	13,69 x 10^6	nd	0,1 x 13d
557	53	175	MFD	8/8	nd	KM	nd	11,2 x 10^4	11,2 x 10^6	nd	nd
757	97	469	MUD	10/10	Flu: 160 Bu: 20,4	KM	nd	6,21 x 10^6	nd	10	nd
285	27	215	MFD	8/8	nd	PBSC	nd	9,2 x 10^8	nd	nd	nd

Stammzellquelle:

3 Patienten erhielten Knochenmark (KM), davon 2 Patienten von MUDs (matched unrelated donor) und ein Patient von einem MFD (matched family donor). Die anderen 4 Patienten erhielten periphere-Blut-Stammzellen (PBSC), wovon 1 Patient Stammzellen von einem MFD, 2 Patient von MMFDs (mismatched family donor) und 1 Patient von einem MUD erhielten.

Konditionierung:

3 von 7 Patienten erhielten keine Konditionierung.

3 von 7 Patienten bekamen eine Konditionierung mit myeloablativer Zielsetzung und Gabe von Busulfan oder Treosulfan. 1 von 7 Patienten erhielt eine reduced-intensitiy Konditionierung mit Flurabadin/Mephalan.

3 Patienten erhielten eine Serotherapie mit ATG (Anti-Thymozyten-Globulin), ein Patient mit OKT-3.

Bei 2 von 7 Patienten, die Stammzellen von MMFDs erhielten, wurde eine T-Zell Depletion durchgeführt.

3.6 Toxizität und Graft versus Host Disease

Tabelle 6.: GvHD und Follow up der Patienten mit ZAP-70 Defekt, Universitätsklinik Ulm; (UPN: unique personal number Universitätsklinik Ulm; GvHD, Graft versus Host Disease; CSA, Cyclosporin A; MMF, Mucophenolatmofetil; HSZT, Hämatopoetische Stammzelltransplantation; +, zutreffend; -, nichtzutreffend; y, Jahr; mo, Monate)

UPN	Mukositis (Gradeinteilung nach WHO)	GvHD Prophylaxe (Präparat)	GvHD akut	GvHD chronisch	Follow up	Zeit nach HSZT
675	+ (II°)	CSA	II°, Haut Stadium 3, Darm Stadium 0-1, Leber Stadium 0-1	+	Verstorben	1y, 4mo
673	-	-	-	-	Gesund, inkomplette immunologische Rekonstitution	1y, 3mo
631	+ (I°)	MMF, CSA	I°, Haut Stadium 2	-	Gesund	4y,3mo
371	+ (I°)	-	°II, Haut Stadium 2, Darm Stadium 2	-	Gesund	17y, 11mo
557	-	CSA	°II, Haut Stadium 3, Darm Stadium 1	-	Gesund	14y, 2mo
757	-	-	°IV, Haut Stadium 3, Leber Stadium 3, Darm Stadium 2	-	Gesund	8y, 7mo
285	-	CSA	-	-	Gesund	18y

Eine pharmakologische GvHD-Prophylaxe wurde bei 4 von 7 Patienten verabreicht. Hier kam in allen Fällen das Präparat Ciclosporin A (CSA) zum Einsatz, UPN 631 wurde zusätzlich mit Mycophenolatmofetil behandelt.

Eine Mukositis zeigte sich bei 3 von 7 Patienten.

5 von 7 Patienten zeigten nach Transplantation eine akute GvHD. Einer davon in der Ausprägung Grad I°, drei Patienten mit Grad II° und ein Patient Grad IV°. Eine chronische GvHD wurde bei einem Patienten (UPN 675) beobachtet, dieser verstarb im weiteren Verlauf, mitunter an den Folgen der chronischen GvHD.

3.7 Immunologische Rekonstitution nach HSZT

Die Daten zur immunologischen Rekonstitution nach HSZT wurden in den jeweils letzten durchgeführten immunologischen Untersuchungen erhoben.

Bei UPN 675 wurde nach HSZT keine immunologische Rekonstitution erreicht. Der Patient verstarb an einem hämorrhagischen Schock bei einer akuten Darmblutung/untere GI-Blutung bei schwerer chronischer GvHD des Darms.

Bei 5 der überlebenden 6 Patienten waren nach HSZT die Populationen der CD3+-, CD4+- und CD8+- T- Lymphozyten sowie der CD19+ - Zellen nach einem medianen follow-up von 10 Jahren nach HSZT innerhalb der Referenzbereiche. Bei UPN 673 zeigten sich gut 10 Jahre nach HSZT eine inkomplette immunologische Rekonstitution mit deutlich reduzierten Werten in allen untersuchen Zell-Populationen. Jedoch konnten positive Impfantikörper bestimmt werden, klinisch wurde keine erhöhte Infektneigung berichtet.

Der Anteil der naiven T-Zellen (CD3+/CD4+/CD45+ von allen CD3+/CD4+-Zellen) lagen bei 5 der 6 überlebenden Patienten im Normbereich. Die in-vitro Stimulierbarkeit mit PHA der T-Lymphozyten wurde bei allen überlebenden Patienten untersucht. Bei allen Patienten zeigte sich eine regelrechte Stimulierbarkeit in Form von > 30% der Tageskontrolle auf PHA und CD3/CD28.

Tabelle 7: Immunologische Rekonstitution der Patienten mit ZAP-70 Defekt nach HSZT, Universitätsklinik Ulm; (UPN: unique personal number Ulmer Universitätsklinik; nd, nicht durchgeführt; -, keine; y, Alter in Jahre; mo, Alter in Monate; (), alters-entsprechende Normwerte gemäß: (Shearer u. a. 2003); % vom Soll, T-Zell Proliferation im Vergleich zur Tageskontrolle; MMR, Mumps Masern Röteln; CMV, Zytomegalievirus; DT, Diphterie; PHA, Phythämagglutinin; +, zutreffend; -, nicht zutreffend)

		T-Zell Rekonstitution				T-Zell Funktion		Engraftment			Antikörper		
UPN	Zeit nach KMT	CD3+/µl	CD4+/ µl	CD8+/µl	CD45RA+ % der CD4+	PHA % vom Soll	CD3/CD28 % vom Soll	Chimärismus der T-Zellen % Spender	Chimärismus andere Zellen % Spender	CD19+ Zellen/µl	Tetanus	DT	Andere
675	1y, 4mo	**54** (1400-8000)	**0** (900-5500)	**39** (400-2300)	**60** (62-90)	nd	nd	nd	nd	**6** (600-3200)	-	-	-
673	11y, 3mo	**238** (1200-2600)	**170** (650-1500)	**64** (370-1100)	**31** (42-74)	55	32	63%	CD15+ 0%	**68** (270-860)	+	+	H. Influenzae Pneumo-kokken
631	10y, 1mo	**2450** (1200-2600)	**1494** (650-1500)	**866** (370-1100)	**43** (42-74)	82	96	100%	B-Zellen 100%, Ery 100%	**358** (270-860)	+	+	MMR
371	16y, 10mo	**1555** (110-2200)	**993** (530-1300)	**540** (330-920)	**56** (31-65)	83	95	100%	B-Zellen 100%, Ery 100%	**496** (110-570)	+	+	-
557	13y, 8mo	**1872** (110-2200)	**792** (530-1300)	**888** (330-920)	**63** (31-65)	84	94	100%	B-Zellen 100%, Ery 100%	**288** (110-570)	+	+	-
757	7y, 4mo	**1837** (1200-2600)	**1225** (650-1500)	**514** (370-1100)	**63** (42-74)	71	83	100%	B-Zellen 100%, Ery 100%	**490** (270-860)	-	-	-
285	18y	**1393** (110-2200)	**844** (530-1300)	**464** (330-920)	**44** (31-65)	40	86	100%	CD15 0%	**359** (110-570)	+	+	CMV

Im Rahmen der Chimärismusanalysen zeigten sich bezüglich der CD3+ Zellen bei allen überlebenden Patienten mit Ausnahme von UPN 673 ein vollständiger Spenderchimärismus. Bei UPN 673 zeigte sich ein gemischter T-Zell-Chimärismus mit 63% Spenderanteil.

Die Auswertung der anderen Zell-Populationen ergab bei 4 Patienten (UPN 631, 371, 557,757) im Falle der B-Zellen sowie der Erythrozyten einen vollständigen Spenderchimärismus. Bei UPN 673 und 285 fanden sich keine Spenderanteile bei den CD15 positiven Zellen, somit ist bei diesen Patienten nicht von einem Stammzellengraftment auszugehen.

3.8 Klinische Entwicklung der überlebenden Patienten nach HSZT

Tabelle 8.: Klinische Rekonstitution nach HSZT der überlebenden Patienten mit ZAP-70 Defekt, Universitätsklinik Ulm; (UPN: unique personal number Universitätsklinik Ulm; -, unauffällig; +, altersentsprechende Entwicklung; (), Percentilen; Z.n., Zustand nach; HSZT, Hämatopoetische Stammzelltransplantation)

UPN	Alter	Gewicht (Perc.)	Größe (Perc.)	Klinische Probleme seit HSZT	Pulmonal	Endokrinologisch	Neurologisch	Dermatologisch	Gastrointestinal
673	1y, 3mo	12,8kg (75.)	87cm (75.)	Vorbestehende, rechtsseitige Nierendysplasie ohne Behandlungsbedarf	-	-	-	-	-
631	4y, 1mo	13,4kg (<3.)	89,1cm (<3.)	Z.n. Hepatopathie nach Leber-Transplantation	-	Hypothyreose	-	-	-
371	17y, 11mo	56,9kg (75.)	154cm (<10.)	+	-	Hypothyreose	-	-	-
557	14y, 2mo	66kg (90.)	166cm (50.)	Cerebralparese als Folge einer CMV-Enzephalitis, Pat im Rollstuhl	-	-	Cerebral-Parese als Folge einer CMV-Enzephalitis	Warzen	-
757	8y, 7mo	27.7kg (39.)	135cm (58.)	+	-	-	-	Pigmentierungsstörung	Chronische orale Schleimhautirritation
285	18y	83,6kg (90.)	170,6cm (25.)	+	Asthma bronchiale	-	-	Warzen	chron. Magenscherzen

Die überlebenden 6 Patienten waren zur letztmaligen klinischen Untersuchung zwischen 1 Jahr und 3 Monaten und 18 Jahren alt. Das Gedeihen der Patienten gemessen an den Parametern Größe und Gewicht wurde bei allen Patienten untersucht. UPN 631 liegt bei Zustand nach Lebertransplantation bezüglich der Körpergröße und des Körpergewichts unterhalb der 3. Perzentile. Alle übrigen Patienten lagen bei den Parametern Größe und Gewicht zwischen der 25. und 90. Perzentile

4 von 6 Patienten präsentierten sich zum Untersuchungszeitpunkt mit einem nicht eingeschränkten Allgemeinzustand. Bei UPN 557 besteht aufgrund einer stattgehabten CMV-Enzephalitis eine Cerebralparese, der Patient ist auf einen

Rollstuhl angewiesen. Bei UPN 631 besteht nach Lebertransplantation wie oben beschrieben ein Gedeihstörung.

Bei der Untersuchung der Organsysteme wurde pulmonal nur UPN 285 mit einem Asthma bronchiale auffällig. Bei 2 Patienten (UPN 631, 371) wurde eine Hypothyreose festgestellt und diese im Anschluss substituierend behandelt. Dermatologisch zeigten 3 von 6 Patienten Symptome von Warzen und Papeln (UPN 557, 285) sowie Pigmentierungs-Störungen (UPN 757).

UPN 285 berichtete über chronische Magenschmerzen, UPN 757 nach GvHD IV° über chronische Irritationen der oralen Schleimhaut.

4 Diskussion

Ziel dieser Arbeit ist die zusammenfassende Darstellung einer Patientenkohorte mit nachgewiesenen Varianten in *ZAP70*, dem ZAP-70 Defekt. Dieser ist eine äußerst seltene Erkrankung, bisher wurden 49 Patienten mit ZAP-70 Defekt in der Literatur beschrieben (Sharifinejad u. a. 2020). Dabei wurden weitestgehend Einzelfälle oder familiäre Kleinstkohorten ausgewertet, die aktuell vorliegende Arbeit ist die bisher größte primär untersuchte Kohorte.

Diese Situation begründet die Fragestellung dieser Arbeit. Erst aus der Auswertung größerer genetisch definierter Kohorten ergibt sich die Möglichkeit einer objektiven Grundlage zu Verbesserung in der Diagnostik und der Therapie der Erkrankung.

In dieser Arbeit haben wir die klinische und immunologische Präsentation zum Diagnosezeitpunkt, die Therapie und das Outcome der momentan einzig etablierten Therapie, der HSZT, bei 7 Patienten untersucht. Diese Auswertung in einem einzelnen Zentrum ist der erste Schritt zu einer internationalen Initiative der retrospektiven Datensammlung im Bereich der Inborn Errors Working Party der European Society for Blood and Marrow Transplantation, EBMT. Diese lokalen und internationalen Auswertungen sind bei seltenen Erkrankungen wie dem ZAP-70 Defekt wichtige Grundlagen zur Therapieoptimierung und dienen auch als Referenz bei der Etablierung neuer Therapieformen, wie der Gentherapie.

4.1 Klinische Präsentation

Patienten mit SCID präsentieren sich üblicherweise mit schwer verlaufenden Infektionen des Gastrointestinaltraktes (anhaltende Diarrhöe), des Respirationstraktes oder der Schleimhäute (Picard u. a. 2009). Dabei sind vor allem opportunistische Erreger wie BCG (Bacillus Calmette-Guerin),

Pneumozystis jirovecii oder Herpesviren (CMV) ursächlich für besonders schwere Verläufe (A. Fischer 2000).

Die in dieser Arbeit untersuchten Patienten präsentierten sich hierzu gut vergleichbar mit schweren Infektionen des Respirations- sowie des Gastrointestinal-Trakts.

6 der 7 untersuchten Patienten zeigten bei Diagnosestellung opportunistische Infektionen, hervorgerufen durch z.B. Pneumozystis jirovecii oder CMV, wie sie für Patienten mit schweren Einschränkungen der T-zellulären Immunität beschrieben werden (Mackay, Rosen, und Buckley 2000).

In der Literatur wird der übliche Symptombeginn von SCID durch schwere Infektionen im ersten Lebensjahr beschrieben (Rosenberg und Larkin 2014), einige Arbeiten grenzen diesen Zeitpunkt noch weiter ein und geben (Gaspar, Gilmour, und Jones 2001; Yee u. a. 2008) ein Lebensalter zwischen 3-6 Monaten, mutmaßlich nach Ablauf des mütterlichen Nestschutzes, an. Die Patienten in der vorliegenden Arbeit präsentierten sich mit einem durchschnittlichen Alter von 196 Tagen bei einem Range von 5 – 372 Tagen (Median 188 Tage), und somit in einem zeitlichen Rahmen wie bei Patienten mit SCID (A. Fischer 2000; Gaspar, Gilmour, und Jones 2001; Yee u. a. 2008). Nimmt man UPN 673, bei dem die Diagnosestellung zu einem symptomfreien Zeitpunkt aufgrund des erkrankten Bruders erfolgte, aus dieser Betrachtung heraus, ergibt sich ein durchschnittlicher Diagnosezeitpunkt von 227 Tagen oder 7.5 Monaten.

In der vorliegenden Arbeit präsentierten sich alle Patienten, mit Ausnahme von UPN 673, mit schweren Infektionen; hervorgerufen durch oben beschriebene, SCID-typische, Erreger. Dementsprechend bieten die untersuchten Patienten insgesamt eine klinische Präsentation, die sich von Patienten mit anderen genetischen Ursachen für einen SCID nicht differenzieren lässt.

4.2 Immunologische Präsentation

Vorangegangene Arbeiten zum Thema haben gezeigt, dass der ZAP-70 Defekt charakterisiert ist durch einen Mangel oder das komplette Fehlen von CD8+ T-Zellen bei gleichzeitigem Vorliegen von funktionseingeschränkten CD4+ T-Zellen im peripheren Blut (Melissa E. Elder 1997; Noraz u. a. 2000). Der Nachweis von oft normalen Absolut-Zahlen für T-Zellen (CD3+) mit einem hohen Anteil von naiven CD3+CD4+CD45+ T-Zellen grenzt Patienten mit ZAP-70-Defekt von den meisten anderen SCID-Entitäten ab und könnte somit ein Hindernis für die frühzeitige immunphänotypische Diagnose der Erkrankung darstellen. Üblicherweise werden mit der Diagnose SCID ein Mangel an T-Zellen und ein reduzierter Anteil naiver T-Zellen „erwartet“ (Cuvelier u. a. 2016). Durch die zudem normale Anzahl an B- und NK-Zellen fallen die Patienten im Differentialblutbild nicht durch eine Lymphopenie auf. (M. E. Elder 1998; Rosenberg und Larkin 2014).

Die Befunde der Immunphänotypisierung der Patienten dieser Kohorte zeigen sich zunächst kongruent zu den Erwartungen aus der Literatur. Hochnormale oder normale Werte für CD3+ und CD4+ T-Zellen bei sehr niedrigen oder fehlenden CD8+ T- Zellen. Entgegen den oben angesprochenen Arbeiten lagen die Werte der CD4/CD45RA+ Zellen bei allen untersuchten Patienten unterhalb der Norm. Wie bei (Halkias u. a. 2014; Hwang u. a. 2020) beschrieben und i.R. der Einleitung behandelt, erfolgt die die Ausdifferenzierung der CD4+-Thymozyten zu CD4/CD45RA+-Thymozyten vom TCR Signalweg abhängig. Wie in Kapitel 1.5.1 dargelegt ist die Signalweitergabe bei der Entwicklung im Thymus durch andere Signalwege in ausreichendem Maß vorhanden; in der Peripherie ist die Signaltransduktion, bei fehlender ZAP-70 Funktion, über den TCR schwer beeinträchtigt.

Die Arbeit von (Wang u. a. 2010) stellte die Vermutung auf, dass beim Menschen eine teilweise Kompensation im Thymus durch die Tyrosinkinase

SYK vorliegt, welche letztendlich zur Ausdifferenzierung von CD4+ T-Zellen führt. Diese CD4+ T-Zellen präsentieren sich dann in der Peripherie funktionslos, da außerhalb des Thymus keine Kompensation des ZAP-70 Defektes vorliegt und somit die gestörte Funktion des TCR nicht ausgeglichen werden kann.

(Tangye u. a. 2020) zeigten in ihrer Zusammenfassung bei Patienten mit ZAP-70 Defekt normale oder verminderte Konzentrationen von IgG bei sonst normalen Serumspiegeln von IgM und IgA. Dies wird unserer Arbeit bezüglich IgG und IgA grundsätzlich bestätigt, wobei die Serumspiegel für IgM bei 6 von 7 Patienten unterhalb des Normbereichs lagen.

Die Funktion der vorhandenen T-Zellen, untersucht in Form von T-Zell-Proliferation auf spezifische und unspezifische Stimuli ist bei Patienten mit ZAP-70 Defekt stark vermindert oder gänzlich aufgehoben (Rosenberg und Larkin 2014). Diese Beobachtung wurde in dieser Arbeit bei allen Patienten bestätigt. Sowohl die Reaktion auf PHA- als auch auf CD3/CD28- Stimuli waren bei den untersuchten Patienten nicht höher al 1% des Solls.

Mehrere Arbeiten (Gelfand 1995; Melissa E. Elder u. a. 1995; Toyabe u. a. 2001; Monafo u. a. 2008) zeigten Fälle von Patienten mit ZAP-70 Defekt bei denen bei normwertigen Immunglobulin-Serumspiegeln in Reaktion auf Impfungen keine spezifischen Antikörper gebildet wurden. Die untersuchten Patienten waren nicht geimpft, das Vorliegen von spezifischen Antikörpern wurde folglich bei den hier behandelten Patienten vor HSZT nicht untersucht. Somit kann zu dieser Thematik in der vorliegenden Arbeit kein Beitrag geleistet werden. Grundsätzlich zeigten alle Patienten in der hier untersuchten Kohorte immunphänotypisch quantitative und qualitative Einschränkungen, die auf eine schwere Störung der T-zellulären Immunfunktion schließen lässt. Sekundär ergibt sich hieraus eine Beeinträchtigung der humoralen Immunität wodurch letztendlich funktionell ein kombinierter Immundefekt vorliegt.

4.3 Befunde zur Familienanamnese

In der Literatur zeigten sich die meisten Patienten mit ZAP-70 assoziierten SCID in genetisch isolierten Gemeinschaften der Mennoniten oder gingen aus einer konsanguinen Partnerschaft (Noraz u. a. 2000; Alain Fischer u. a. 2010) hervor. Ein Fall wurde in einer konsanguinen türkischen Familie beschrieben (Karaca u. a. 2013), über die in der vorliegenden Arbeit eingeschlossenen türkischstämmigen Brüder UPN 673 und 631 wurden ebenfalls bereits früher berichtet (Hönig u. a. 2012). In unserer Arbeit konnte die Beobachtung bestätigt werden. 6 von 7 Patienten gehen aus einer konsanguinen Partnerschaft (meist Cousin und Cousine 1. Grades) hervor. Dies erklärt die bei allen Patienten nachgewiesenen homozygoten Mutationen. Es ist auf der Grundlage der Seltenheit der Erkrankung und der Vielfalt der beschriebenen genetischen Varianten zu vermuten, dass auch die Eltern von UPN 757 gemeinsame, den Eltern unbekannte Vorfahren haben, von denen dieselbe genetische Variante stammt und an den Patienten homozygot weitergegeben wurde.

Die Häufung von türkischstämmigen Patienten in der untersuchten Kohorte (5 von 7) liegt am ehesten in der Kultur des Vorderen Orients begründet. (Tunçbílek und Koc 1994) zeigten, dass in der Türkei konsanguine Partnerschaften durchaus üblich sind; bis zu 21 % der Ehen werden zwischen Cousin und Cousine 1. Grades geschlossen.

4.4 Genetische Befunde zum Diagnosezeitpunkt

Mutationen im *ZAP70* Gen wurden an verschiedenen Loci beschrieben. Die Mutationen der in dieser Arbeit untersuchten Patienten liegen alle in der Kinase-Domain des *ZAP70* Gens. (Sharifinejad u. a. 2020) zeigten in der Zusammenstellung der bisher publizierten Patienten eine besondere Häufung der Mutationen ebenfalls in der Kinase Domäne. Die Mutation von UPN 285

(p.Ala507Val) wurde bereits von (Turul u. a. 2009) beschrieben, die Mutation von UPN 673 und 631 wurde von (Hönig u. a. 2012) gezeigt. Die übrigen Mutationen wurden in der Literatur bisher nicht aufgeführt.

Beachtenswert ist in diesem Zusammenhang, dass im Fall von UPN 557 trotz ähnlicher Mutationslokalisation wie im Fall der übrigen Patienten, tief normale Populationen für CD8+ T-Zellen gefunden wurden. Eine detaillierte weiterführende Diagnostik z.B. im Sinne eines Proteinnachweises oder einer Funktionsanalyse wurde jedoch nicht durchgeführt. Mögliche Erklärungen für diesen auffälligen Befund in der Immunphänotypisierung waren z.B. eine Restfunktion von ZAP-70 bei dieser Mutation oder eine genetische Reversion in einem Teil der T-Zellen. Diese Aspekte waren jedoch nicht Gegenstand dieser Arbeit und wurden bisher nicht untersucht. (Picard u. a. 2009) zeigten, dass im Fall von hypomorphen Mutationen eine klinisch und phänotypisch mildere Ausprägung des ZAP-70 Defekts auftreten kann. Dies wurde in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht explizit überprüft und könnte daher Gegenstand zukünftiger Studien sein.

4.5 Hämatopoetische Stammzell-Transplantation

Die Arbeit von (Railey, Lokhnygina, und Buckley 2009) hat gezeigt, dass das Outcome von Patienten mit SCID, die in den ersten 3 Lebensmonaten transplantiert werden, im Vergleich zu Patienten die später transplantiert wurden signifikant besser ist. Alle Patienten der vorliegenden Arbeit erhielten eine HSZT. Diese wurde durchschnittlich im Alter von 10 Monaten durchgeführt. Ein Patient erhielt die HSZT bei Diagnosestellung direkt nach seiner Geburt im Alter von 2 Monaten (UPN 673). Hier konnte in der langfristigen klinischen und immunologischen Rekonstitution kein Vorteil gegenüber den übrigen Patienten beobachtet werden; der jedoch wichtige

Unterschied lag hier, wie erwartet, in der geringeren Belastung des Patienten durch schwere Infektionen vor der HSZT.

Insgesamt ließen sich, vor allem aufgrund der geringen Anzahl der Patienten, keine Zusammenhänge zwischen Outcome und Alter zum Zeitpunkt der Diagnose ableiten. In der Zusammenschau erstaunlich ist dabei die Tatsache, dass bei vielen Patienten trotz positiver Familienanamnese erst verhältnismäßig spät eine Diagnose gestellt und dementsprechend die HSZT durchgeführt werden konnte. Eine frühere immunphänotypische Diagnostik bei bekannter familiärer Belastung hätte möglicherweise bei den betreffenden Kindern eine schwere und potentiell lebensbedrohliche Infektion vermeiden können.

Die HSZT wurde durchschnittlich 67 Tage nach Diagnosestellung durchgeführt. Dabei variierte der Zeitraum von 27 bis zu 97 Tagen. Die relativ lange Wartezeit von durchschnittlich über 2 Monaten ist der Vorbereitung zur Stammzelltransplantation (Katheter-Anlage, Stabilisierung der Organfunktionen nach schweren Infektionen sowie Suche, Identifikation und Vorbereitung des Spenders) geschuldet.

Die Literatur beschreibt insgesamt 25 an einem ZAP-70 Defekt erkrankte Patienten, die einer HSZT zugeführt wurden (Arpaia 1994; M. Elder u. a. 1994; Noraz u. a. 2000; M. E. Elder u. a. 2001; Monafo u. a. 2008; Newell u. a. 2011; Chan u. a. 2016; Cuvelier u. a. 2016; Aluri u. a. 2019). Davon überlebten 23 Patienten. (Monafo u. a. 2008) beschrieben einen Fall eines mennonitischen Jungen der im Anschluss an eine HSZT nach initial erfolgreichem Engraftment im Alter von 22 Monaten aufgrund letztendlich ungeklärter Ursache starb. Dabei wurden Stammzellen eines MUDs transplantiert. Insgesamt präferieren die Autoren für die HSZT Stammzellen von MFDs falls ein solcher gefunden werden kann. Die Entscheidung bei der Spenderauswahl der untersuchten Kohorte wurde, wie bei anderen Erkrankungen üblich, mit der Priorisierung der Verfügbarkeit mit 1. MFD, 2. MUD, 3. MMFD getroffen.

In der hier beschriebenen Kohorte erhielten 2 Patienten Stammzellen von MFDs, 3 Patienten von MUDs und 2 Patienten von MMFDs. UPN 675 verstarb nach einer HSZT mit Stammzellen von einem MMFD. UPN 371 geht es nach HSZT mit Stammzellen eines MMFD heute gut.

Einen prinzipiellen Ausschluss von MMFDs kann durch den Todesfall aber nicht begründet werden.

4.6 Immunologische Rekonstitution nach HSZT

Wichtigstes Ziel der HSZT bei SCID ist die Etablierung eines Spender T-Zellsystems beim Empfänger. Bei allen Patienten wurde initial durch die HSZT ein T-Zell-System etabliert. Sowohl für CD3+-, CD4+- also auch CD8+-T-Zellen wurden altersentsprechende Normwerte erreicht.

Dass die Etablierung eines T-Zell-Systems bei UPN 673, 557 sowie 285 auch ohne Konditionierung möglich war, beweist letztendlich den schweren T-Zell Defekt bei ZAP-70 Defekt, da ein intaktes T-Zell System des Empfängers sonst keine Expansion allogener Zellen erlauben würde.

UPN 673 und 285 zeigten in der Chimärismusanalyse nach HSZT keinen Spenderanteil der B-Zellen. Die Tatsache, dass bei diesen, ebenso wie bei UPN 631, 371 und 557, Impfantikörper nachgewiesen werden konnten bestätigt die uneingeschränkte Funktion der autologen B-Zellen, die zusammen mit den Spender T-Zellen in der Lage sind eine humorale spezifische Immunantwort zu gewährleisten.

Die Arbeiten von (Neven u. a. 2009; Ege u. a. 2019) zeigten, dass bei der Patienten mit SCID nach HSZT ohne Konditionierung trotz initialer Etablierung eines T-Zell-Systems ein deutlicher Rückgang der T-Zell Zahl im Langzeit-Verlauf eintritt. UPN 673 zeigte nach HSZT von einem MUD ohne Konditionierung nach initial regelrechtem T-Zell Engraftment mit regelrechten

Normwerten der T-Zellen im Long-term Follow-up einen unvollständigen Spenderchimärismus der T-Zellen und ein fehlendes Engraftment der anderen Zellreihen. Ein myeloisches Engraftment konnte nicht etabliert werden. Die Zahl der CD3+-, CD4+- und CD8+- T-Zellen, sowie der B-Zellen waren beim letztmalig dokumentierten Follow-up unterhalb der Norm. Die anderen beiden Patienten, die keine Konditionierung vor HSZT erhielten präsentierten sich zum letzten Follow-up mit einem guten klinischen Outcome. UPN 557 zeigte ein vollständiges Stammzell-Engraftment; bei UPN 285 konnte bezüglich der B-Zellen kein Spenderanteil festgestellt werden.

Grundsätzlich bestätigen die erfreulichen Langzeit-Resultate der übrigen Patienten jedoch die allgemeine Empfehlung einer Konditionierung bei HSZT um eine dauerhafte Heilung zu erreichen. Die HSZT ohne Konditionierung könnte eine Therapie-Option für Patienten mit bestehenden viralen Infektionen bleiben um eine zusätzliche Toxizität durch eine Konditionierung zu verhindern oder zumindest passager ein T-Zell System zu etablieren, dass die Überwindung bestehender viraler Infektionen erlaubt.

UPN 675 starb nach HSZT von MMFDs und Konditionierung in Folge einer chronischen GvHD. Die bis zum Tode notwendige Fortführung einer intensiven immunsuppressiven Therapie ist die Ursache für die unvollständige immunologische Rekonstitution. Ein funktionelles T-Zell System konnte zu keinem Zeitpunkt etabliert werden.

Bei UPN 673, 631, 557 und 285 wurde die in-vitro Stimulierbarkeit auf PHA und CD3/CD28 untersucht. Es zeigte sich in allen Fällen eine regelrechte T-Zell-Funktion.

Somit können wir für alle langzeit- überlebenden Patienten konstatieren, dass durch die HSZT ein T-Zell System etabliert werden kann. Zudem zeigt sich, dass für eine regelrechte B-Zell Funktion kein B-Zell Engraftment nötig ist. Eine HSZT ohne Konditionierung ist prinzipiell möglich; im Hinblick auf die

Langzeit-Funktionalität ist jedoch ein myeloisches Engraftment nach Konditionierung von Vorteil. Dies wird mit höherer Wahrscheinlichkeit mit einer Konditionierung erreicht.

4.6.1 Klinische Entwicklung nach HSZT

2 der überlebenden 6 Patienten präsentieren zur letztmaligen klinischen Untersuchung dauerhafte Einschränkungen. In der Zusammenstellung von (Sharifinejad u. a. 2020) zeigte sich, dass 8 von 12 Patienten mit klinischen Komplikationen nach HSZT zum Zeitpunkt der HSZT älter als 6 Monate waren. UPN 557 ist aufgrund einer postinfektiösen Cerebralparese (CMV) auf einen Rollstuhl angewiesen. Bei UPN 631 zeigt sich nach Lebertransplantation ein Minderwuchs. UPN 557 war zum Zeitpunkt der HSZT 5,8 Monate, UPN 631 8,4 Monate alt.

3 der überlebenden 6 Patienten zeigten dermatologische Auffälligkeiten, 2 der 3 Patienten litten unter einem gehäuften Auftreten von Warzen (Verrucae vulgares), der übrige Patient an Pigmentierungsstörungen. Dies wurde in der Literatur bisher nicht beschrieben.

Auffällig war ebenfalls, dass 2 Patienten an einer latenten, nicht behandlungsbedürftigen Hypothyreose erkrankt sind. Dabei wurde die genaue Genese der Erkrankungen nicht weiter definiert. Grundsätzlich wurde die Entwicklung dieses Krankheitsbildes in der vorliegenden Fachliteratur bisher ebenfalls nicht erwähnt.

Zusammenfassend zeigen unsere Ergebnisse, dass die HSZT, letztendlich weitestgehend unabhängig von der Transplantatquelle, ein Langzeitüberleben für Patienten mit ZAP-70 Defekt mit Etablieren eines Spender-T-Zell-Engraftments, T-Zell-Funktion, der Produktion spezifischer Immunglobuline

ermöglicht. Durch das Etablieren eins altersentsprechenden, gesunden Immunsystems werden schwerwiegende Infektionskrankheiten vermieden.

4.7 TREC-Screening

Wie im Anhang im Absatz 7.1 beschrieben wurden die TREC-Messungen, abweichend zu dem üblichen Verfahren der Trockenblutkarte, mit Material durchgeführt welches zum Zeitpunkt der Diagnosestellung des Immundefektes vor HSZT kryokonserviert wurde.

Frühere Arbeiten (Cuvelier u. a. 2016; Sharifinejad u. a. 2020; Suresh u. a. 2020) konnten zeigen, dass Patienten mit ZAP-70 Defekt im Rahmen des Neugeborenen-Screenings mit Trockenblutkarte durch die TREC Messung nicht erfasst werden. (Kim u. a. 2013; Grazioli u. a. 2014) beschrieben Fälle von Patienten mit ZAP-70 Defekten bei denen die TREC-Messung aus Trockenblutkarten unauffällig waren; erneute Messungen zum Diagnosezeitpunkt zeigten jedoch deutlich erniedrigte und somit auffällige Werte. (Suresh u. a. 2020) zeigten einen Abfall der TRECS im Verlauf der ersten 450 Tage bei Patienten mit ZAP-70 Defekt. Hier wurde vermutet, dass die reduzierte Thymusfunktion postnatal einen Einfluss auf die Entwicklung der Thymozyten und somit letztendlich auf die TREC-Level hat. Dabei wurde abschliessend der weitestgehend willkürlich definierte cut-off-Wert als potentielle Ursache beschrieben, warum Patienten mit ZAP-70 Defekt im Neugeborenen-Screening nicht aufgefallen seien. Eine diskrete Anhebung des cuf-off Wertes hätte alle Patienten erfasst ohne «gesunde» Patienten im Sinne eines «falsch-positiven» Testergebnis anzuzeigen (Suresh u. a. 2020).

Die TREC-Untersuchungen unserer Patienten zeigten bei 3 der 4 Patienten Ergebnisse im Normbereich. Dies obwohl die untersuchen TRECs aus Zellen bestimmt wurden welche nicht bei Geburt, sondern im Alter von

durchschnittlich 9,5 Monaten entnommen wurden. Ob hier zukünftig ein möglicherweise höher angesetzter cut-off Wert einen positiven Einfluss auf die Erkennung von ZAP-70 Patienten hätte, muss im Rahmen zukünftiger Arbeiten untersucht werden.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse unserer Arbeit, dass eine unauffällige TREC- Untersuchung, unabhängig vom Zeitpunkt der Entnahme der Patientenprobe, das Vorliegen eines ZAP-70 Defekts nicht ausschließt. Das Vorliegen von reduzierten CD8+ T-Zellen kann als Hinweis für eine gezielte Untersuchung auf einen ZAP-70 Defekt bei Patienten mit der klinischen Präsentation eines SCID und unauffälligem Neugeborenen-Screening hilfreich sein.

4.8 Einordnung des ZAP-70 Defektes

Bezüglich der Einteilung des ZAP-70 Defektes in die heterogene Gruppe der angeborenen Immundefekte zeigt sich bei der Betrachtung der Fachliteratur ein uneindeutiges Bild. Einige Arbeiten (Melissa E. Elder 1997; Karaca u. a. 2013; Rosenberg und Larkin 2014) zählen den untersuchten ZAP-70 Defekt aufgrund des SCID-typischen klinischen Bild und seiner T-Zell-Störung mit funktionslosen T-Zellen zur Gruppe der schweren kombinierten Immundefekte, SCID. Dem gegenüber zeigt sich bei der Betrachtung der gängigen Klassifikationen der IUIS und der PIDTC (Primary immune deficiency treatment consortium) eine andere Einordnung. Für eine Einordung eines Defektes als SCID bei der IUIS wäre die CD3 T-Zell-Penie entscheidend (Bousfiha u. a. 2020), die Klassifikation des PIDTC fordert zusätzlich zur CD3-T-Zell-Penie eine eingeschränkte T-Zell-Funktion in Reaktion auf PHA (Shearer u. a. 2014). In beiden Klassifikationen kann der ZAP-70 Defekt aufgrund dieser Kriterien nicht als klassischer SCID eingeordnet werden. In der IUIS-Klassifikation wird er als kombinierter Immundefekt aufgeführt (less

severe combined immunideficiency, CID, low CD 8, normal MHC I on lymphocytes), da er das Kriterium des Mangels an T-Zellen nicht erfüllt. Bei der PIDTC wird der ZAP-70 Defekt als Leaky-SCID bezeichnet.

Die Patienten der untersuchten Kohorte, mit Ausnahme von UPN 673, zeigten alle die oben beschriebenen, SCID-typischen frühen und schweren opportunistischen Infektionen. Die schnellstmögliche Therapie in Form einer HSZT sicherte das Überleben der Patienten. Somit ergibt sich bei den hier untersuchten Patienten eine Diskrepanz zwischen der immunphänotypischen Klassifikation als CID und der klinischen Präsentation als SCID.

5 Zusammenfassung

In der bisher größten unizentrischen Kohorte von Patienten mit ZAP-70-Defekt konnten wir beim weit überwiegenden Anteil eine klinische Präsentation mit schweren Krankheitsverläufen beschreiben, die somit hinsichtlich des klinischen Aspekts eine Einordnung analog zur Gruppe der SCID (severe combined immunodeficiency) zulässt. Hierfür konnten mehrere Punkte wie die klinische Präsentation mit schweren opportunistischen Infektionen und die Möglichkeit einer HSZT (hämatopoetische Stammzell-Transplantation) ohne Konditionierung mit Engraftment allogener Stammzellen dokumentiert werden. Dies steht im Widerspruch zur aktuellen Einteilung durch die IUIS (International Union of immunological Societies) und PIDTC (Primary immune deficiency treatment consortium), die Patienten mit ZAP-70 Defekt der Gruppe der CIDs (combined immundeficiency) zuordnen.

Die nach Schweregrad durchgeführte Einteilung von Krankheitsbildern in Klassifikationen bedingt sinnvollerweise eine entsprechende Konsequenz für die weiterführende Diagnostik und Therapie. Die vorliegenden Patienten, mit Ausnahme von UPN (unique personal number) 673, präsentierten sich alle klinisch schwer erkrankt; eine zeitnahe, umfassende Diagnostik und Therapie in Form der HSZT waren unumgänglich für das Überleben der Patienten. In diesem Zusammenhang muss daher bei der Beurteilung des Krankheitsbildes eine relativierende Gewichtung sowohl des immunologischen Aspekts als auch der klinischen Präsentation erfolgen. Letztendlich bleibt unserer Meinung nach der klinische Aspekt der entscheidende Faktor um den Schweregrad der Erkrankung sinnvoll zu beurteilen und entsprechend einordnen zu können. Dementsprechend wurde der ZAP-70 Defekt in der vorliegenden Arbeit als SCID bezeichnet.

Frühere Arbeiten konnten zeigen, dass Patienten mit ZAP-70 Defekt im Rahmen des Neugeborenen-Screenings durch die TREC-Messung (T-cell

receptor excision circles) nicht erfasst werden. Dies zeigt sich anhand der Daten unserer Arbeit ebenfalls. Eine unauffällige TREC- Untersuchung schließt somit das Vorliegen eines ZAP-70 Defekts nicht aus.

Folglich sollte das Vorliegen von tiefen CD8+ (Cluster of Differentiation) Populationen und der klinischen Präsentation eines SCID eine gezielte Diagnostik für einen ZAP-70 Defekt zur Folge haben.

Die letztendlich über einen langen Zeitraum dokumentierte Behandlung und Nachbehandlung der untersuchten Patienten zeigt, dass die HSZT eine erfolgsversprechende, kurative Therapie für ZAP-70 Defekt darstellt. Wenn möglich sollte dabei eine Konditionierung durchgeführt werden. Dabei konnte beobachtet werden, dass die autologen B-Zellen mit dem etablierten Spender T-Zell-System die Etablierung einer spezifischen humoralen Immunität ermöglichen.

Schwächen dieser Arbeit sind vor allem die nach wie vor kleine Patientenkohorte die eine statistische Auswertung der erhobenen Daten nicht zulässt. Die TREC-Messung wurde mit Patientenproben welche zum Diagnosezeitpunkt entnommen wurden durchgeführt und sind somit nur eingeschränkt repräsentativ für das wenige Tage nach der Geburt durchgeführte Neugeborenen-Screening.

Neue Perspektiven ergeben sich aus weltweit koordinierten Analysen der Behandlungsverläufe von Patienten mit ZAP-70 Defekt im Rahmen von Multi-Center-Analysen.

6 Literaturverzeichnis

1. Aluri, Jahnavi, Mukesh Desai, Maya Gupta, Aparna Dalvi, Antony Terance, Sergio D. Rosenzweig, Jennifer L. Stoddard, u. a. 2019. „Clinical, Immunological, and Molecular Findings in 57 Patients With Severe Combined Immunodeficiency (SCID) From India“. *Frontiers in Immunology* 10: 23. https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00023.

2. Arpaia, E. 1994. „Defective T Cell Receptor Signaling and CD8+ Thymic Selection in Humans Lacking Zap-70 Kinase“. *Cell* 76: 947–58. https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90368-9.

3. Au-Yeung, Byron B., Neel H. Shah, Lin Shen, und Arthur Weiss. 2018. „ZAP-70 in Signaling, Biology, and Disease“. *Annual Review of Immunology* 36: 127–56. https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-042617-053335.

4. Bousfiha, Aziz, Leila Jeddane, Capucine Picard, Waleed Al-Herz, Fatima Ailal, Talal Chatila, Charlotte Cunningham-Rundles, u. a. 2020. „Human Inborn Errors of Immunity: 2019 Update of the IUIS Phenotypical Classification“. *Journal of Clinical Immunology* 40: 66–81. https://doi.org/10.1007/s10875-020-00758-x.

5. Chan, Alice Y., Divya Punwani, Theresa A. Kadlecek, Morton J. Cowan, Jean L. Olson, Erin F. Mathes, Uma Sunderam, u. a. 2016. „A Novel Human Autoimmune Syndrome Caused by Combined Hypomorphic and Activating Mutations in ZAP-70“. *Journal of Experimental Medicine* 213: 155–65. https://doi.org/10.1084/jem.20150888.

6. Courtney, Adam H., Wan-Lin Lo, und Arthur Weiss. 2018. „TCR Signaling: Mechanisms of Initiation and Propagation“. *Trends in Biochemical Sciences* 43: 108–23. https://doi.org/10.1016/j.tibs.2017.11.008.

7. Cuvelier, Geoffrey D. E., Tamar S. Rubin, Donna A. Wall, und Marlis L. Schroeder. 2016. „Long-Term Outcomes of Hematopoietic Stem Cell Transplantation for ZAP70 Deficiency“. *Journal of Clinical Immunology* 36: 713–24. https://doi.org/10.1007/s10875-016-0316-z.

8. Ege, Markus J., Catharina Schuetz, Eva-Maria Jacobsen, Susanna M. Müller-Langer, Ingrid Furlan, Mehtap Sirin, Ulrich Pannicke, u. a. 2019. „Late Thymic Deficiency after HLA-Haploidentical Hematopoietic Stem Cell Transplantation for Severe Combined Immunodeficiency“. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 143: 1623-1626.e13. https://doi.org/10.1016/j.jaci.2018.11.027.

9. Elder, M. E. 1998. „ZAP-70 and Defects of T-Cell Receptor Signaling“. *Seminars in Hematology* 35: 310–20.

10. Elder, M. E., S. Skoda-Smith, T. A. Kadlecek, F. Wang, J. Wu, und A. Weiss. 2001. „Distinct T Cell Developmental Consequences in Humans and Mice Expressing Identical Mutations in the DLAARN Motif of ZAP-70“. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 166: 656–61.

11. Elder, M., D Lin, J Clever, A. Chan, T. Hope, A Weiss, und T. Parslow. 1994. „Human Severe Combined Immunodeficiency Due to a Defect in ZAP-70, a T Cell Tyrosine Kinase“. *Science* 264: 1596–99. https://doi.org/10.1126/science.8202712.

12. Elder, Melissa E. 1997. „SCID Due to ZAP-70 Deficiency“: *Journal of Pediatric Hematology/Oncology* 19: 546–50. https://doi.org/10.1097/00043426-199711000-00014.

13. Elder, Melissa E., Thomas J. Hope, Tristram G. Parslow, Dale T. Umetsu, Diane W. Wara, und Morton J. Cowan. 1995. „Severe Combined Immunodeficiency with Absence of Peripheral Blood

CD8+ T Cells Due to ZAP-70 Deficiency“. *Cellular Immunology* 165: 110–17. https://doi.org/10.1006/cimm.1995.1193.

14. Fischer, A. 2000. „Severe Combined Immunodeficiencies (SCID)“. *Clinical and Experimental Immunology* 122: 143–49. https://doi.org/10.1046/j.1365-2249.2000.01359.x.

15. Fischer, Alain, Capucine Picard, Karine Chemin, Stéphanie Dogniaux, Françoise le Deist, und Claire Hivroz. 2010. „ZAP70: A Master Regulator of Adaptive Immunity“. *Seminars in Immunopathology* 32: 107–16. https://doi.org/10.1007/s00281-010-0196-x.

16. Gaspar, H. B., K. C. Gilmour, und A. M. Jones. 2001. „Severe Combined Immunodeficiency--Molecular Pathogenesis and Diagnosis“. *Archives of Disease in Childhood* 84: 169–73.

17. Gelfand, E. W. 1995. „Absence of ZAP-70 Prevents Signaling through the Antigen Receptor on Peripheral Blood T Cells but Not on Thymocytes“. *Journal of Experimental Medicine* 182: 1057–65. https://doi.org/10.1084/jem.182.4.1057.

18. Germain, Ronald N. 2002. „T-Cell Development and the CD4–CD8 Lineage Decision“. *Nature Reviews Immunology* 2: 309–22. https://doi.org/10.1038/nri798.

19. Grazioli, Serge, Mary Bennett, Kyla J. Hildebrand, Hilary Vallance, Stuart E. Turvey, und Anne K. Junker. 2014. „Limitation of TREC-Based Newborn Screening for ZAP70 Severe Combined Immunodeficiency“. *Clinical Immunology* 153: 209–10. https://doi.org/10.1016/j.clim.2014.04.015.

20. Halkias, Joanna, Heather J. Melichar, Kayleigh T. Taylor, und Ellen A. Robey. 2014. „Tracking Migration during Human T Cell Development“. *Cellular and Molecular Life Sciences* 71: 3101–17. https://doi.org/10.1007/s00018-014-1607-2.

21. Hönig, M., C. Schuetz, K. Schwarz, M. Rojewski, E. Jacobsen, G. Lahr, K.-M. Debatin, A. Schulz, und W. Friedrich. 2012. „Immunological Reconstitution in a Patient with ZAP-70 Deficiency Following Transfusion of Blood Lymphocytes from a Previously Transplanted Sibling without Conditioning“. *Bone Marrow Transplantation* 47: 305–7. https://doi.org/10.1038/bmt.2011.71.

22. Hönig, M., A. Schulz, und W. Friedrich. 2011. „Hematopoietic Stem Cell Transplantation for Severe Combined Immunodeficiency“. *Klinische Pädiatrie* 223: 320–25. https://doi.org/10.1055/s-0031-1287826.

23. Huse, Morgan. 2009. „The T-Cell-Receptor Signaling Network“. *Journal of Cell Science* 122: 1269–73. https://doi.org/10.1242/jcs.042762.

24. Hwang, Jeong-Ryul, Yeongseon Byeon, Donghwan Kim, und Sung-Gyoo Park. 2020. „Recent Insights of T Cell Receptor-Mediated Signaling Pathways for T Cell Activation and Development“. *Experimental & Molecular Medicine* 52: 750–61. https://doi.org/10.1038/s12276-020-0435-8.

25. Karaca, Ender, Elif Karakoc-Aydiner, Omer Faruk Bayrak, Sevgi Keles, Serhat Sevli, Isil B. Barlan, Adnan Yuksel, Talal A. Chatila, und Mustafa Ozen. 2013. „Identification of a Novel Mutation in ZAP70 and Prenatal Diagnosis in a Turkish Family with Severe Combined Immunodeficiency Disorder“. *Gene* 512: 189–93. https://doi.org/10.1016/j.gene.2012.10.062.

26. Kim, Vy Hong-Diep, Luis Murguia, Tal Schechter, Eyal Grunebaum, und Chaim M. Roifman. 2013. „Emergency Treatment for ζ Chain–Associated Protein of 70 KDa (ZAP70) Deficiency“. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 131: 1233–35. https://doi.org/10.1016/j.jaci.2012.09.020.

27. Kobrynski, Lisa J. 2021. „Newborn Screening in the Diagnosis of Primary Immunodeficiency“. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*, Juli. https://doi.org/10.1007/s12016-021-08876-z.

28. Kwan, Antonia, Roshini S. Abraham, Robert Currier, Amy Brower, Karen Andruszewski, Jordan K. Abbott, Mei Baker, u. a. 2014. „Newborn Screening for Severe Combined Immunodeficiency in 11 Screening Programs in the United States“. *JAMA* 312: 729. https://doi.org/10.1001/jama.2014.9132.

29. Mackay, Ian R., Fred S. Rosen, und Rebecca H. Buckley. 2000. „Primary Immunodeficiency Diseases Due to Defects in Lymphocytes“. *New England Journal of Medicine* 343: 1313–24. https://doi.org/10.1056/NEJM200011023431806.

30. Monafo, W. J., S. H. Polmar, S. Neudorf, A. Mather, und A. H. Filipovich. 2008. „A Hereditary Immunodeficiency Characterized by CD8 T Lymphocyte Deficiency and Impaired Lymphocyte Activation“. *Clinical & Experimental Immunology* 90: 390–93. https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.1992.tb05856.x.

31. Murphy, Kenneth M., Paul Travers, Mark Walport, Charles A. Janeway, und Michael Ehrenstein. 2014. *Janeway Immunologie*. 7., Aufl., Korrigierter Nachdr. 2014. Berlin: Springer Spektrum.

32. Negishi, Izumi, Noboru Motoyama, Kei-ichi Nakayama, Keiko Nakayama, Satoru Senju, Shigetsugu Hatakeyama, Qing Zhang, Andrew C. Chan, und Dennis Y. Loh. 1995. „Essential role for ZAP-70 in both positive and negative selection of thymocytes“. *Nature* 376: 435–38. https://doi.org/10.1038/376435a0.

33. Neven, Bénédicte, Sandrine Leroy, Hélène Decaluwe, Francoise Le Deist, Capucine Picard, Despina Moshous, Nizar Mahlaoui, u. a. 2009. „Long-Term Outcome after Hematopoietic Stem Cell Transplantation of a Single-Center Cohort of 90 Patients with Severe Combined Immunodeficiency“. *Blood* 113: 4114–24. https://doi.org/10.1182/blood-2008-09-177923.

34. Newell, Andrea, Harjit Dadi, Rachel Goldberg, Bo-Yee Ngan, Eyal Grunebaum, und Chaim M. Roifman. 2011. „Diffuse Large B-Cell Lymphoma as Presenting Feature of Zap-70 Deficiency“. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 127: 517–20. https://doi.org/10.1016/j.jaci.2010.09.016.

35. Noraz, N., K. Schwarz, M. Steinberg, V. Dardalhon, C. Rebouissou, R. Hipskind, W. Friedrich, H. Yssel, K. Bacon, und N. Taylor. 2000. „Alternative Antigen Receptor (TCR) Signaling in T Cells Derived from ZAP-70-Deficient Patients Expressing High Levels of Syk“. *The Journal of Biological Chemistry* 275: 15832–38. https://doi.org/10.1074/jbc.M908568199.

36. Ochs, MD, Dr.med, Hans D., C. I. Edvard Smith, PhD, und Jennifer M. Puck, MD, Hrsg. 2013. *Primary Immunodeficiency Diseases: A Molecular and Genetic Approach*. Oxford University Press. https://doi.org/10.1093/med/9780195389838.001.0001.

37. Palacios, Emil H., und Arthur Weiss. 2007. „Distinct Roles for Syk and ZAP-70 during Early Thymocyte Development“. *Journal of Experimental Medicine* 204: 1703–15. https://doi.org/10.1084/jem.20070405.

38. Picard, Capucine, Stéphanie Dogniaux, Karine Chemin, Zofia Maciorowski, Annick Lim, Fabienne Mazerolles, Frédéric Rieux-Laucat, u. a. 2009. „Hypomorphic Mutation of *ZAP70* in Human Results in a Late Onset Immunodeficiency and No Autoimmunity: Clinical Immunology“. *European Journal of Immunology* 39: 1966–76. https://doi.org/10.1002/eji.200939385.

39. Railey, Mary Dell, Yuliya Lokhnygina, und Rebecca H. Buckley. 2009. „Long-Term Clinical Outcome of Patients with Severe Combined Immunodeficiency Who Received Related Donor Bone Marrow Transplants without Pretransplant Chemotherapy or Post-Transplant GVHD Prophylaxis“. *The Journal of Pediatrics* 155: 834-840.e1. https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2009.07.049.

40. Ribeiro, Ruy M., und Alan S. Perelson. 2007. „Determining Thymic Output Quantitatively: Using Models to Interpret Experimental T-Cell Receptor Excision Circle (TREC) Data“. *Immunological Reviews* 216: 21–34. https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2006.00493.x.

41. Rocha, Benedita, und Corinne Tanchot. 2004. „Towards a Cellular Definition of CD8+ T-Cell Memory: The Role of CD4+ T-Cell Help in CD8+ T-Cell Responses“. *Current Opinion in Immunology* 16: 259–63. https://doi.org/10.1016/j.coi.2004.03.004.

42. Rosenberg, Stacy Lyn, und Allyson Larkin. 2014. „ZAP70-Related Severe Combined Immunodeficiency“. In *GeneReviews(®)*, herausgegeben von Roberta A. Pagon, Margaret P. Adam, Holly H. Ardinger, Stephanie E. Wallace, Anne Amemiya, Lora JH Bean, Thomas D. Bird, u. a. Seattle (WA): University of Washington, Seattle. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK20221/.

43. Shah, Kinjal, Amr Al-Haidari, Jianmin Sun, und Julhash U. Kazi. 2021. „T Cell Receptor (TCR) Signaling in Health and Disease“. *Signal Transduction and Targeted Therapy* 6: 412. https://doi.org/10.1038/s41392-021-00823-w.

44. Sharifinejad, Niusha, Mahnaz Jamee, Majid Zaki-Dizaji, Bernice Lo, Mohammadreza Shaghaghi, Hamed Mohammadi, Farhad Jadidi-Niaragh, u. a. 2020. „Clinical, Immunological, and Genetic Features in 49 Patients With ZAP-70 Deficiency: A Systematic Review“. *Frontiers in Immunology* 11 . https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00831.

45. Shearer, William T., Elizabeth Dunn, Luigi D. Notarangelo, Christopher C. Dvorak, Jennifer M. Puck, Brent R. Logan, Linda M. Griffith, u. a. 2014. „Establishing Diagnostic Criteria for Severe Combined Immunodeficiency Disease (SCID), Leaky SCID, and Omenn Syndrome: The Primary Immune Deficiency Treatment Consortium Experience“. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 133: 1092–98. https://doi.org/10.1016/j.jaci.2013.09.044.

46. Shearer, William T., Howard M. Rosenblatt, Rebecca S. Gelman, Rebecca Oyomopito, Susan Plaeger, E.Richard Stiehm, Diane W. Wara, u. a. 2003. „Lymphocyte Subsets in Healthy Children from Birth through 18 Years of Age“. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 112: 973–80. https://doi.org/10.1016/j.jaci.2003.07.003.

47. Sokolic, Robert, Chimene Kesserwan, und Fabio Candotti. 2008. „Recent Advances in Gene Therapy for Severe Congenital Immunodeficiency Diseases“: *Current Opinion in Hematology* 15: 375–80. https://doi.org/10.1097/MOH.0b013e328302c807.

48. Suresh, Sneha, Harjit Dadi, Brenda Reid, Linda Vong, Dennis E. Bulman, und Chaim M. Roifman. 2020. „Time-Dependent Decline of T-Cell Receptor Excision Circle Levels in ZAP-70 Deficiency“. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice* 8: 806-808.e2. https://doi.org/10.1016/j.jaip.2019.08.018.

49. Tagliaferri, Laura, Joachim B. Kunz, Margit Happich, Susanna Esposito, Thomas Bruckner, Daniel Hübschmann, Jürgen G. Okun, u. a. 2017. „Newborn Screening for Severe Combined Immunodeficiency Using a Novel and Simplified Method to Measure T-Cell Excision Circles (TREC)“. *Clinical Immunology* 175: 51–55. https://doi.org/10.1016/j.clim.2016.11.016.

50. Tangye, Stuart G., Waleed Al-Herz, Aziz Bousfiha, Talal Chatila, Charlotte Cunningham-Rundles, Amos Etzioni, Jose Luis Franco, u. a. 2020. „Human Inborn Errors of Immunity: 2019 Update on the Classification from the International Union of Immunological Societies Expert Committee“. *Journal of Clinical Immunology* 40: 24–64. https://doi.org/10.1007/s10875-019-00737-x.

51. Tietz, R. 1981. Age-related normal values of immunoglobulins. *The American Association for Clinical Chemistry*.

52. Toyabe, Shin-ichi, Akihiro Watanabe, Waka Harada, Tamaki Karasawa, und Makoto Uchiyama. 2001. „Specific Immunoglobulin E Responses in ZAP-70-Deficient Patients Are Mediated by Syk-Dependent T-Cell Receptor Signalling“. *Immunology* 103: 164–71. https://doi.org/10.1046/j.1365-2567.2001.01246.x.

53. Tunçbílek, E., und I. Koc. 1994. „Consanguineous Marriage in Turkey and Its Impact on Fertility and Mortality“. *Annals of Human Genetics* 58: 321–29. https://doi.org/10.1111/j.1469-1809.1994.tb00729.x.

54. Turul, Tuba, Ilhan Tezcan, Hasibe Artac, Sandra de Bruin-Versteeg, Barbara H. Barendregt, Ismail Reisli, Ozden Sanal, Jacques J. M. van Dongen, und Mirjam van der Burg. 2009. „Clinical Heterogeneity Can Hamper the Diagnosis of Patients with ZAP70 Deficiency“. *European Journal of Pediatrics* 168: 87–93. https://doi.org/10.1007/s00431-008-0718-x.

55. Valet, G. 2003. „Past and Present Concepts in Flow Cytometry: A European Perspective“. *Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents* 17: 213–22.

56. Wahn, U., R. Seger, V. Wahn, und G.A. Holländer. 2005. *Pädiatrische Allergologie und Immunologie*. 4. München: Elsevier.

57. Wang, H., T. A. Kadlecek, B. B. Au-Yeung, H. E. S. Goodfellow, L. Y. Hsu, T. S. Freedman, und A. Weiss. 2010. „ZAP-70: An Essential Kinase in T-Cell Signaling“. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2: a002279–a002279. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a002279.

58. Xiong, J., M. A. Armato, und T. M. Yankee. 2011. „Immature Single-Positive CD8+ Thymocytes Represent the Transition from Notch-Dependent to Notch-Independent T-Cell Development“. *International Immunology* 23: 55–64. https://doi.org/10.1093/intimm/dxq457.

59. Yee, Anthony, Suk See De Ravin, Elizabeth Elliott, John B. Ziegler, und Contributors to the Australian Paediatric Surveillance Unit. 2008. „Severe Combined Immunodeficiency: A National Surveillance Study“. *Pediatric Allergy and Immunology* 19: 298–302. https://doi.org/10.1111/j.1399-3038.2007.00646.x.

7 Anhang

7.1 TREC-Messung

Tabelle 9.: TREC-Messung von 4 der 7 Patienten mit ZAP-70 Defekt, für diese Arbeit im Auftrag der Universität Ulm durchgeführt durch die AG Kulozik, Universität Heidelberg; (UPN: unique personal number Universitätsklinik Ulm; Anzahl Kopien, Anzahl der Kopien unter dem cut-off pro 1,6mm Trockenblutstanze; Ct-Wert, cycle-threshold-Wert)

UPN	Alter der Patienten zum Zeitpunkt der Entnahme (Monat)	Ct-Wert	Anzahl Kopien
757	11	nicht auswertbar	-
673	1	32,3	241
557	5	31,7	320
631	7	32,7	191

Von 4 Patienten konnte eingefrorenes Zellmaterial, welches zum Diagnosezeitpunkt gewonnen wurde (vor HSZT), einer Untersuchung mit der Methode des Neugeborenen-Screenings (TREC-Messung) zugeführt werden.

Der Cut-off Wert wurde einer Grenzwertanalyse anhand von ROC-Kurven (Receiver operating characteristic) bei einem Ct-Wert (cycle-threshold-Wert) von 36 festgelegt. Der Ct-Wert für bei UPN 757 war aufgrund einer nicht auswertbaren PCR nicht darstellbar, bei den verbliebenen 3 Patienten lag der Ct-Wert mit Werten zwischen 31,7 bis 32,7 jeweils im Normalbereich.

8 Danksagung

Dank gebührt allen, die mich im Verlauf der letzten Jahre bei der Anfertigung dieser Arbeit unterstützt haben.

Besonders bedanken möchte ich mich bei meinem Doktorvater PD Dr. med. Manfred Hönig, der den Schreibprozess mit stetiger Unterstützung, Beharrlichkeit und grosser Geduld unterstützt hat.

Abschliessend meiner Mutter, die mir das Studium der Humanmedizin ermöglicht und so meinen Lebensweg gestaltet hat.

9 Lebenslauf

Philipp Friederichsen

Geburtsdatum: 28.11.1985 in Düsseldorf

Zivilstand: verheiratet
Nationalität: deutsch

Bildungsweg

2015: Staatsexamen Medizin Universität Ulm

2008: Studienbeginn Medizin, Universität Ulm

2007: Studium der Zahnmedizin, Albert-Ludwigs Universität Freiburg

2006: Studium der Biologie, Bergische Universität Wuppertal

2006: Abitur Gymnasium Essen-Werden

Berufserfahrung

2022: Oberarzt Orthopädie Schulthess Klinik Zürich (Dr. med. P. Rippstein)

2022: Stv. Oberarzt Orthopädie Schulthess Klinik Zürich (Dr. med. P. Rippstein)

2018: Assistenzarzt Orthopädie Schulthess Klinik (Prof. Dr. med. M. Leunig, Dr. med. P. Rippstein)

2015: Assistenzarzt Orthopädie/Traumatologie Spital Interlaken (Dr. med. J. Spycher)