

Universitätsklinikum Ulm
Klinik für Kinder – und Jugendmedizin
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. med. Klaus-Michael Debatin

**Rekonstitution des B-zellulären Kompartimentes nach hämatopoetischer
Stammzelltransplantation bei Patienten mit B-Zell positivem schwerem kombiniertem
Immundefekt durch genetische Varianten in *JAK3* und *IL2RG***

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

Abdallah Khazaleh

Ulm

2022

Amtierender Dekan: Professor Dr. Thomas Wirth

1. Berichterstatter: PD Dr. Manfred Hönig

2. Berichterstatter: PD Dr. Ulrich Pannicke

Tag der Promotion: 26. Mai 2023

Die Widmung wurde aus Gründen des Datenschutzes entfernt.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	III
1 Einleitung	1
1.1 Das Immunsystem	1
1.2 Schwerer kombinierter Immundefekt (SCID)	12
1.3 Hämatopoetische Stammzelltransplantation	17
1.4 Fragestellung	26
2 Material und Methoden	27
2.1 Patientenkollektiv	27
2.2 Kryokonservierung von Mononukleären Zellen	30
2.3 B-Zell Phäotypisierung	33
2.4 Statistische Auswertung	40
3 Ergebnisse	41
3.1 Immunglobulinspiegel im Patientenserum	41
3.2 Impf-Antikörper	52
3.3 Chimärismus	54
3.4 Zelluläre Subpopulationen	68
3.5 Konditionierung	77
4 Diskussion	79
4.1 Status Quo – Immunglobuline nach HSZT	80
4.2 Der Immunglobulinspiegel als prädiktiver Marker für die Notwendigkeit einer Immunglobulinsubstitution	81
4.3 Non T-cell engraftment wichtig für die Etablierung einer humoralen spezifischen Immunfunktion	83
4.4 Class-switched memory B-cells als diskriminierende Zellpopulation	85

4.5	B-Zell Funktion ist in Ausnahmefällen ohne Stammzellengraftment möglich	89
4.6	Durch eine Konditionierung gelingt bei <i>IL2RG/JAK3-SCID</i> ein besseres B-Zell Engraftment.	91
4.7	Beendigung der Immunglobulinsubstitution aufgrund der vorliegenden Ergebnisse	93
4.8	Praktikabilität der Untersuchungsmethoden im Klinikalltag	94
4.9	Limitationen und mögliche Weiterentwicklungen	95
5	Zusammenfassung	96
6	Literaturverzeichnis	97
7	Anhang	105
8	Danksagung	107
9	Lebenslauf	108

Abkürzungsverzeichnis

ADA	Adenosin Desaminase
AF	Alexa Fluor
APC	Antigen presenting cell
APC	Allophycocyanin
BAFF	B-Zell-aktivierender Faktor der TNF-Familie
BCG	Bacille Calmette-Guerin
BSA	bovines Serumalbumin
BZP	B-Zell Phänotypisierung
CA	Chimärismus-Analyse
CD	Cluster of Differentiation
CLP	common lymphoid progenitor
CMV	Cytomegalie Virus
DAMP	Damage associated molecular pattern
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonuclein acid
DNA-PKcs	Desoxyribonuclein acid dependent protein kinase, catalytic subunit
D-PBS	Dulbecco's phosphate-buffered saline
EBMT	European Society for Blood and Marrow Transplantation
ECD	Electron Coupled Dye
Fa	Firma
Fab-Region	fragment antigen binding-Region
Fc-Region	fragment crystallizable-Region
FCS	Fetales Kälberserum
FDC	Dendritische Follikelzellen
FISH	Fluoreszenz-in-situ Hybridisierung
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSC	forward scatter
g	gravitation
G-CSF	Granulocyte-Colony Stimulating Factor

GM-CSF	granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
GvHD	Graft-versus-Host-disease
HLA	Humanes Leukozytenantigen
HSZ	Hämatopoetische Stammzelle
HSZT/HSCT	Hämatopoetische Stammzelltransplantation
IF-Medium	Immunfluoreszenz-Medium
Ig	Immunglobulin
IgDEP	abhängig von Immunglobulinsubstitution
IgIND	unabhängig von Immunglobulinsubstitution
IL	Interleukin
IL2RG	interleucin-2-receptor subunit gamma
IL7RA	Interleukin 7 receptor subunit alpha
IUIS	International Union of Immunological Societies
IVIG	intravenöse Immunglobulinsubstitution
JAK3	Januskinase 3
MFD	matched family donor
MHC	Major histocompatibility Complex
MIM	Mendelian Inheritance in Man
MMFD	mismatched family donor
MNC	mononuclear cell
MSD	matched sibling donor
MUD	matched unrelated donor
MZ B-Zellen	Marginalzonen B-Zellen
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
P	Phosphat
PAMP	Pathogen-associated molecular pattern
PBS	phosphate buffered saline
PC7	Tandemfarbstoff aus PE und CyChrome7
PCR	polymerase chain reaction
PE	Phycoerythrin
Pen	Penicillin
PerCP	Peridin-Chlorophyll-protein

PNP	Purin Nukleosid Phosphorylase
RAG1/2	Recombination activating gene 1/2
ROC	receiver operating characteristic
SCID	severe combined immunodeficiency
SCIG	subkutane Immunglobulinsubstitution
sIgM	Surface Immunglobulin M
ssc	sideward scatter
STAT	signal transducer and activator of transcription
STIKO	Ständige Impfkommission
STR	short tandem repeats
Strep	Streptomycin
TRECs	T-cell receptor excision circles
TLR	Toll like Rezeptor
UPN	Patientennummer
VLE	verly low endotoxine
XLF	Cernunnos-XLF deficiency
ZAP70	zeta-chain-associated protein kinase 70

1 Einleitung

1.1 Das Immunsystem

Der Mensch ist ständig potenziell pathogenen Organismen ausgesetzt – sei es über die Atemwege, den Gastrointestinaltrakt oder über die Haut. Ob diese Organismen im menschlichen Körper eine Gefahr darstellen oder toleriert werden, hängt zum einen von der Pathogenität des Erregers und zum anderen von der Immunreaktion des Wirtes ab.

Das Immunsystem stellt ein hoch komplexes Zusammenspiel aus angeborenen unspezifischen und erworbenen spezifischen Komponenten dar. Die angeborene Immunität vermittelt eine erste schnelle Immunreaktion, während die adaptive Immunität mit ihrer Antigen-spezifischen Abwehr erst einige Tage später wirksam wird. Kleinste Abweichungen in dieser Interaktion können zu lebensbedrohlichen Erkrankungen führen.

[12]

1.1.1 Angeborene Immunität

Zur sogenannten angeborenen Immunität gehören jene Bestandteile des Immunsystems, welche in ihrer endgültigen Form bereits in der Keimbahn-DNA des Menschen codiert und für die erste schnelle Immunreaktion verantwortlich sind. [12,68]

Anatomische, chemische und physikalische Barrieren (zelluläre Verknüpfungen in der Haut, mukoziliäre Clearance der Atemwege und Schleimhäute, saures Milieu des Magens), zelluläre Bestandteile (Makrophagen, dendritische Zellen, Granulozyten, Natürliche Killer-Zellen (NK-Zellen)) und humorale Komponenten (Lipopolysaccharid-bindendes Protein, C-reaktives Protein, Akute Phase Proteine, Zytokine, Complement-System) bilden innerhalb von Minuten den ersten Verteidigungsmechanismus gegen pathogene Organismen. [68]

Trotz des im Vergleich zur adaptiven Immunität begrenzten Spektrums gelingt es dem Körper mit einer Reihe verschiedener Mechanismen, eine erste adäquate Immunreaktion auszulösen.

So können unter anderem mit Hilfe von Toll-like Rezeptoren (TLR) pathogene Mikroorganismen anhand bestimmter molekularer Muster (pathogen-associated molecular pattern, PAMP) erkannt und neutralisiert werden.

Hinweise auf eine zelluläre Schädigung wie beispielsweise der Ausstrom von Harnsäure, Kalium oder ATP in das extrazelluläre Kompartiment (damage-associated molecular

pattern, DAMP), das Hochregulieren spezifischer Proteine und das Fehlen von Selbsterkennungsmerkmalen (unter anderem major histocompatibility complex (MHC)-Molekülen, siehe unten) werden ebenfalls als potenzielle Bedrohung erkannt und es kommt zur Einleitung einer entsprechenden Immunreaktion. [68]

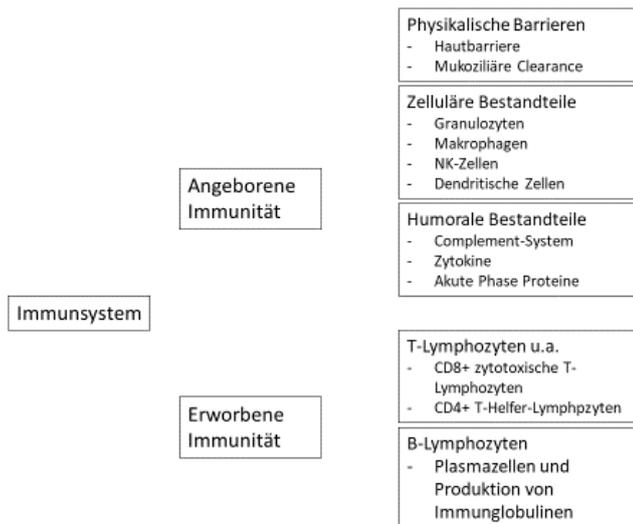


Abbildung 1 Schematische Übersicht über das Immunsystem. Das Immunsystem lässt sich in einer groben Einteilung in einen angeborenen und einen erworbenen Teil gliedern. Mit den angeborenen Komponenten gelingt es dem Körper, potenzielle Gefahren schnell und effektiv zu bekämpfen, während die erworbene Immunität für die spezifische und langfristige Abwehr verantwortlich ist. Verschiedene physikalische, chemische, zelluläre und humorale Komponenten stehen dem Organismus dabei zur Verfügung. Abkürzungen: CD: cluster of differentiation; NK-Zelle: natürliche Killerzelle.

1.1.2 Spezifische Immunität

Die spezifische Immunität gewährleistet durch T- und B-Lymphozyten einen anpassungsfähigen und spezifischen Schutz gegenüber pathogenen Organismen.

Im Gegensatz zum beschränkten Rezeptor-Repertoire des angeborenen Immunsystems hat das adaptive Immunsystem die Möglichkeit, durch Veränderungen der somatischen DNA auf Einzelzellebene (VDJ-Rekombination und somatische Hypermutation) eine theoretisch unendliche Anzahl spezifischer Strukturen (Antigene) zu erkennen und eine gezielte Abwehrreaktion einzuleiten.

Die Basis für die Entwicklung der verschiedenen Zellreihen ist hierbei die hämatopoetische Stammzelle.

1.1.2.1 Die hämatopoetische Stammzelle

Die multipotente hämatopoetische Stammzelle (HSZ) ist der gemeinsame Ausgangspunkt aller lymphatischen und myeloischen Zellreihen im menschlichen Körper. Unter dem Einfluss spezifischer Wachstumsfaktoren entstehen so aus undifferenzierten Vorläuferzellen unter anderem Lymphozyten, Erythrozyten, Thrombozyten und Granulozyten. Diese noch unreifen Zellen diversifizieren unter verschiedenen Einflüssen zu spezifischen Subpopulationen, deren Entwicklung und Funktion im weiteren Verlauf noch näher beschrieben wird. [50]

In der frühen Embryonalphase lassen sich die HSZ vor allem in Dottersack, später auch in Thymus, Milz und Leber finden, wohingegen sie bereits kurz vor der Geburt vorrangig im Knochenmark angesiedelt sind. [37,48]

Durch eine hämatopoetische Stammzelltransplantation (HSZT) ist es möglich, Stammzellen in einen fremden Organismus zu übertragen. So kann bei verschiedenen Erkrankungen mit fehlerhafter Ausreifung und Entwicklung einer oder mehrerer Differenzierungslinien der hämatopoetischen Zellen eine regelrechte Hämatopoese im Körper des Patienten wiederhergestellt werden.

Dies ist aufgrund der beinahe unbegrenzten Teilungskapazität und der Fähigkeit der Regeneration möglich. Näheres zur hämatopoetischen Stammzelltransplantation folgt im Verlauf.

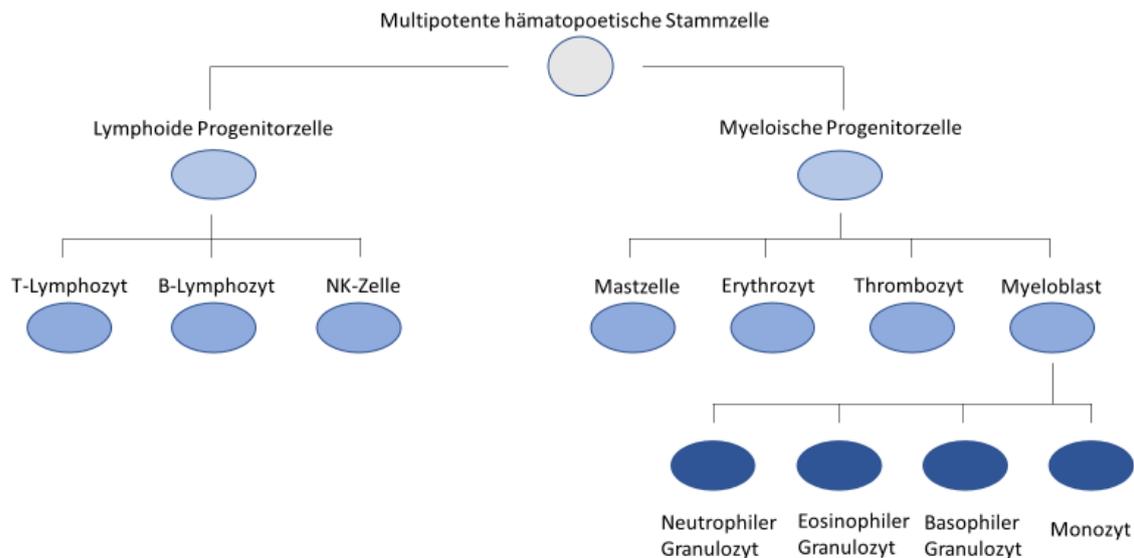


Abbildung 2 Vereinfachte Übersicht über die Hämatopoese. Aus der multipotenten hämatopoetischen Stammzelle entwickeln sich lymphoide und myeloische Progenitorzellen. Aus der lymphoiden Vorläuferzelle stammen NK-Zellen, T- und B-Lymphozyten. Aus der myeloischen Vorläuferzellen entstehen über die Zwischenstufe der Megakaryozyten (nicht abgebildet) Thrombozyten, über Retikulozyten (nicht abgebildet) Erythrozyten und Mastzellen. Aus den Myeloblasten proliferieren schließlich neutrophile, eosinophile und basophile Granulozyten sowie Monozyten, die sich zu Makrophagen (nicht abgebildet) weiterentwickeln. Der Farbverlauf stellt die Differenzierungsschritte von unreif (hell) zu differenziert (dunkel) dar. Abkürzungen: NK-Zelle: natürliche Killerzelle. [37]

1.1.2.2 T-Lymphozyten

T-Lymphozyten entwickeln sich aus lymphoiden Progenitorzellen, die aus dem Knochenmark stammen. Dies geschieht zunächst antigen-unabhängig unter dem Einfluss lokaler Faktoren im Thymus. Durch verschiedene Transkriptionsfaktoren wird die Induktion des T-Zell-Rezeptors eingeleitet. Dieser wird durch Modifikation der DNA im Rahmen der VDJ-Rekombination so verändert, dass jede T-Zelle mit einem spezifischen Rezeptor zur Erkennung eines Antigens ausgestattet wird.

Jeder T-Lymphozyt durchläuft nach der Rekombination seines Rezeptors im Thymus einen mehrstufigen Selektionsprozess. Ziel dieses Reifungsprozesses im Thymus ist, T-Zellen zu generieren, deren Rezeptoren eine breite Vielfalt an Fremdanitigen erkennen, die auf körpereigenen HLA-Molekülen präsentiert werden. Eine Immunantwort gegen körpereigene Proteine wäre für den Organismus hingegen schädlich (Autoimmunität) und soll unbedingt vermieden werden.

T-Zellen mit Rezeptoren, die Komplexe aus körpereigenen Peptiden und HLA-Molekülen mit niedriger Affinität binden, erhalten ein Überlebenssignal (sogenannte Positivselektion), wohingegen Zellen mit Rezeptoren, die HLA-Antigen-Komplexe mit hoher Affinität binden (und damit autoreaktiv sind), aussortiert werden (Negativselektion). [26]

Ungefähr 5 Prozent der ursprünglichen T-Lymphozyten überleben diese Selektionsprozesse und treten als naive T-Zellen in den Blutkreislauf über, wo sie erstmals in Kontakt mit Antigenen kommen. [4,12]

Abhängig vom bereits im Thymus determinierten Subtyp der T-Lymphozyten, werden in der Peripherie unterschiedliche immunologische Funktionen erfüllt.

Man unterscheidet T-Lymphozyten hinsichtlich spezifischer Oberflächenmoleküle, Cluster of Differentiation (CD):

- So genannte zytotoxische CD8 positive T-Lymphozyten erkennen Antigene, die über HLA-Klasse I Molekülen (siehe unten) präsentiert werden. HLA-Moleküle der Klasse I werden auf jeder kernhaltigen Zelle exprimiert und präsentieren Peptidstrukturen von intrazellulären Bestandteilen der jeweiligen Zelle. Erkennt die zytotoxische T-Zelle in der Zielzelle eine ihr präsentierte körperfremde oder im Rahmen von Neoplasien veränderte Peptidstruktur, wird innerhalb kürzester Zeit der Zelltod eingeleitet.
- CD4 positive T-Lymphozyten – so genannte T-Helfer Zellen – erkennen über HLA-Klasse II Moleküle präsentierte Peptidstrukturen, welche nur auf antigenpräsentierenden Zellen (APC) zu finden sind. Diese APC befinden sich vor allem in der Haut und in Schleimhäuten. Nachdem sie dort in Kontakt mit Antigenen gekommen sind, wandern sie in lokale Lymphknoten und präsentieren Peptidstrukturen des jeweiligen prozessierten Antigens an T-Helfer Zellen. Die Interaktion zwischen MHC/Antigen-Komplex und kompatibelem T-Zell Rezeptor führt zur Aktivierung der jeweiligen T-Zelle und löst abhängig vom Zytokin-Milieu in der unmittelbaren Umgebung und je nach Differenzierung der T-Zellen verschiedene Effekte aus. [4]

Auch B-Zellen können Antigene über HLA-Moleküle der Klasse II präsentieren und so mit T-Zellen in direkten Kontakt treten. Präsentiert eine B-Zelle ein Antigen an eine T-Zelle mit hierfür spezifischem Rezeptor, kommt es zu einer gegenseitigen

Aktivierung, die für die weitere T- und B-Zell-Entwicklung von größter Bedeutung ist.

Neben den zytotoxischen und den T-Helfer Zellen gibt es noch weitere T-Zell Subpopulationen, auf die in diesem Rahmen jedoch nicht näher eingegangen wird.

1.1.2.3 B-Lymphozyten

Die ersten Entwicklungsschritte der B-Lymphozyten finden antigenunabhängig im Knochenmark statt. So entstehen – analog zu den T-Lymphozyten – aus hämatopoetischen Vorläuferzellen nach Zusammensetzung eines spezifischen B-Zell Rezeptors unreife B-Zellen, welche sich unter anderem durch die Expression von IgM an der Zelloberfläche charakterisieren lassen.

Wie bei der T-Zell-Reifung im Thymus ist auch bei der B-Zell-Entwicklung die Negativselektion von autoreaktiven Zellen bereits im Knochenmark essenziell, um eine Immunreaktion gegen körpereigene Strukturen zu vermeiden. Bindet eine B-Zelle mit ihrem rearrangierten Oberflächen-IgM-Rezeptor (surface IgM, sIgM) hochaffin an ein Autoantigen, so wird die weitere Reifung dieser Zelle gestoppt oder modifiziert.

Im Rahmen dieser Modifikationsprozesse (sogenanntes Rezeptor-Editing) haben die autoreaktiven B-Zellen nun die Möglichkeit, durch erneute Genumlagerungen auf der leichten Kette des B-Zell Rezeptors einen neuen, nicht autoreaktiven Rezeptor zu entwickeln und anschließend den weiteren Reifungsprozess zu durchlaufen. Gelingt dies nicht, so erhält die B-Zelle kein Überlebenssignal und tritt in den Prozess des programmierten Zelltodes (Apoptose) ein. [50]

Nach diesen Reifungs- und Selektionsschritten verlässt ein kleiner Teil der unreifen B-Zellen als transitionale Zellen das Knochenmark in Richtung Milz und sekundär lymphatischer Organe. [73] Durch alternatives Splicing wird nun zudem IgD auf der Oberfläche der B-Lymphozyten als Rezeptor exprimiert. [4,61]

Auch in der Peripherie gehen diejenigen B-Zellen in Apoptose, die in den Milzfollikeln keine ausreichenden Überlebenssignale erhalten.

Ein wichtiges Signal erhält die transitionale B-Zelle unter anderem nach Interaktion mit dem B-Zell aktivierenden Faktor der TNF-Familie (BAFF), welcher vornehmlich auf dendritischen Follikelzellen (FDC) exprimiert wird. Die Interaktion von BAFF mit verschiedenen BAFF-Rezeptoren auf der Oberfläche der transitionalen B-Zelle löst eine intrazelluläre

Signalkaskade aus und stimuliert die Entwicklung zu Marginalzonen B-Zellen beziehungsweise zu folliculären B-Zellen. [11,58,61]

Beide Zellarten entstehen somit aus einer gemeinsamen Vorläuferzelle. Die Entscheidung zur Differenzierung in die eine oder andere Richtung hängt unter anderem von der Art des Antigens, an das der B-Zell-Rezeptor bindet, ab. Jedoch sind die genauen Mechanismen, die zur Auslösung verschiedener intrazellulärer Signalkaskaden führen, noch nicht gänzlich geklärt. [58]

Marginalzonen B-Zellen (MZ B-Zellen; IgM⁺, CD27⁺) finden sich überwiegend in der Milz, aber auch in Lymphknoten, Tonsillen und im lymphatischen Gewebe des Darms. Namensgebend für diese Zellpopulation ist die Marginalzone der Milz, in der sich neben den MZ B-Zellen unter anderem auch Makrophagen und dendritische Zellen aufhalten und es zur Interaktion von antigenpräsentierenden Zellen und MZ B-Zellen kommt. [46]

MZ B-Zellen sind darüber hinaus fähig, mit Hilfe ihrer Rezeptoren direkt konservierte Oberflächenstrukturen von Krankheitserregern (beispielsweise Streptococcus pneumoniae, Neisseria meningitidis oder Haemophilus influenzae) zu erkennen und eine erste unspezifische und T-Zell unabhängige Antikörperproduktion einzuleiten, bis die folliculären B-Zellen eine hochspezifische Immunabwehr etablieren können.

Es gibt jedoch auch einen Anteil von MZ B-Zellen, bei denen eine T-Zell abhängige Keimzentrumsreaktion (siehe unten) stattgefunden hat, jedoch ohne einen Klassenwechsel zu vollziehen. Somit scheinen MZ B-Zellen sowohl T-Zell abhängig als auch unabhängig ein wichtiger Baustein für die Immunität zu sein.

Die genaue Funktion von MZ B-Zellen ist noch nicht gänzlich verstanden, es scheint jedoch Hinweise darauf zu geben, dass sie auch in Bereichen wie Immundefizienz und Autoimmunität eine wichtige Rolle spielen. [11,73]

Folliculäre B-Zellen finden sich in den Follikeln der Lymphknoten bzw. der Milz und exprimieren im naiven Zustand IgM und IgD, jedoch kein CD27 auf ihrer Oberfläche.

Die Aktivierung der folliculären B-Zelle bedarf zweier Signale:

- Erstens kommen die folliculären B-Lymphozyten im Cortex der Lymphfollikel in Kontakt zu APC. Durch die Präsentation eines passenden Antigens wird in den B-Lymphozyten eine Signalkaskade ausgelöst, nach der die B-Lymphozyten in der Lage sind, mit T-Lymphozyten zu interagieren.

- Zweitens agieren die folliculären B-Lymphozyten nun selbst als APC, in dem sie die erkannte Antigen-Struktur nach Internalisierung über MCH-Klasse II Moleküle exprimieren. Passende CD4⁺ T-Helfer-Lymphozyten wiederum erkennen diese Antigen-Struktur und aktivieren die B-Lymphozyten für die weitere Differenzierung. Anschließend wandern aktivierte folliculäre B-Zellen in das Keimzentrum der Lymphfollikel, in welchem antigenspezifische B-Zell Klone expandieren und sich je nach Zytokinexpression in memory B-cells oder Plasmazellen differenzieren. [4,59,73]

Memory B-cells wechseln im Rahmen des Klassenwechsels den exprimierten B-Zell Rezeptor-Isotypen nicht zufällig, sondern unter dem Einfluss von Antigenen, der dadurch ausgelösten Signalkaskaden und dem lokalen Milieu von Zytokinen. [61]

Während unreifere Vorstufen vorrangig Rezeptoren vom Typ IgM und IgD tragen, exprimieren class-switched memory B-cells nun vor allem IgG oder IgA und sind zudem CD27 positiv (IgM⁻ CD27⁺). [73]

Ein Teil der aktivierten B-Zellen entwickelt sich unter dem Einfluss von Interleukin 10 (IL10) und Interleukin 21 (IL21) zu Plasmazellen, welche sich im Knochenmark ansiedeln und durch die Produktion von Immunglobulinen für eine langfristige humorale Immunität sorgen. [50,59]

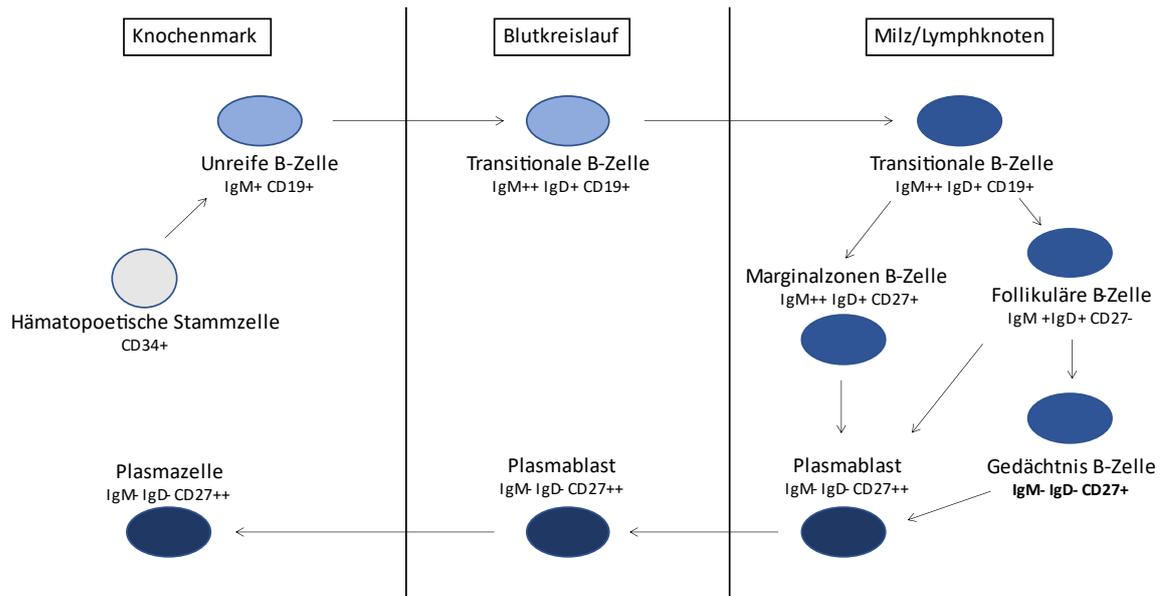


Abbildung 3 Vereinfachte Darstellung der B-Zell Entwicklung im Knochenmark und in den lymphatischen Organen. Aus der hämatopoetischen Stammzelle entwickelt sich nach einigen Differenzierungsstufen eine unreife B-Zelle, welche nach Selektionsprozessen als transitionale B-Zelle das Knochenmark verlässt und in die Milz oder in Lymphknoten migriert. Transitionale B-Zellen tragen zu diesem Zeitpunkt IgM bzw. IgD auf ihrer Oberfläche. Abhängig von der Interaktion der transitionalen B-Zellen mit Antigenen und der Stimulation von intrazellulären Signalkaskaden, entwickeln sie sich zu follikulären bzw. Marginalzonen B-Zellen. Über weitere Differenzierungsschritte (siehe Text) reifen diese nun zu Gedächtnis B-Zellen (memory b-cells), welche CD27 auf ihrer Oberfläche tragen und im weiteren Verlauf im Rahmen des Isotypenswitchs den Subtyp ihres B-Zell Rezeptors verändern (class-switched memory b-cell). Als Plasmablasten migriert ein Teil der Gedächtnis B-Zellen nun ins Knochenmark, wo sie als Plasmazellen für die langfristige Produktion und Sekretion von Immunglobulinen verantwortlich sind. [11,73] Abkürzungen: IgM bzw. IgD: Immunglobulin M bzw. D; CD: cluster of differentiation; +: positiv; -: negativ. Der Farbverlauf von hell (unreif) zu dunkel (differenziert) spiegelt die Entwicklungsschritte der Zellen wider. Die Pfeile zeigen jeweils den Verlauf der Entwicklung in die jeweilige Zielzelle an.

1.1.2.4 Immunglobuline

Immunglobuline (Ig) sind Glykoproteine, die aus zwei schweren und zwei leichten Ketten mit jeweils konstanten und variablen Domänen aufgebaut sind und von Plasmazellen sezerniert werden.

Jeweils eine variable Domäne der beiden Ketten bilden die Antigenbindungsstelle (fragment antigen binding (Fab)-Region) eines Immunglobulins. Durch VDJ-Rekombination beziehungsweise somatischer Hypermutation gelingt es, eine nahezu unendliche Vielfalt im Bereich der Antigenbindungsstelle zu erreichen.

Der konstante Teil der schweren Kette bestimmt den Immunglobulin-Isotyp. Die sogenannte Fc (fragment crystallizable) - Region ist verantwortlich für die Interaktion mit Fc-Rezeptoren auf der Oberfläche verschiedener Zellen und den Bestandteilen des Complement-Systems.

Man unterscheidet 5 Isotypen, die teilweise auch weitere Subtypen aufweisen: [61]

- IgM – ein pentameres und sehr großes Protein – wird beim ersten Kontakt mit Antigenen gebildet und ist somit der Nachweis für eine akute Immunreaktion. Zudem spielt es eine wichtige Rolle in der Aktivierung der Complement-Kaskade.
- IgG ist die dominante Isoform im menschlichen Körper und wird in der sekundären Phase einer Immunreaktion sezerniert. Der Nachweis spezifischer IgG-Antikörper ist ein Hinweis für eine durchgemachte Infektion. Durch seine Plazentagängigkeit ist IgG zudem elementar für den Nestschutz des Neugeborenen.
- IgD wird zusammen mit IgM auf naiven B-Zellen als B-Zell Rezeptor präsentiert und liegt in sezernierter Form nur in geringen Mengen vor. Die Funktion von IgD ist noch nicht gänzlich verstanden.
- IgA wird unter anderem auf Schleimhäuten, den Atemwegen und dem Magen-Darm-Trakt sezerniert und schützt dort vor Erregern. Zudem ist IgA ein Bestandteil der Muttermilch und hat protektive Effekte für das Neugeborene. [76]
- IgE dient dem Schutz gegenüber Parasiten und spielt eine große Rolle bei Allergien, da es mit hoher Affinität unter anderem an Mastzellen bindet und dadurch deren Degranulation auslösen kann.

Die Spezifität des membrangebundenen B-Zell Rezeptors entspricht der des jeweils durch die B-Zelle sezernierten Antikörpers.

Leiden Patienten an einem Immunglobulinmangel – egal welche Erkrankung dafür ursächlich ist – können ihnen intravenös oder subkutan Immunglobuline substituiert werden. Die Immunglobuline – vorrangig IgG – werden aus gepoolten Plasmaspenden zahlreicher Spender gewonnen, um eine möglichst große Anzahl von Krankheitserregern zu neutralisieren. [38]

1.2 Schwerer kombinierter Immundefekt (SCID)

Schwere kombinierte Immundefekte (im Englischen severe combined immunodeficiency, im weiteren Verlauf als SCID abgekürzt) sind eine heterogene Gruppe seltener Erkrankungen, die sich durch eine mangelnde Funktion oder Abwesenheit von T-, B-, oder NK-Zellen auszeichnen und unbehandelt in den ersten Lebensjahren letal verlaufen. [64]

„Kombiniert“ bedeutet, dass bei betroffenen Patienten sowohl die spezifische zelluläre als auch humorale Immunfunktion gestört ist. Es sind mehrere monogenetische Defekte bekannt, die ursächlich für einen SCID sein können. Diese werden nach der International Union of Immunological Societies (IUIS) in Klasse 1 zusammengefasst (vgl. Tabelle 1 und Tabelle 12). [5,13,64,66]

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Schwerpunkt auf die Untersuchung einer Patientenkohorte gelegt, bei denen sich eine Mutation im Gen der Januskinase 3 (*JAK3*; Phenotype MIM (Mendelian Inheritance in Man) number 600802) oder der gemeinsamen Kette der Interleukin-Rezeptoren (common gamma chain bzw. interleucin-2 receptor subunit gamma, *IL2RG*; Phenotype MIM number 300400) – der in Mitteleuropa häufigsten SCID-Entität – nachweisen lässt.

Tabelle 1 Übersicht über die Gene, welche für einen (schweren) kombinierten Immundefekt ursächlich sein können. Maßgeblich für die Einteilung ist die Klassifizierung der International Union of Immunological Societies. [66] Abkürzungen: (S)CID: (schwerer) kombinierter Immundefekt; T^{B+}: immunologischer Phänotyp, der fehlende T-Zellen, aber nachweisbare B-Zellen beschreibt; T^{B-}: immunologischer Phänotyp, der das Fehlen von T- und B-Zellen beschreibt. Ein Abkürzungsverzeichnis ist aus Gründen der Übersichtlichkeit im Anhang in Tabelle 12 aufgeführt.

Schwerer kombinierter Immundefekt (SCID)		Kombinierter Immundefekt, milder ausgeprägt als SCID		
T ^{B+} - SCID	T ^{B-} - SCID			
<i>IL2RG</i>	<i>RAG1/2</i>	<i>CD40LG</i>	<i>IKZF1</i>	<i>CARD11</i>
<i>JAK3</i>	<i>DCLRE1C (Artemis)</i>	<i>CD40</i>	<i>DOCK8</i>	<i>BCL10</i>
<i>IL7R</i>	<i>PRKDC</i>	<i>ICOS</i>	<i>DOCK2</i>	<i>IL21</i>
<i>PTPRC</i>	<i>NHEJ1</i>	<i>ICOSLG</i>	<i>POLD1/2</i>	<i>IL21R</i>
<i>CD3D</i>	<i>LIG4</i>	<i>CD3G</i>	<i>RHOH</i>	<i>TNFRSF4</i>
<i>CD3E</i>	<i>ADA</i>	<i>CD8A</i>	<i>STK4</i>	<i>IKKB</i>
<i>CD3Z</i>	<i>AK2</i>	<i>ZAP-70</i>	<i>TRAC</i>	<i>MAP 3 K14</i>
<i>CORO1A</i>	<i>RAC2</i>	<i>TAP1/2, TAPBP, B2M</i> (MHC Klasse I)	<i>LCK</i>	<i>RelB</i>
<i>LAT</i>		<i>CITA, RFXANK, RFX,</i> <i>RFXAP (MHC Klasse II)</i>	<i>ITK</i>	<i>RelA</i>
			<i>MALT1</i>	<i>MSN</i>
		<i>TFRC</i>	<i>REL</i>	<i>FCHO1</i>

Alle SCID-Entitäten haben die Gemeinsamkeit einer schweren primären Störung der T-Zell-Entwicklung oder T-Zell-Funktion. Die B-Zell-Entwicklung kann primär gestört sein und B-Zellen können sich somit gar nicht erst entwickeln (sog. B⁻ SCID, z.B. durch genetische Varianten in *RAG1/2* oder *DCLRE1C*, vgl. Tabelle 1 und 12 und Abbildung 4). Bei B⁺ SCID-Entitäten können B-Zellen im Blut nachgewiesen werden. Diese sind bei Patienten mit genetischen Varianten in *JAK3* und *IL2RG* jedoch primär defizient, wohingegen bei anderen B⁺ SCID-Entitäten (z.B. *IL7RA* oder *CD3D*, vgl. Tabelle 1 und 12 und Abbildung 4) eine sekundäre B-Zell Defizienz aufgrund fehlender T-Zell-Hilfe besteht.

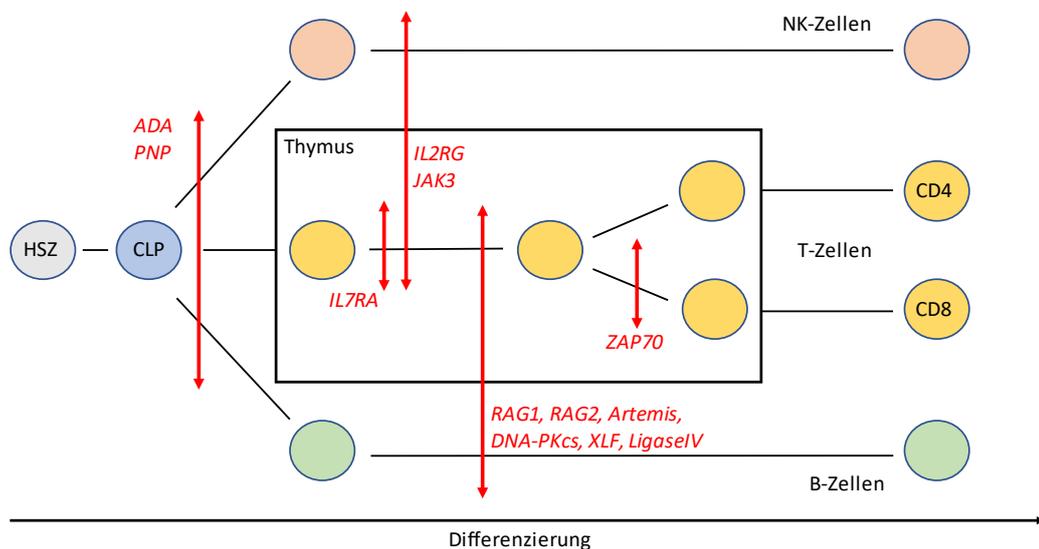


Abbildung 4 Pathophysiologie im Rahmen der Lymphopoese für verschiedene SCID-Entitäten. Die Abbildung zeigt die Lymphopoese ausgehend von der hämatopoetischen Stammzelle. Über gemeinsame lymphatische Progenitorzellen entwickeln sich die verschiedenen Effektorzellen. In roter Schrift sind die Gene dargestellt, deren Funktionsausfall zum Entwicklungsarrest in Position der roten Pfeile führt. So können bei *JAK3* oder *IL2RG* Mutationen keine funktionsfähigen T- und NK-Zellen ausreifen, was zum entsprechenden immunologischen Phänotyp (T-NK⁻B⁺-SCID) führt. Bei SCID-Entitäten wie der *RAG1/2*-Defizienz ist auch die B-Zell Entwicklung fehlerhaft, weshalb bei diesen Patienten auch keine B-Lymphozyten nachweisbar sind (T-NK⁻B⁻-SCID).[23] Abkürzungen: HSZ: hämatopoetische Stammzelle; CLP: common lymphoid progenitor; NK-Zellen: natürliche Killerzellen; CD: cluster of differentiation; ADA: Adenosin Deaminase; PNP: Purin Nukleosid Phosphorylase; *IL7RA*: Interleukin 7 Rezeptoruntereinheit alpha; *IL2RG*: Gemeinsame Unterheit der Interleukinrezeptoren; *JAK3*: Januskinase 3; *RAG1/2*: Recombination activating gene 1/2; DNA-PKcs: Desoxyribonuclein acid dependent protein kinase, catalytic subunit; XLF: Cernunnos-XLF deficiency; *ZAP70*: zeta-chain-associated protein kinase 70. Rote Zellen entsprechen natürlichen Killerzellen, gelbe Zellen T-Zellen und grüne Zellen B-Zellen. Die Differenzierung der jeweiligen Zellen findet von links nach rechts statt.

1.2.1 Pathogenese

Die von *IL2RG* und *JAK3* codierten Proteine spielen in der Signaltransduktion von Zytokinrezeptoren eine wichtige Rolle.

So codiert *IL2RG* für die common gamma chain – die gemeinsame Rezeptoruntereinheit des Rezeptorkomplexes für IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 und IL-21. Zusammen mit einem für das jeweilige Interleukin spezifischen Rezeptoranteil wird so ein Rezeptorkomplex assembliert, der für die Signaltransduktion der Interleukine verantwortlich ist. Ohne die common gamma chain können die jeweiligen Interleukine nicht an ihre spezifischen Rezeptoren binden und es kommt somit zu einem Ausfall der Signaltransduktion (vergleiche Abbildung 5).

Aufgrund der Lokalisation des Gens auf dem X-Chromosom wird eine Fehlfunktion der common gamma chain auch als „X-linked SCID“ bezeichnet – der in Mitteleuropa und Nordamerika häufigsten genetischen Entität der schweren kombinierten Immundefekte, die aufgrund des Erbgangs folglich nur bei Jungen auftritt. [7,39,72]

Das Gen *JAK3* codiert für die Tyrosinkinase Janus Kinase 3, welche unter anderem von T- und NK-Zellen exprimiert wird. Die Janus Kinase 3 ist funktionell eng mit der common gamma chain assoziiert und gibt das Signal nach Bindung der jeweiligen Interleukine an ihren Rezeptorkomplex ins Zellinnere weiter.

Mutationen von *JAK3* und *IL2RG* präsentieren sich aufgrund der gemeinsamen Endstrecke der intrazellulären Signaltransduktion in ihrer klinischen Ausprägung identisch, was für das weitere Verständnis dieser Arbeit von Relevanz ist (vergleiche Abbildung 5). [21]

Die Funktion der jeweiligen Interleukine im Rahmen der Signaltransduktion kann Abbildung 5 entnommen werden. Für das Verständnis der Ergebnisse dieser Arbeit ist Interleukin 21 von besonderer Bedeutung, da IL-21 in der Interaktion von T- und B-Zellen eine wichtige Rolle einnimmt. Das von T-Zellen sezernierte IL-21 führt nach Bindung an seinen Rezeptor an der Zelloberfläche von B-Zellen zu deren Proliferation und Differenzierung zu Plasmablasten. Bei Fehlen der Signaltransduktion der common gamma chain kann IL-21 die Differenzierung der B-Lymphozyten nicht induzieren und es kommt somit zum Ausfall des für die B-Zell-Funktion elementaren Entwicklungsschrittes. [47,59]

Dies spiegelt sich im Immunphänotyp der Patienten von *JAK3/IL2RG*-SCID (T^- NK^- B^+ - SCID: keine T- und NK-Zellen; vorhandene, aber funktionslose B-Zellen; siehe auch Abbildung 5) wider. [57]

Neben dem völligen Funktionsverlust der Gene gibt es Patienten, bei denen eine sogenannte hypomorphe Mutation vorliegt. Bei diesen Patienten sind mildere Krankheitsverläufe mit partieller Funktion der autologen Zellen beschrieben. [10,15,20]
 Im Rahmen dieser Arbeit wurden allerdings nur Patienten mit dem klinischen Bild eines schweren kombinierten Immundefekts untersucht.

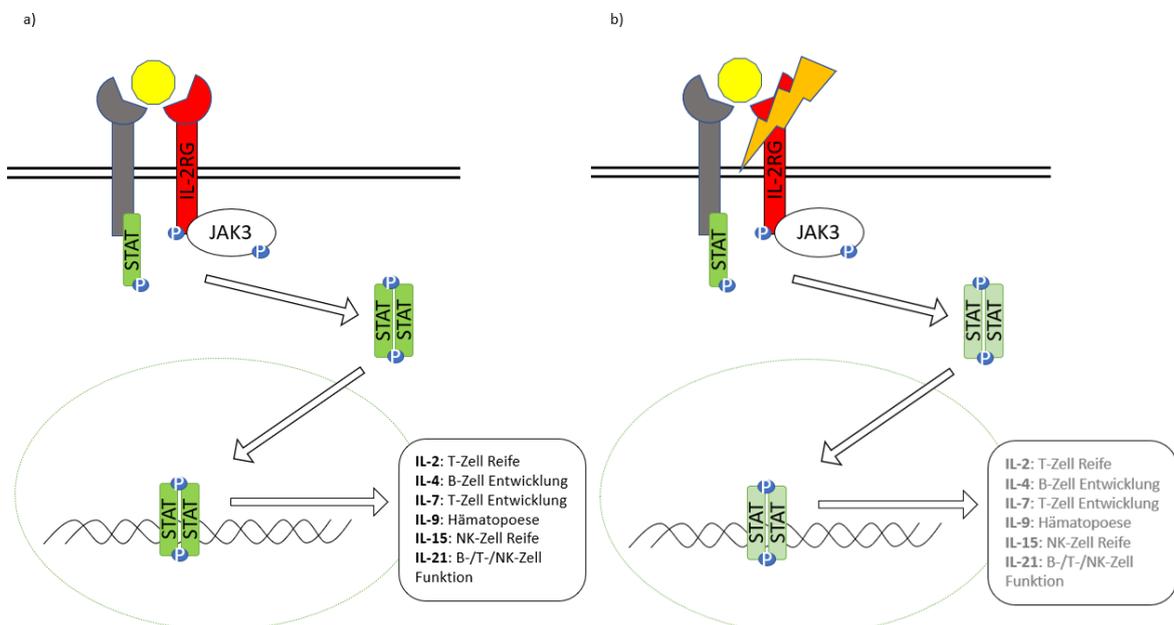


Abbildung 5 Darstellung der intrazellulären Signaltransduktion von Interleukinrezeptoren, der common gamma chain (IL-2RG) und der Januskinase 3 (JAK3) sowie der Auswirkungen verschiedener Interleukine im Rahmen der Lymphopoese. a) Nach Bindung eines Liganden an einen Interleukinrezeptorkomplex (bestehend aus der common gamma chain (IL-2RG, rot dargestellter Anteil des Rezeptors) und einem spezifischen Interleukinrezeptoranteil (grau dargestellter Anteil des Rezeptors)) wird JAK-3 phosphoryliert (P) und phosphoryliert wiederum weitere Moleküle in der Signaltransduktion (STAT-Moleküle). Dadurch kommt es zur Aktivierung von STAT-Molekülen, welche daraufhin dimerisieren und in den Zellkern wandern, wo sie je nach Stimulus die Expression von verschiedenen Genen regulieren. b) Im Falle eines Funktionsausfalls von IL-2RG oder JAK-3 kommt es zur Unterbrechung der Signaltransduktion und zur ausbleibenden Genexpression. Infolgedessen kommt es bei Patienten mit Defekten in IL-2RG und JAK-3 zu mangelnder Entwicklung und Reife von T-, B- und NK-Zellen. Abkürzungen: IL-2RG: gemeinsame Untereinheit der Interleukinrezeptoren bzw. common gamma chain; JAK3: Januskinase 3; STAT: signal transducer and activator of transcription; IL: Interleukin; P: Phosphat. Die hellere Färbung der STAT-Moleküle in Abbildung b) soll die Unterbrechung der Signaltransduktion darstellen.

1.2.2 Klinische Ausprägung

Führendes Symptom der Patienten mit SCID ist eine pathologische Infektanfälligkeit. In der aktuellen S2k Leitlinie zur Diagnostik von primären Immundefekten kann mit Hilfe des Akronyms „ELVIS“ (Erreger, Lokalisation, Verlauf, Intensität, Summe; vgl. Tabelle 2) die Einschätzung einer pathologischen Infektanfälligkeit vereinfacht werden. [19]

Wie bereits erwähnt, kann durch eine genetische Variante mit Restfunktion (hypomorphe Mutation) die klinische Ausprägung deutlich variieren.

Tabelle 2 Akronym „ELVIS“ zur Detektion einer pathologischen Infekthäufung. [19] Abkürzungen: BCG: Bacille Calmette-Guerin, Tuberkulose-Impfstoff; CMV: Cytomegalie-Virus.

Erreger	Infektion durch opportunistische Erreger (Pneumocystis jirovecii, CMV), Candida albicans)
Lokalisation	Atypische Lokalisation (geschwollene und indurierte Impfstelle nach BCG-Impfung)
Verlauf	Protrahierter Verlauf (chronische und rezidivierende Infekte)
Intensität	Schweregrad der Infektion
Summe	Subjektive und objektive Infekthäufung

Neben der beschriebenen pathologischen Infektanfälligkeit können Phänomene der Immundysregulation, Gedeihstörungen, Auffälligkeiten in der Familienanamnese, Blutbildveränderungen, maligne oder syndromale Erkrankungen, neurologische Symptome sowie ein fehlender Thymus ein Hinweis für das Vorliegen eines Immundefektes sein.

Zur frühzeitigen Identifikation von Patienten mit schweren T-Zell-Defekten möglichst vor der ersten schweren Infektion oder anderen klinischen Zeichen wurde am 1. August 2019 in Deutschland das Neugeborenen Screening für diese Erkrankungen eingeführt.

Der Test beruht auf einer quantitativen PCR, die so genannte T-cell receptor excision circles (TRECs) im Blut der Patienten nachweist. TRECs sind zirkuläre DNA-Fragmente, die bei dem genetischen Rearrangement des T-Zell Rezeptors entstehen. TRECs sind somit ein Biomarker, der mit der Zahl naiver T-Zellen korreliert.

Sind keine TRECs nachweisbar, so besteht ein hochgradiger Verdacht auf das Fehlen von naiven T-Zellen und somit auf einen schweren kombinierten Immundefekt. [62]

1.3 Hämatopoetische Stammzelltransplantation

Die Hämatopoetische Stammzelltransplantation (HSZT) ist eine therapeutische Option für eine Vielzahl hämatologischer, onkologischer und immunologischer Erkrankungen mit dem Ziel, das gesamte blutbildende System dauerhaft durch Zellen eines gesunden Spenders zu ersetzen.

Da ein schwerer kombinierter Immundefekt unbehandelt meistens im ersten Lebensjahr letal endet, ist eine möglichst schnelle Stammzelltransplantation nach Diagnosestellung indiziert. [21]

Man unterscheidet abhängig vom Spender der Stammzellen zwei Arten der Stammzelltransplantation. Bei der autologen HSZT stammen die Stammzellen vom Empfänger selbst, wohingegen bei der allogenen HSZT die Stammzellen von einem gesunden Spender transplantiert werden. Im Folgenden wird der Schwerpunkt auf die allogene HSZT gelegt, da diese für die im Rahmen dieser Arbeit betrachteten SCID-Patienten aktuell mit einem Gesamt-Überleben von 70 bis 80% die einzige kurative Therapieoption darstellt. [32] Bei genetischen Erkrankungen ist eine Therapie mit autologen Stammzellen nur nach einer genetischen Korrektur oder anderen genetischen Manipulationen des Defektes prinzipiell sinnvoll. Momentan werden gentherapeutische Studien bei Patienten mit *IL2RG*-Defizienz durchgeführt, sind jedoch noch nicht klinischer Standard. Seit 2016 gibt es für eine andere SCID-Entität – die ADA-Defizienz – eine zugelassene Gentherapie. [22,24,45]

Der folgende Abschnitt ist gegliedert in die Phase vor der HSZT, den Ablauf der HSZT und die Nachsorgephase. Es soll bei der Beschreibung ein besonderer Schwerpunkt auf die für diese Arbeit wichtigen Aspekte gelegt werden.

1.3.1 Vorbereitungsphase

1.3.1.1 Spendersuche / HLA-System

Nach Indikationsstellung zur HSZT beginnt neben aufwändigen Voruntersuchungen (unter anderem virologische, mikrobiologische und immunologische Diagnostik und die Implantation eines zentralen Katheters) die Suche nach einem passenden Spender in der Familie und gegebenenfalls in nationalen und internationalen Registern.

Das wichtigste Kriterium bei der Suche nach einem passenden Spender ist eine Übereinstimmung der Humanen Leukozyten Antigen-Merkmale (HLA-Merkmale).

Das Humane Leukozytenantigen-System (HLA-System) – die humane Form des Major Histocompatibility Complex (MHC) - ist eine Gruppe von Genen, die eine zentrale Bedeutung in der Funktion des Immunsystems innehat.

Diese Gene befinden sich auf dem kurzen Arm von Chromosom 6 und zeichnen sich durch einen hohen genetischen Polymorphismus aus. Sie werden kodominant vererbt und sind zuständig für die Expression membrangebundener Glykoproteine, die Peptidstrukturen an T-Zellen präsentieren (siehe 1.1.2., HLA-Moleküle Klasse 1 und 2). [67]

Das HLA-System lässt sich in drei Klassen unterteilen, wobei Klasse 1 und 2 eine wichtige Rolle in der Transplantationsimmunologie spielen.

Man unterscheidet bei den Molekülen der Klasse 1 (HLA-A, HLA-B, HLA-C) und der Klasse 2 (HLA-DP, HLA-DQ, HLA-DR) verschiedene Allel-Varianten, die in Kombination einen individuellen Haplotyp ergeben und aufgrund der gemeinsamen Lage auf Chromosom 6 gekoppelt vererbt werden.

Nachkommen erhalten nach dem Mendelschen Gesetz jeweils ein Allel der jeweiligen HLA-Gene von einem Elternteil. Da jeder Mensch zwei HLA-Allele besitzt, besteht zu 25% die Chance, dass zwei Geschwister identische HLA-Allele besitzen (sog. matched sibling donor). Die größtmögliche Übereinstimmung der HLA-Allele von Spender und Empfänger ist der wichtigste Faktor bei der Suche nach einem passenden Spender. Die physiologische Funktion der HLA-Moleküle ist die Erkennung fremder Antigenstrukturen und die Einleitung einer Immunreaktion über Effektorzellen.

Haben Spender und Empfänger nur ein gemeinsames Allel und somit ein nur zur Hälfte übereinstimmendes HLA-Profil, spricht man von einer haploidentischen Transplantation. In diesem Fall besteht die Gefahr, dass die körpereigenen Antigene von allogenen

Spenderzellen als fremd erkannt werden und eine gegen den Wirt gerichtete Immunreaktion (sogenannte graft versus host-Reaktion) auslösen.

Abhängig von der Übereinstimmung der HLA-Merkmale werden verschiedene Spendertypen unterschieden:

- Matched family donor (MFD): Elternteil oder anderes Familienmitglied mit identischem HLA-Profil
- Matched sibling donor (MSD): Schwester oder Bruder mit identischem HLA-Profil
- Mismatched family donor (MMFD): Familienmitglied mit nicht identischem HLA-Profil
- Matched unrelated donor (MUD): Fremdspender mit identischem HLA-Profil

Das beste Outcome (gemessen an dem krankheitsfreien Überleben – disease free survival) nach HSZT ist für viele Erkrankungen mit einer Spende eines matched sibling donors assoziiert. [16,55]

1.3.1.2 Entnahme der Stammzellen

Für die Entnahme der Stammzellen aus dem Organismus des Spenders gibt es verschiedene Möglichkeiten: [30]

- Entnahme aus dem Knochenmark (bone marrow) – hier werden die Stammzellen aus dem Beckenkamm des Spenders aspiriert.
- Periphere Stammzellen (peripheral blood stem cells) – hierfür wird der Spender mit stimulierenden Wachstumsfaktoren (G-SCF) behandelt und die sich nun vermehrt im Blut befindlichen Stammzellen können über eine sogenannte Apherese aus dem peripheren Blut gewonnen werden.
- Nabelschnurblut (umbilical cord blood) – meist ungerichtete Entnahme der Stammzellen aus dem Nabelschnurblut zur Lagerung in sogenannten Nabelschnurbanken.

1.3.2 Die Hämatopoetische Stammzelltransplantation

1.3.2.1 Vorbereitung und Durchführung

Bevor die Stammzelltransplantation durchgeführt werden kann, müssen im Körper des Empfängers die optimalen Bedingungen für das Transplantat geschaffen werden.

Im Rahmen der Konditionierung werden die nicht funktionsfähigen Zellen des Empfängers vernichtet, um den neu einwachsenden Stammzellen des Spenders ausreichend Platz zur Verfügung zu stellen und funktionelle Nischen im Knochenmark des Empfängers zu schaffen. Zudem wird das Immunsystem des Empfängers weitestgehend ausgeschaltet, um eine mögliche Abstoßungsreaktion zu verhindern bzw. abzuschwächen. Bei malignen Erkrankungen kommt die Komponente der antileukämischen Wirkung als Ziel der Konditionierung hinzu. [30]

In der Regel erfolgt die Konditionierung im Rahmen einer Hochdosis-Chemotherapie, jedoch wird das Konditionierungsprotokoll individuell nach den Bedürfnissen des Patienten und den Eigenschaften des Transplantates bestimmt. [27,32]

Anschließend wird das Transplantat meist intravenös infundiert. Die Stammzellen erreichen mit Signalen verschiedener Chemokine das Knochenmark, wo sie nach Interaktion mit lokalen Zellen, Adhäsionsmolekülen und Wachstumsfaktoren einwachsen (sogenanntes Engraftment, siehe folgender Abschnitt). [30]

1.3.2.2 Immunrekonstitution

Im Anschluss an die Konditionierung kommt es zur sogenannten Aplasie, in der es zu einem Mangel aller drei Blutzellreihen kommt, da das Empfänger-Knochenmark durch die Konditionierung zerstört wurde und das Spender-Knochenmark noch nicht funktionsfähig ist. In diesem Zeitraum erhalten die Patienten prophylaktisch Antiinfektiva und bedarfsgerechte Transfusionen.

Ungefähr 8 bis 24 Tage nach der HSZT lassen sich erste neutrophile Granulozyten im Blut des Empfängers nachweisen, anschließend zeigt sich auch ein Anstieg der Thrombozyten und Erythrozyten. [53]

Den Prozess des Anwachsens des Transplantats in die freien Nischen des Knochenmarks und die Proliferation der Spenderzellen, die zu einer Erholung des peripheren Blutbildes führt, nennt man Engraftment.

Mit sogenannten Chimärismus-Analysen kann untersucht werden, ob es sich bei den Zellen des sich regenerierenden Knochenmarks um Zellen des Spenders oder Empfängers handelt (siehe 1.3.3).

Der Nachweis von myeloischen Spenderzellen (Granulozyten, Monozyten, Erythrozyten) in peripherem Blut ist eine sehr gute Möglichkeit, das Engraftment des Transplantats im Knochenmark des Empfängers widerzuspiegeln, da diese Zellen kurzlebig sind und kontinuierlich aus dem Knochenmark produziert werden. [29]

Laut Handbuch der European Society for Blood and Marrow Transplantation (EBMT) spricht man von einem erfolgten Engraftment, wenn man beim Patienten an drei aufeinanderfolgenden Tagen mehr als $0,5 \times 10^9$ /Liter Neutrophile Granulozyten, mehr als 20×10^9 /Liter Thrombozyten und mehr als 80g/Liter Hämoglobin (ohne die Notwendigkeit von Transfusionen) nachweisen kann. [69]

Etwa 100 Tage nach der HSZT lassen sich erstmals im Thymus des Empfängers gereifte (definiert als $CD45RA^+CCR7^+$) naive Spender-T-Zellen im Blut des Empfängers nachweisen. [8] Diese Zellen haben im Empfänger die Schritte der positiven und negativen Selektion durchlaufen (vgl. Kapitel 1.1.2.2.). Mit dem Transplantat werden jedoch auch reife (im Spenderthymus selektierte) T-Zellen übertragen, die peripher im Blutkreislauf des Empfängers expandieren können (sogenanntes peripheres T-Zell Engraftment). [25,32,34] Für das Überleben von Patienten mit SCID nach einer HSZT ist die Etablierung eines T-Zell-Systems entscheidend und führt zur Überwindung bestehender und zum Schutz vor zukünftigen schweren (opportunistischen) Infektionen. Der Nachweis von Spender T-Zellen im Blut des Empfängers reicht also nicht aus, um von einem erfolgten Stammzellengraftment auszugehen, da T-Zellen nicht zwingend aus im Knochenmark des Empfängers produzierten Vorläufern abstammen müssen.

Die Rekonstitution des B-Zell Kompartments ist bei Patienten mit SCID für das Überleben nicht entscheidend, da Immunglobuline exogen substituiert werden können. Die Ausreifung des B-Zell-Systems benötigt oft mehr Zeit und ist zudem eng an die Erholung der T-Zell-Funktion gebunden. Eine verzögerte oder unzureichende T-Zell Rekonstitution kann somit die B-Zell Rekonstitution indirekt verzögern. [32]

Bei isolierten T-Zell Defekten ist das Engraftment von Spender T-Zellen zunächst ausreichend, da diese die funktionsfähigen B-Zellen des Empfängers aktivieren können.

Bei *JAK3/IL2RG*-SCID Patienten wirkt sich der molekulare Defekt primär auf die Funktion von T- und B- Zellen aus, weswegen ein Engraftment von Spender B-Zellen zur Rekonstitution der spezifischen humoralen Immunfunktionen zwingend notwendig ist, da die T-Zellen des Spenders die funktionslosen autologen B-Zellen nicht aktivieren können. Somit ist das Engraftment im non T-cell compartment – also alle Zellen, die nicht das für T-Lymphozyten typische Oberflächenmerkmal CD3 tragen – bei Patienten mit diesem Krankheitsbild von elementarer Bedeutung für die Rekonstitution der spezifischen humoralen Immunfunktion. Dies geht in der Regel mit einem Engraftment der hämatopoetischen Stammzellen einher.

1.3.3 Nachsorge

Im Anschluss an die HSZT folgt die Nachsorgephase, in der die engmaschige ambulante Betreuung wichtig ist, um Komplikationen rechtzeitig zu erkennen und zu vermeiden.

1.3.3.1 Komplikationen

Ein großer Faktor für Morbidität und Mortalität nach HSZT sind Infektionen, weswegen die medikamentöse Infektprophylaxe und das vorübergehende Einhalten neuer Lebensgewohnheiten und strenger Hygienemaßnahmen ein wichtiger Baustein sind, um schwerwiegende Infektionen zu vermeiden.

Daneben ist die Graft-versus-Host-Disease (GvHD) eine weitere gefürchtete Komplikation im Anschluss an eine HSZT. Man unterscheidet eine akute und eine chronische Form. Bei der akuten GvHD (aGvHD) erkennen reife T-Zellen des Spenders, welche sich im Transplantat befinden, das Gewebe des Empfängers als fremd und lösen infolgedessen schwere Entzündungsreaktionen aus, die verschiedene Organsysteme (Haut, Darm, Leber, Lunge u.a.) betreffen können. Eine bestmögliche Kompatibilität zwischen Spender und Empfänger und die Suppression des Immunsystems sind mögliche Maßnahmen, um das GvHD Risiko zu reduzieren.

Von der chronischen Form einer GvHD (cGvHD) spricht man nach aktueller Definition nicht mehr zu einem bestimmten Zeitpunkt nach HSZT. Die Pathomechanismen der aGvHD und der cGvHD unterscheiden sich. Vermutlich handelt es sich pathophysiologisch um eine Imbalance der T-Zellen – insbesondere der regulatorischen T-Zellen – oder eine Dysregulation der Zytokine. [33,43,75]

1.3.3.2 Impfungen

Im Rahmen der Konditionierung wird wie bereits beschrieben das Immunsystem der Patienten zerstört. Dadurch kommt es zum Verlust der Immunität, die durch bereits durchgemachte Infektionen oder Impfungen etabliert wurde. Vor allem in Anbetracht des erhöhten Krankheitsrisikos wird empfohlen, bei Patienten nach HSZT eine erneute Grundimmunisierung durchzuführen. [42,56]

Um einen relevanten Impftiter zu erreichen, muss zumindest eine partielle zelluläre Immunrekonstitution erfolgt sein. Zudem fließen der klinische Zustand des Patienten, die aktuelle Immunsuppression, die Gabe von Immunglobulinen oder das Vorliegen einer

GvHD in die Entscheidung mit ein. Generell empfiehlt die Ständige Impfkommission (STIKO) mindestens 6 Monate nach HSZT abzuwarten, bevor die Grundimmunisierung mit Totimpfstoffen begonnen wird. Bei Lebendimpfungen empfiehlt die STIKO einen Mindestabstand von 24 Monaten. Auch unter einer Immunglobulin Substitution ist eine Impfung mit Totimpfstoffen möglich. [42,44,65]

Die Bestimmung der spezifischen Antikörpertiter nach Impfung erfolgt zur Einschätzung der immunologischen Funktion (sogenanntes „diagnostisches Impfen“) und zur Kontrolle des langanhaltenden Impfschutzes. Diese diagnostische Maßnahme ist unter Immunglobulinsubstitution nicht interpretierbar, da eine Unterscheidung von passiv transfundierten und aktiv gebildeten Impfantikörpern unmöglich ist.

1.3.3.3 Chimärismus Analysen

Mit Hilfe von Chimärismus-Analysen aus peripherem Blut oder Knochenmark kann nach einer HSZT die Frage geklärt werden, ob die Blutzellen insgesamt oder ob bestimmte Zellpopulationen (sogenannter „linienspezifischer Chimärismus“) von Empfänger oder Spender abstammen und ob bzw. zu welchem Anteil es zum Engraftment des Spenderknochenmarks gekommen ist.

Bei einem vollständigem Spenderchimärismus stammen die gesamten blutbildenden Zellen vom Spender (Spenderanteil >95%), wohingegen sich bei einem gemischten Chimärismus auch weiterhin anteilig Zellen des Empfängers nachweisen lassen. [3]

Ein niedriger oder nicht nachweisbarer Spenderanteil – also das deutliche Überwiegen autologer Zellen – kann hinweisend für ein Transplantatversagen sein. [51]

Um die Chimärismus-Analysen durchzuführen, bedient man sich verschiedener Methoden. Zum einen kann bei unterschiedlichem Geschlecht von Spender und Empfänger mit Hilfe einer Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) anhand von X- beziehungsweise Y-Chromosomen zwischen Spender und Empfänger unterschieden werden. Des Weiteren kann der Chimärismus anhand von Blutgruppenmerkmalen, HLA-Merkmalen oder spezifischen individuellen DNA-Abschnitten (short tandem repeats, sog. STR-Analyse) untersucht werden. [3]

Diese Analysen können auf die verschiedenen Populationen (Stammzellen, B-Lymphozyten, T-Lymphozyten, Monozyten, NK-Zellen) durchgeführt werden, sodass eine Aussage über linienspezifischen Chimärismus getroffen werden kann. [3,51]

Wichtig dabei zu beachten ist jedoch, dass es sich bei Chimärismus-Analysen in der Nachsorge um einen dynamischen Prozess mit zunehmendem oder fallendem Spenderanteil handelt. So kann sich aus einem gemischten Chimärismus kurz nach HSZT im Verlauf ein vollständiger Chimärismus bilden und umgekehrt. [14]

Die klinische Bedeutung dieser Untersuchungen wird im weiteren Verlauf der Arbeit herausgearbeitet.

1.3.3.4 Immunglobulinspiegel

Wie bereits erwähnt ist die intravenöse oder subkutane Substitution von Immunglobulinen eine wichtige Infektprophylaxe nach HSZT. Jedoch gibt es keine eindeutigen Empfehlungen zu deren Dauer. Insbesondere bei der Transplantation von Patienten mit Immundefekterkrankungen, die auch die B-Zell-Funktion betreffen (wie bei der hier untersuchten Kohorte), gibt es hierfür keine etablierten Regeln.

Die Spiegel von IgG, IgM und IgA können nach einer HSZT zwar im Serum des Patienten gemessen werden, jedoch unterliegen sie erheblichen Schwankungen und sind potenziell anfällig für viele Störgrößen.

Im Kontext dieser Arbeit spielt die Notwendigkeit einer dauerhaften Immunglobulinsubstitution nach HSZT eine wichtige Rolle, da das untersuchte Kollektiv anhand dieses Merkmals kohortiert wurde. Zudem wurde eine suffiziente B-Zell Funktion nach HSZT unter anderem durch die Unabhängigkeit von Immunglobulinsubstitutionen definiert.

1.4 Fragestellung

Im klinischen Alltag ist die Entscheidung, ob ein Patient nach erfolgter Stammzelltransplantation eine Immunglobulinsubstitution benötigt, meist sehr schwer zu treffen.

Einige unsichere Parameter wie Chimärismus-Analysen, die Rekonstitution des T-zellulären Kompartimentes oder die Messung von Immunglobulinspiegeln im Blut des Patienten helfen zwar bei der Entscheidung, sind jedoch meistens nicht sehr verlässlich.

Besonders bei Patienten mit B⁺-SCID, bei denen autologe funktionslose B-Zellen bei einem gemischten Chimärismus vorhanden sein können, ist die Überwachung der immunologischen Rekonstitution und die Interpretation der Immunphänotypisierung nach Transplantation oftmals eine Herausforderung.

Der alleinige Nachweis von B-Zellen zur Vorhersage der Rekonstitution der spezifischen humoralen Immunfunktionen ist somit nicht ausreichend und deutlich komplexer als bei Patienten mit B⁻-SCID (beispielweise RAG- oder Artemis-Defekte), bei denen der alleinige Nachweis von B-Zellen für das Engraftment von gesunden Spender B-Zellen ausreichend ist. Bei SCID-Entitäten wie dem IL7RA- oder dem ZAP70-Defekt besteht kein primärer Defekt der B-Zellen – bei diesen Patienten ist auch bei autologem B-Zell-System nach HSZT mit einer spezifischen humoralen Immunfunktion zu rechnen.

Somit stellt sich diese Arbeit das Ziel, gerade bei Patienten mit B⁺-SCID – konkret *JAK3* und *IL2RG*-Defekt – einen frühen prädiktiven Marker für die B-Zell Funktion nach Stammzelltransplantation zu finden, der einen möglichst verlässlichen Hinweis dafür geben kann, ob die Patienten eine B-Zell Funktion erlangen können und ob folglich eine lebenslange Immunglobulinsubstitution notwendig ist oder nicht.

In Zusammenschau mit bisherigen Parametern soll dieser Marker dazu beitragen, die Entscheidungsfindung bei der Substitution von Immunglobulinen bei Patienten nach Stammzelltransplantation zu vereinfachen.

2 Material und Methoden

Bei den im Rahmen dieser Doktorarbeit untersuchten Proben handelt es sich um kryokonservierte Zellasservate, welche im Rahmen der Routinediagnostik und Routinenachsorge entnommen und anschließend in flüssigem Stickstoff gelagert wurden. Hierfür lag ein schriftliches Einverständnis der Sorgeberechtigten vor.

Im Folgenden werden die Schritte, welche zur Aufbereitung und Konservierung des Zellmaterials sowie zur durchflusszytometrischen Messung der Proben notwendig sind, dargestellt.

2.1 Patientenkollektiv

2.1.1 Auswahlkriterien

Für die Untersuchung wurden Patienten mit einem genetischen Defekt in *JAK3* bzw. *IL2RG* ausgewählt, welche im Zeitraum von 1982 bis 2015 am Standort Ulm mit einer hämatopoetischen Stammzelltransplantation behandelt wurden und diese zum Zeitpunkt der Auswertung überlebt haben.

Bei Patienten mit mehreren Stammzelltransplantationen wurde die zuletzt durchgeführte Transplantation untersucht.

Aus diesen potenziellen 64 Probanden (davon acht Patienten mit mehr als einer HSZT) wurden diejenigen herausgesucht, für die im Zeitraum von Tag 80 bis Tag 250 nach der Stammzelltransplantation kryokonservierte Blutproben zur Verfügung standen.

Diese Blutproben waren im Rahmen von Routine-Blutentnahmen bereits entnommen worden, sodass es zu keiner zusätzlichen Belastung für die Patienten gekommen ist.

Insgesamt wurden 9 Patienten mit einem *JAK3*-Defekt und 16 Patienten mit einem *IL2RG*-Defekt anhand oben genannter Kriterien ausgewählt.

Eine Einverständniserklärung zu Untersuchung der Immunrestitution nach der Knochenmarktransplantation wurde bereits vor der Probenentnahme im Rahmen der Aufklärung zur geplanten Therapiemaßnahme im Sinne eines „informed consent“ eingeholt und liegt schriftlich vor.

Patientenspezifische Daten, welche im Rahmen dieser Dissertation erhoben wurden, wurden aus Datenbanken und Patientenakten übernommen und pseudonymisiert weiterverarbeitet.

2.1.2 Klinisches Outcome

Die 25 ausgewählten Patienten wurden anhand ihrer immunologischen Rekonstitution und der klinischen Präsentation zweier Gruppen zugeordnet:

- Keine Notwendigkeit einer intravenösen (IVIg) bzw. subkutanen (SCIg) Immunglobulinsubstitution (im Folgenden IgIND, n=16)
- Notwendigkeit von IVIg/SCIg (im Folgenden IgDEP, n=9)

Bei der Entscheidung, ob eine kontinuierliche Immunglobulinsubstitution notwendig ist, spielen folgende Faktoren eine Rolle:

- Symptome eines Immunglobulinmangels (zum Beispiel rezidivierende Otitiden, rezidivierende Infekte der oberen Luftwege, Gedeihstörungen)
- Messung der Immunglobulinspiegel
- Daten zum Chimärismus (Spenderanteil) im Vollblut und lymphozytären Subpopulationen
- Messung spezifischer Antikörper (Tetanus, Streptococcus pneumoniae, Hämophilus influenzae Typ B) nach Transplantation und nach durchgeführten Immunisierungen.

2.1.3 Zusätzliche Patientendaten

Im Rahmen dieser Arbeit wurden bereits erhobene Patientendaten (Serum-Immunglobulinspiegel, Chimärismus-Analysen und spezifische Impfantikörper) retrospektiv analysiert. Diese wurden aus den Patientenakten entnommen.

Die Immunglobulinspiegel wurden im Rahmen der Routinediagnostik des Labors mittels eines immunologischen Trübungstestes durchgeführt.

Die verschiedenen Methoden der Chimärismus-Analysen werden detailliert an entsprechender Stelle aufgeführt.

Die Einordnung der Untersuchungsergebnisse der Chimärismus-Analysen wurden im Rahmen dieser Untersuchung wie folgt definiert:

- vollständiger Spenderchimärismus: über 95% Spenderanteil
- gemischter Chimärismus: 5% bis 95% Spenderanteil
- vollständiger autologer Chimärismus: unter 5% Spenderanteil.

2.2 Kryokonservierung von Mononukleären Zellen

2.2.1 Material und Geräte

Verbrauchsmaterialien

- Übliche Verbrauchsmaterialien
- Leucosep™ Röhren mit Trennscheibe 12ml (Nr. 163290) und 50ml (Nr. 227290), Fa. Greiner
- C-Chip Einmal-Neubauer Zählkammer, Fa. Digital Bio

Geräte/Hilfsgeräte

Zentrifuge	Heraeus, Hanau
Sterilbank (Laminar-Air-Flow)	Kojair, Vippula, Finnland
Vortex	Scientific Industries, Bohemia, USA
Waage	Sartorius, Göttingen
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Mikroskop	Carl Zeiss AG, Oberkochen

Reagenzien

Tabelle 3 Übersicht über die verwendeten Reagenzien im Rahmen der Ficoll-Dichtegradienten Anreicherung und der Kryokonservierung der mononukleären Zellen. *vor Gebrauch hitzeinaktiviert: 56° Wasserbad, 45 min, dann aliquotiert in 50ml Röhren. Abkürzungen: PBS: phosphate buffered saline; VLE: very low endotoxine; FCS: fetales Kälberserum; DMSO: Dimethylsulfoxid; Pen: Penicillin; Strep: Streptomycin.

Bezeichnung	Artikel-Nummer	Hersteller
Biocoll Separating Solution	L6113	Biochrom AG
PBS Dulbeccos	14 190-094	GIBCO
VLE RPMI 1640-Medium	F1415	Biochrom AG
Fetales Kälberserum FCS *	3302-P281803	PAN
Penicillin/Streptomycin Pen/Strep	15140-122	GIBCO
L-Glutamin	P04-80100	PAN
Hepes Puffer	L1613	Biochrom
DMSO	20385.01	Serva
Trypanblau	744K0506032	Merck
Türck'sche Lösung	1.09277.0500	Merck

Probenmaterial

- Heparinisiertes Vollblut der Patienten
- Buffy Coat zur internen Kontrollmessung (leukozytenreiche Restprodukte in der Produktion von Erythrozytenkonzentraten; durch die Blutspendezentrale des Deutschen Roten Kreuzes anonymisiert zur Verfügung gestellt.)

2.2.2 Durchführung

2.2.2.1 Isolierung Mononukleärer Zellen (MNC)

Für die Durchführung werden folgende Lösungen benötigt:

- Biocoll Separating Solution (gebrauchsfertige Lösung, s. o.)
- RPMI/10%FCS Zellkulturmedium, bestehend aus: 500ml VLE RMPI 1640, 50ml FCS (10%), 5ml Pen/Strep (100U/µg/ml), 5ml Glutamin (2mM), 7ml Hapes (14mM).
- PBS (phosphate buffered saline, Pufferlösung)

Zur Isolierung der Lymphozyten und zur Entfernung von Serum einschließlich der darin befindlichen Immunglobuline wird das entnommene Patientenmaterial (heparinisiertes Vollblut) in sterile Röhrchen geeigneter Größe umgefüllt.

Die Probe wird folgend mit PBS verdünnt, wobei zu Buffy Coat Proben drei Teile PBS und zu heparinisiertem Vollblut ein Teil PBS hinzu pipettiert wird.

Je nach Probenvolumen werden 5 ml (bei einem Probenvolumen von 2-5ml Blut) bzw. 15ml (bei 6-18ml Blut) Biocoll Lösung mit der verdünnten Patientenprobe überschichtet, wobei zu beachten ist, eine eventuelle Mischung von Biocoll Lösung und Probe möglichst zu minimieren.

Anschließend wird das verschlossene Röhrchen für 20-25 Minuten bei 399 x g mit langsamer Beschleunigung und schwacher Bremse zentrifugiert, um die verschiedenen Blutbestandteile aufzutrennen.

Nach der Zentrifugation lassen sich je nach Dichte verschiedene Schichten erkennen, wobei die Interphase mit den darin befindlichen mononukleären Zellen von besonderer Bedeutung ist.

Im nächsten Arbeitsschritt werden die als weißer Ring abzugrenzenden MNC mit Hilfe einer Pipette aus der Interphase isoliert und in ein neues-Probengefäß überführt.

Die Zellen werden mit 10-15 ml PBS für 10 Minuten bei 650 x g gewaschen, anschließend folgt ein weiterer 10-minütiger Waschschriff mit 10-15ml PBS bei 130 x g, langsamer Beschleunigung und Abbremsung, um Thrombozyten zu entfernen.

Das verbliebene Zell-Pellet wird resuspendiert und in 1ml RPMI-Medium/10%FCS aufgenommen

2.2.2.2 Zellzählung und Kryokonservierung

Für die Zellzählung und Kryokonservierung werden folgende Lösungen benötigt:

- Türk'sche Lösung (fertige Lösung, aliquotiert je 180 µl in Eppendorf-Cups) zur Hämolyse der Erythrozyten
- Ggf. 0,2% Trypanblau anstatt Türk'scher Lösung zur Detektion toter Zellen
- Einfriermedium, bestehend aus: 7,5ml FCS, 1,5ml RPMI, 1ml DMSO

Aus der resuspendierten Zellfraktion (siehe vorangehender Abschnitt) werden nun 50-100µl in ein Eppendorf-Cup pipettiert.

Hieraus werden 20µl entnommen und mit 180µl Trypanblau verdünnt.

20µl der generierten Zellsuspension werden anschließend in eine Neubauer-Zählkammer überführt, welche im nächsten Arbeitsschritt ausgezählt wird.

Die Anzahl der auszählenden Quadranten hängt wie folgt von der Zellzahl ab:

≤10 Zellen/Quadrant	4 Quadranten auszählen
≤50 Zellen/Quadrant	2 Quadranten auszählen
≥51 Zellen/Quadrant	1 Quadrant auszählen

Die Anzahl der Zellen wird (ggf. durch Bestimmung des Mittelwertes der gemessenen Quadranten) ermittelt und mit 10^4 und dem Verdünnungsfaktor, in diesem Fall 10, multipliziert (ergo endgültiger Faktor: 10^5), um die Zellzahl in einem Milliliter Lösung zu berechnen.

Die Gesamtmenge der in Medium aufgenommenen Zellen wird so aliquotiert, dass die Zellzahl pro Einfrierröhrchen zwischen 10×10^6 und 15×10^6 liegt. Die isolierten Zellen werden in 1ml Einfriermedium aufgenommen, rasch auf Eis gestellt und unverzüglich bei -80°C eingefroren.

In einem Zeitraum von 8 Wochen werden die Röhrchen in einen Stickstoffbehälter mit einer Temperatur von -196°C umgelagert und dort dauerhaft asserviert.

2.3 B-Zell Phänotypisierung

2.3.1 Material und Geräte

Verbrauchsmaterialien

- Übliche Laborausstattung
- Zytometerröhrchen (12x75mm Polystyren-Rundboden Röhrchen)

Geräte

- Zentrifuge
- Vortex
- Waage
- Pipette
- Durchflusszytometer, NAVIOS 3L10C (Serien-Nr.: AU08215, Instance-Nr.: 3119669), Firma Beckman Coulter

Reagenzien

Antikörper

Tabelle 4 Übersicht über die verwendeten Antikörper im Rahmen der B-Zell Phänotypisierung. Abkürzungen: Art.-Nr.: Artikelnummer; APC: Allophycocyanin; CD: cluster of differentiation; Ig: Immunglobulin; FITC: Fluoresceinisothiocyanat; PE: Phycoerythrin; PerCP: Peridin-Chlorophyll-protein; PC7: Tandemfarbstoff aus PE und CyChrome7; AF: Alexa Fluor; Horizon V450: von BD Horizon registrierter Farbstoff, °C: Gradangabe in Celsius.

Bezeichnung	Klon	Art.-Nr.	Hersteller	Lagerung
CD19-APC Alexa Fluor 700	J3-119	PN A78837	Beckman Coulter	2-8°C
CD20 PerCP	2H7	302324	Biolegend/Biozol	2-8°C
CD21 PE	B-ly4	555422	BD Pharmingen	2-8°C
CD24 FITC	ML5	555427	BD Pharmingen	2-8°C
CD27 Horizon V450	M-T271	560448	BD Horizon	2-8°C
CD38 PC7	HB7	335825	BD Pharmingen	2-8°C
CD45-Krome Orange	J.33	PN A96416	Beckman Coulter	2-8°C
IgA PE	polyclonal	2052-09	SB Biozol	2-8°C
IgD FITC	polyclonal	F0189	Dako / Biozol	2-8°C
IgG PC7	RMO52	PN A22331	Beckman Coulter	2-8°C
IgM AF647	polyclonal	109-496-129	Dianova / Jackson ImmunoResearch	-70°C

Weitere Reagenzien

Tabelle 5 Übersicht über weitere Reagenzien, welche für die B-Zell Phänotypisierung verwendet wurden. Abkürzungen: D-PBS: Dulbecco's phosphate-buffered saline; BSA: bovines Serumalbumin, °C: Gradangabe in Celsius.

Bezeichnung	Bestellnummer	Hersteller	Lagerung
D-PBS (+CaCl ₂)	21300-058	GIBCO	15-30°C
BSA	K41-001	PAA	2-25°C
NaN ₃ (Natrium Azid)	8.22335.025 UN1687	Merck	Raumtemperatur
Optilyse ^R C	A11895	Beckman Coulter	18-25°C
Flow-Check Pro Fluorespheres		Beckman Coulter	2-8°C

Probenmaterial

- MNC aus heparinisiertem Vollblut oder kryokoservierte mononukleäre Zellen (siehe 2.2.)
- MNC aus Buffy Coat zur internen Kontrollmessung (leukozytenreiche Restprodukte in der Produktion von Erythrozytenkonzentraten; durch die Blutspendezentrale anonymisiert zur Verfügung gestellt.)

2.3.2 Durchführung

2.3.2.1 Auftauen der MNC

Die in Stickstoff konservierten Proben werden in einem 37°C warmen Wasserbad über einen Zeitraum von 1-2 Minuten aufgetaut und anschließend in ein 15ml fassendes Falcon Tube umgefüllt.

Parallel dazu werden Buffy Coat MNC zur internen Kontrollmessung aufgetaut.

Das Falcon Tube wird mit RPMI/10%FCS Zellkulturmedium auf ein Volumen von 10ml aufgefüllt und es beginnt folgend ein Waschschrift bei 650 x g für 10 Minuten.

Nach erfolgter Zentrifugation wird der Überstand verworfen und die im Pellet befindlichen Zellen werden nach Resuspension mit 10ml PBS bei 650 x g für 10 Minuten gewaschen.

Einer weiteren Resuspension folgt die Aufnahme der Zellen in 500µl-1000µl RPMI/10%FCS Zellkulturmedium, wobei das endgültige Aufnahmevermögen nach der Zellzählung gegebenenfalls angepasst wird und die Zellsuspension auf eine Konzentration von 500.000 bis 1.000.000 Zellen pro 100µl eingestellt wird.

2.3.2.2 Färben der MNC

Für die Färbung der Zellen werden folgende Lösungen benötigt:

- Antikörpermischung für Tube 1 und 2 (vgl. Tabelle 6)
- PBS/ NaN_3 , pro 5l bestehend aus: 96g D-PBS, 500mg CaCl_2 (0,01%), 5g NaN_3 (0,1%), 5l Aqua bidest.
- Immunfluoreszenz (IF) Medium, bestehend aus: 500ml PBS/ NaN_3 , 2,5g BSA (0,5%)
- RPMI/10%FCS Zellkulturmedium, bestehend aus: 500ml VLE RMPI 1640, 50ml FCS (10%), 5ml Pen/Strep (100U/µg/ml), 5ml Glutamin (2mM), 7ml HEPES (14mM)

Tabelle 6 Übersicht über die Zusammensetzung der in Tube 1 und 2 verwendeten Antikörpermischungen. *Antikörpermischungen für die entsprechenden Tubes werden zur Qualitätssicherung und der Einfachheit halber in größeren Mengen auf Vorrat hergestellt. Aufgrund der strukturellen Eigenschaften müssen anti-CD19 APC-AF 750 und anti-IgM AF 647 bei jedem Ansatz frisch hinzugefügt werden. **IgA-PE wird vor der Herstellung der Antikörpermischung 1:25 mit IF Medium verdünnt.

Abkürzungen: CD: cluster of differentiation; FITC: Fluoresceinisothiocyanat; PE: Phycoerythrin; ECD: Electron Coupled Dye; PerCP: Peridin-Chlorophyll-protein; PC7: Tandemfarbstoff aus PE und CyChrome7; AF: AlexaFlour. Die Farben entsprechen dem Absorptionsspektrum der jeweiligen Antikörper.

Fluoreszenz	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	488 Excitation					633 Excitation			405 Excitation	
	FITC	PE	ECD	PerCP	PC7	AF647	APC- AF700	APC- AF750	HorizonV 450	Krome- Orange
Tube 1 (µl) *	CD24	CD21			CD38	IgM	CD19		CD27	CD45
	5	5			5	3	2		2	2
Tube 2 (µl)*	IgD	IgA 1:25**		CD20	IgG	IgM	CD19		CD27	CD45
	5	5		2	5	3	2		2	2

In beschriftete Zytometertubes (jeweils Tube 1 und 2) werden 100µl der Patientenprobe bzw. der Kontrolle und die entsprechende Menge der Antikörpermischung pipettiert.

Nach einer Inkubationszeit von 15 Minuten bei Raumtemperatur in Dunkelheit werden der Probe und der Kontrolle 500µl Optilyse zur Erythrozytenlyse hinzugefügt, wobei eine gründliche Durchmischung mit Hilfe des Vortex wichtig ist, da die Scherkräfte wesentlich zur Erythrozytenlyse beitragen.

Nach weiteren 15 Minuten Inkubationszeit bei gleichen Bedingungen werden jeweils 500µl Immunfluoreszenz-Medium (IF-Medium, Zusammensetzung siehe oben) hinzu pipettiert und die Zellproben für 5 Minuten bei 350 x g einem Waschschrift unterzogen.

Nach Abkippen des Überstandes werden die mit Antikörpern markierten MNC in 500µl IF-Medium aufgenommen.

2.3.3 Durchflusszytometrische Messung

2.3.3.1 Messprinzip

Die Durchflusszytometrie bietet die Möglichkeit, Zellen hinsichtlich ihrer physikalischen Eigenschaften zu analysieren.

Grundlegend für die Analyse spezifischer Oberflächenproteine ist die Markierung der Zellen mit Fluoreszenzfarbstoff-konjugierten Antikörpern gegen definierte Antigene auf der Zelloberfläche und die vom Antigen-Profil abhängige Emission optischer Signale.

Die in IF-Medium gelösten konjugierten Zellen werden durch eine Kapillare eingesaugt und passieren im Sensormodul jeweils einzeln einen Laserstrahl geeigneter Wellenlänge.

Werden die Elektronen des Fluoreszenzfarbstoffes durch den monochromatischen Laserstrahl optimal angeregt, so werden diese auf ein höheres Energieniveau gehoben, wobei sie nach Passage des Laserstrahls unter Abgabe von Energie (in Form von Photonen) auf ihr ursprüngliches Energieniveau zurückfallen.

Das hierbei emittierte Lichtsignal wird mit Hilfe eines Photomultipliers detektiert und verhält sich proportional zur Menge an gebundenen Antikörpern pro Zelle.

Das Gerät detektiert sowohl das gestreute als auch das emittierte Licht. Ersteres liefert Information über die Größe und die Granularität der Zellen, die Fluoreszenzemission spiegelt die Bindung mit einem Antikörper wider und gibt somit Hinweise über die Expression der Oberflächenproteine auf der Zelle.

Das verwendete Durchflusszytometer verfügt über drei verschiedene Laser (405, 488 bzw. 633 Nanometer), die entsprechende Zielzellen jeweils mit einer anderen Wellenlänge anregen.

Die gleichzeitige Detektion mehrerer Oberflächenmoleküle (maximal 10 verschiedene Fluorochrome), welche durch unterschiedliche Antikörper markiert sind, ist möglich, da sich die eingesetzten Farbstoffe zwar bei einer gemeinsamen Wellenlänge anregen lassen, aber über jeweils individuelle Emissionsspektren verfügen.

Aufgrund teilweiser Überlagerung der Emissionsspektren, muss der Bereich der spektralen Überlappung gegebenenfalls korrigiert werden (so genannte Kompensation).

Zusätzlich zu Informationen über die exprimierten Antigene werden durch Lichtbeugung und Lichtstreuung Daten über die Zellgröße und die Granularität des Zytoplasmas gewonnen.

Der Forward Scatter (FSC) ist ein Maß für die Beugung des Lichts im flachen Winkel und liefert Informationen über das Zellvolumen.

Der Sideward Scatter (SSC) ist ein Maß für die Brechung des Lichts im 90° Winkel, welches von Eigenschaften wie Granularität, Form und Beschaffenheit des Zellkerns und die Menge der Vesikel im Zellinneren abhängig ist.

2.3.3.2 Auswertung

Die untersuchten Zellpopulationen werden entweder als Mengenverteilungskurve im Histogramm oder als „Dot Plot“ dargestellt, wobei in jedem Plot entsprechenden der beiden Achsen die Information über zwei verschiedene Parameter dargestellt werden kann.

Durch sogenannte Gates kann im Rahmen der Untersuchung eine definierte Zellpopulation markiert werden. In diesem Gate kann nun die Expression eines Oberflächenantigens in einer definierten Population analysiert werden.

So werden B-Lymphozyten anhand der Expression der Oberflächenmoleküle CD19 und CD20 innerhalb der Lymphozyten (CD45 positive Zellpopulation) detektiert.

Memory B-cells lassen sich durch die Anwesenheit des Oberflächenmarkers CD27 nachweisen. Class-switched memory B-cells verlieren im Rahmen des Isotypenswitchs wie oben beschrieben IgM auf ihrer Oberfläche, sodass die Zellpopulation im Gate IgM⁻CD27⁺ gefunden werden kann.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden nur Patienten ausgewertet, bei denen ausreichend Zellmaterial untersucht werden konnte. So wurden Patientenproben mit einer Zellzahl unter 50 CD27⁺ nicht berücksichtigt.

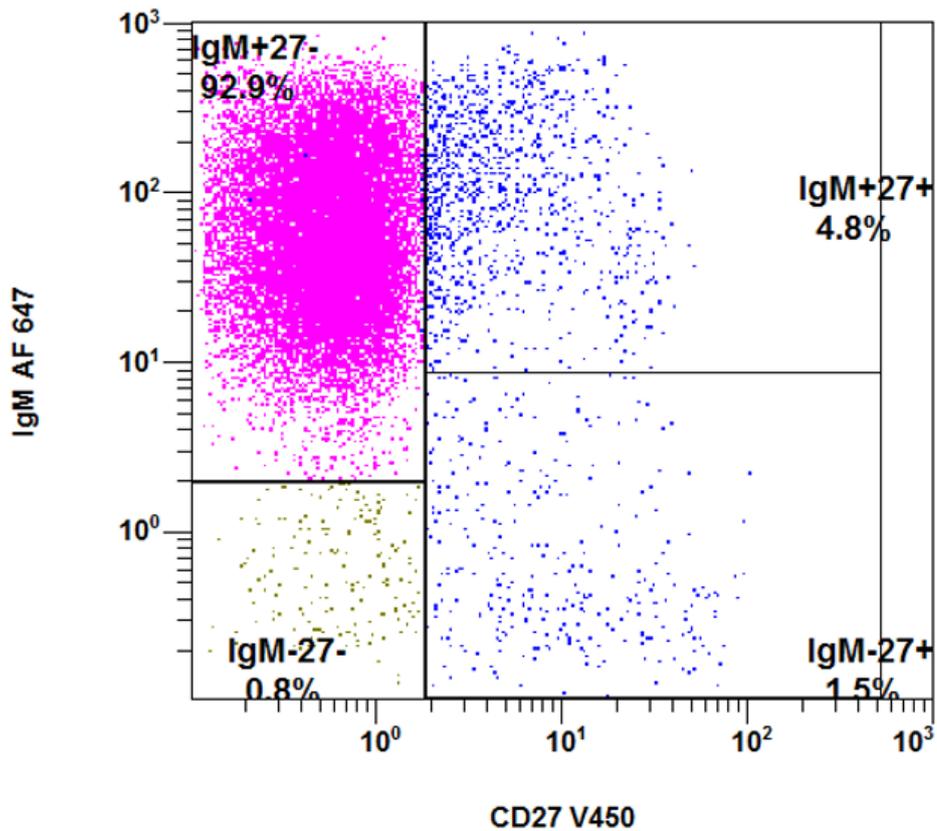


Abbildung 6 Beispielhafte Darstellung einer durchflusszytometrischen Untersuchung eines Patienten des untersuchten Patientenkollektivs. Auf der y-Achse ist die Expression von IgM dargestellt, auf der x-Achse die Expression von CD27. Das Skalenniveau ist logarithmisch. Jeder einzelne Punkt der Abbildung entspricht einer gemessenen Zelle. Abhängig von ihrem Expressionsmuster verteilen sich die analysierten Zellen in der Darstellung. Unter Berücksichtigung verschiedener Störgrößen können nun verschiedene Populationen „gated“ – das heißt als eine definierte Gruppe zusammengefasst – werden. In dieser Abbildung können im rechten unteren Quadranten somit diejenigen Zellen dargestellt werden, die kein IgM exprimieren, jedoch CD27 positiv sind. Diese IgM-CD27+ Population entspricht den „class-switched memory B-cells“, also den klassengewechselten Gedächtnis B-Zellen. Der Prozentsatz der jeweiligen Gates bezieht sich auf die Gesamtpopulation der abgebildeten Zellen. Abkürzungen: Ig: Immunglobulin; CD: cluster of differentiation; V450: Name des fluoreszierenden Antikörpers des Herstellers Horizon; AF: Alexa Fluor, Name des Herstellers des Antikörpers. Die Farben entsprechen dem Fluoreszenzspektrums des jeweiligen Antikörpers (siehe Tabelle 6).

2.4 Statistische Auswertung

Im Rahmen der statistischen Auswertung und der Erstellung von Abbildungen wird die Software „IBM SPSS Statistics 26“ verwendet.

Die ausgewählten Patientengruppen werden nach Erhebung ihrer immunologischen Parameter mit Hilfe deskriptiv-statistischer Verfahren analysiert.

Ein Cut-off Wert für die zu erwartende Immunrekonstitution wird anhand einer Receiver-Operating-Characteristic -Kurve (ROC-Kurve) als Optimierungsmethode bestimmt.

Signifikanzen werden anhand eines Student's t-Tests berechnet (Signifikanzniveau 0,05).

3 Ergebnisse

3.1 Immunglobulinspiegel im Patientenserum

In einem ersten Schritt wurden anhand von bereits vorliegenden Patientendaten die Immunglobulin-Spiegel (IgA, IgG und IgM) aller in dieser Arbeit eingeschlossenen Patienten beginnend etwa 50 Tagen vor ihrer Stammzelltransplantation bis zu etwa einem Jahr danach analysiert, um den zeitlichen Verlauf der Immunglobulin-Spiegel darzustellen.

Bei Patienten mit mehreren Stammzelltransplantationen wurden die Daten nach der zuletzt durchgeführten Stammzelltransplantation erhoben.

Alle verfügbaren Daten wurden graphisch dargestellt und es erfolgte eine statistische Analyse der Daten zu folgenden Zeitpunkten:

- erste Messung 50 Tage (+/- 10 Tage) nach Transplantation
- zweite Messung 150 Tage (+/- 10 Tage) nach Transplantation
- dritte Messung mindestens 250 Tage (bis maximal 1 Jahr) nach Transplantation.

Diese Messzeitpunkte wurden im Sinne der Fragestellung so gewählt, dass eine möglichst frühe Aussage über die Rekonstitution des Immunsystems getroffen werden kann.

3.1.1 Immunglobulin G

Die Abbildungen 7 a) und 7b) beschreiben den zeitlichen Verlauf der IgG-Spiegel im Serum der Kohorten IgDEP und IgIND von etwa 50 Tagen vor HSZT bis etwa einem Jahr nach HSZT. Wie aus den Grafiken zu entnehmen ist, unterscheiden sich im untersuchten Intervall die Serumspiegel der Patienten der beiden Kohorten nicht wesentlich.

Zum ersten Untersuchungszeitpunkt betrug der Mittelwert der IgG-Spiegel bei IgIND 9,46 g/L, bei IgDEP 9,66 g/L ($p=0,936$); zum zweiten Messzeitpunkt bei IgIND 9,53 g/L, bei IgDEP 7,16 g/L ($p=0,393$) und schließlich zum letzten Untersuchungszeitpunkt bei IgIND 6,51 g/L und bei IgDEP 4,57 g/L ($p=0,357$).

In der statistischen Analyse konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen dargestellt werden (vgl. Abb. 8), sodass keine Vorhersage über die Funktionalität des spezifischen humoralen Immunsystems nach erfolgter Stammzelltransplantation anhand der IgG-Spiegel getroffen werden kann.

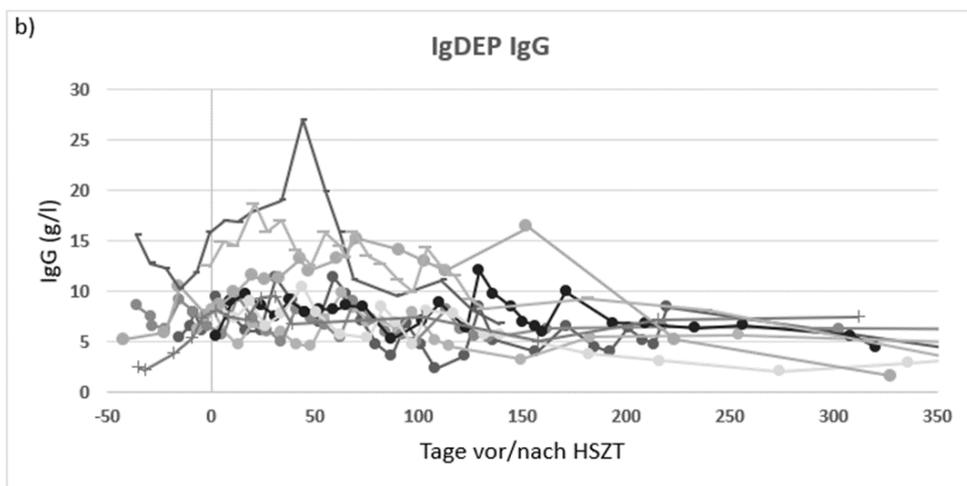
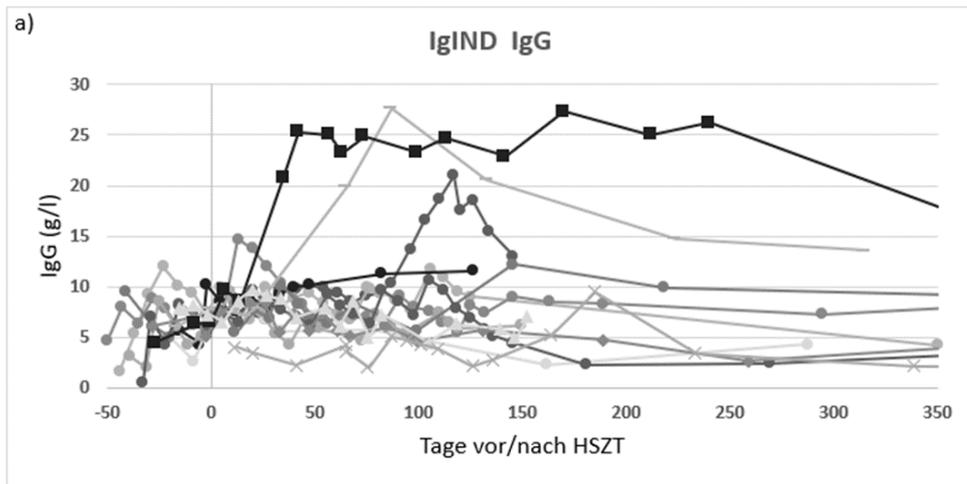


Abbildung 7a und b) Darstellung der Immunglobulin G-Spiegel vor bzw. nach hämatopoetischer Stammzelltransplantation bei Patienten ohne Immunglobulinsubstitution (IgIND, n= 16 Patienten, Abbildung 7a) und bei Patienten mit Immunglobulinsubstitution (IgDEP, n=9 Patienten, Abbildung 7b), Universitätsklinikum Ulm, 1982-2015. Abkürzungen: IgIND: Kohorte, die unabhängig von Immunglobulinen ist; IgDEP: Kohorte, die abhängig von Immunglobulinen ist; IgG: Immunglobulin G; HSZT: hämatopoetische Stammzelltransplantation.

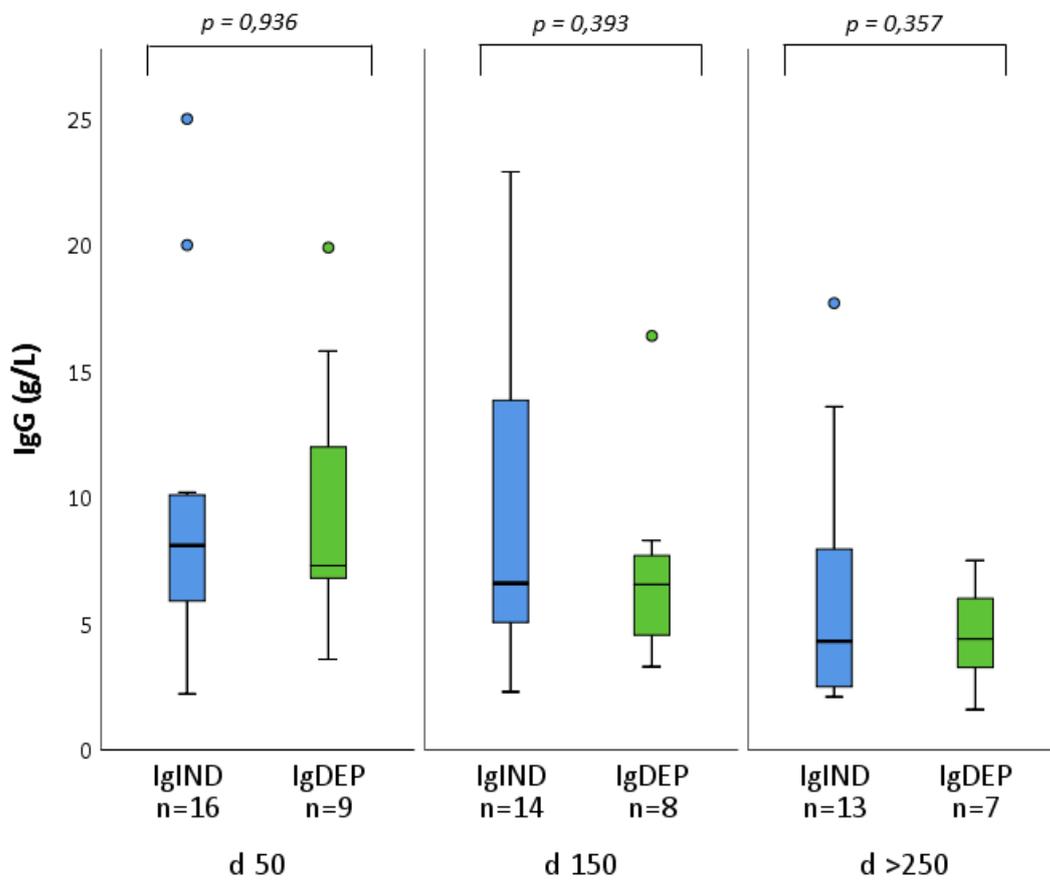


Abbildung 8 Darstellung der Spiegel von Immunglobulin G der beiden Patientenkohorten IgIND (blau markiert) bzw. IgDEP (grün markiert) zu den drei ausgewählten Untersuchungszeitpunkten etwa 50, 150 bzw. mehr als 250 Tage nach HSZT, Universitätsklinikum Ulm, 1982-2015. Im Rahmen der statistischen Untersuchung mit Hilfe eines Student's t-Tests zeigt sich zu keinem Zeitpunkt ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den beiden Kohorten. Unter der jeweiligen Patientenpopulation ist vermerkt, von wie vielen Patienten zum gewählten Untersuchungszeitpunkt Daten verfügbar waren. Abkürzungen: IgG: Immunglobulin G; g/L: Gramm pro Liter; IgIND: Kohorte, die unabhängig von Immunglobulinen ist; IgDEP: Kohorte, die abhängig von Immunglobulinen ist; d: Tag, HSZT: hämatopoetische Stammzelltransplantation.

3.1.2 Immunglobulin M

Bei der Betrachtung der Abbildungen 9) und 9b) fällt auf, dass beide Patientengruppen im Bereich von 50 bis 250 Tagen einen gewissen Spiegel von IgM produzieren können. Im langfristigen Verlauf können in der Kohorte IgIND im Vergleich zu IgDEP konstantere IgM-Spiegel aufgebaut werden.

Vergleicht man auch hier die Mittelwerte der beiden Gruppen, so beträgt dieser zum frühesten Messzeitpunkt bei IgIND 0,39 g/L, bei IgDEP 1,11 g/L ($p=0,285$); 150 Tage nach HSZT bei IgIND 1,07 g/L, bei IgDEP 1,09 g/L ($p=0,968$) und zum letzten Untersuchungszeitpunkt bei IgIND 1,05 g/L und bei IgDEP 0,65 g/L ($p=0,345$).

Somit kann beim Vergleich der IgM-Spiegel zu den verschiedenen Zeitpunkten kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen festgestellt werden (vergleiche Abbildung 10).

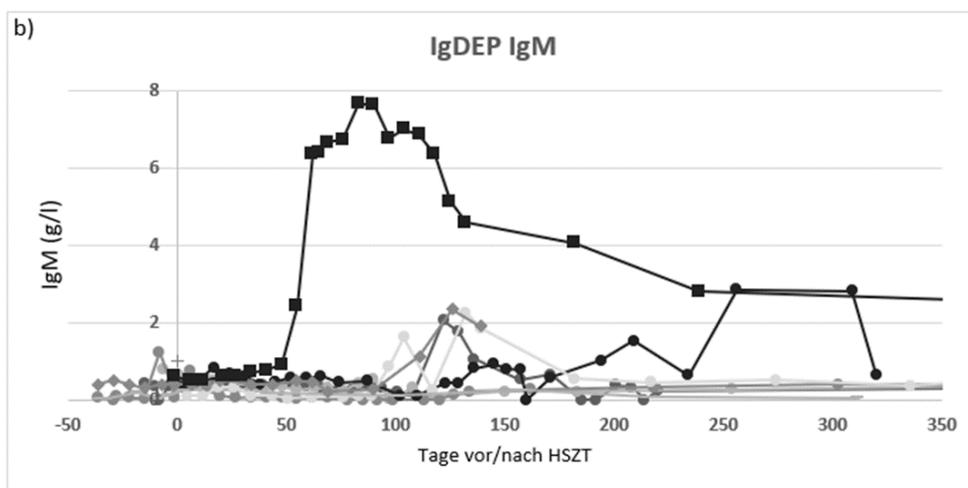
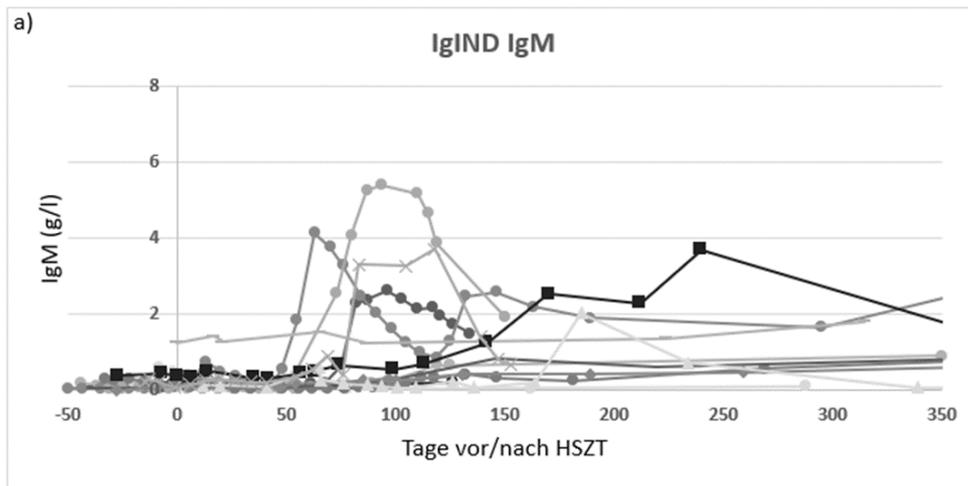


Abbildung 9a und b) Darstellung der Immunglobulin M-Spiegel vor bzw. nach hämatopoetischer Stammzelltransplantation bei Patienten ohne Immunglobulinsubstitution (IgIND, n=16 Patienten, Abbildung 9a) und bei Patienten mit Immunglobulinsubstitution (IgDEP, n=9 Patienten, Abbildung 9b), Universitätsklinikum Ulm, 1982-2015. Abkürzungen: IgIND: Kohorte, die unabhängig von Immunglobulinen ist; IgDEP: Kohorte, die abhängig von Immunglobulinen ist; IgM: Immunglobulin M; HSZT: hämatopoetische Stammzelltransplantation.

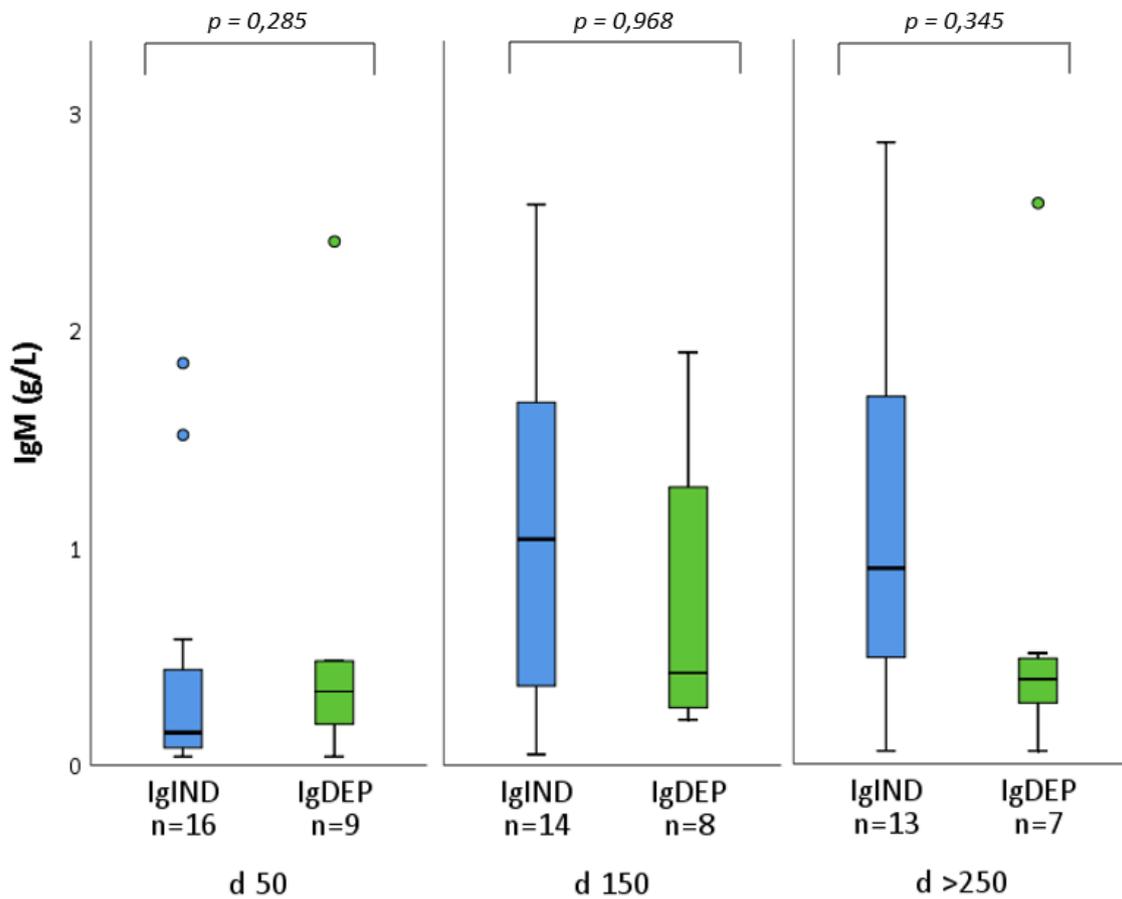


Abbildung 10 Darstellung der Spiegel von Immunglobulin M der beiden Patientenkohorten IgIND (blau markiert) bzw. IgDEP (grün markiert) zu den drei ausgewählten Untersuchungszeitpunkten 50, 150 bzw. mindestens 250 Tage nach HSZT, Universitätsklinikum Ulm, 1982-2015. Aus Gründen der Übersichtlichkeit und der Skalierung ist ein Messwert der Kohorte IgDEP zum Zeitpunkt 50 Tage nach HSZT (5,7 g/L) und ein Messwert der Kohorte IgDEP zum Zeitpunkt 150 Tage nach HSZT (4,58 g/L) nicht in der Abbildung dargestellt. Im Rahmen der statistischen Untersuchung mit Hilfe eines Student's t-Tests zeigt sich zu keinem Zeitpunkt ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Kohorten. Unter der jeweiligen Patientenpopulation ist vermerkt, von wie vielen Patienten zum gewählten Untersuchungszeitpunkt Daten verfügbar waren. Abkürzungen: HSZT: hämatopoetische Stammzelltransplantation; IgM: Immunglobulin M; g/L: Gramm pro Liter; IgIND: Kohorte, die unabhängig von Immunglobulinen ist; IgDEP: Kohorte, die abhängig von Immunglobulinen ist; d: Tag.

3.1.3 Immunglobulin A

Vergleicht man die Abbildungen 11a) und 11b), so fällt hier am deutlichsten ein Unterschied zwischen den beiden Patientengruppen auf. Bei Patienten der Kohorte IgIND können konstant höhere Spiegel von IgA nachgewiesen werden.

Zum frühesten Untersuchungszeitpunkt beträgt der Mittelwert bei IgIND 0,17 g/L, bei IgDEP 0,27 g/L ($p=0,549$); nach 150 Tagen bei IgDEP 0,41 g/L und bei IgIND 0,20 g/L ($p=0,236$); zum letzten Messzeitpunkt bei IgIND 0,59 g/L und bei IgDEP 0,11 g/L ($p=0,014$) (vgl. Abbildung 12).

Somit lässt sich im langfristigen Verlauf – etwa 8 Monate nach Stammzelltransplantation – anhand der IgA Spiegel der Patienten mit statistischer Signifikanz ($p=0,014$) ein Unterschied zwischen den beiden Kohorten feststellen.

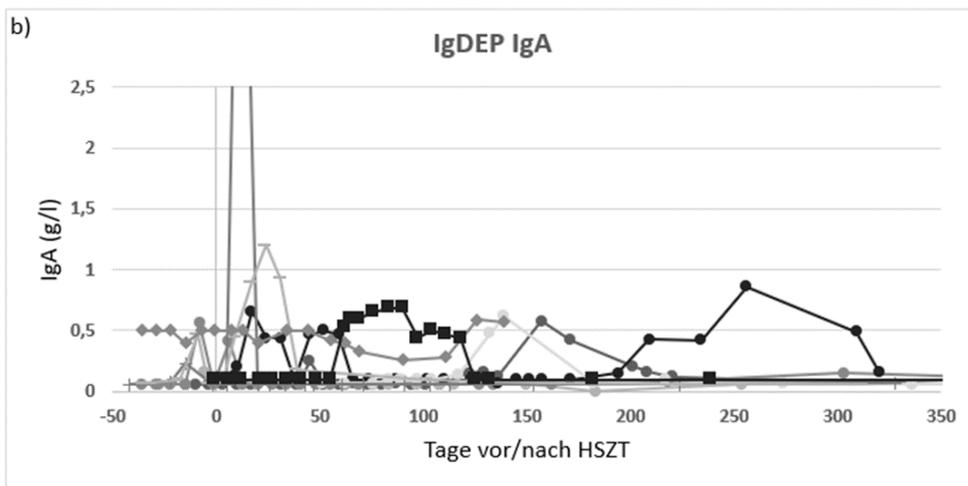
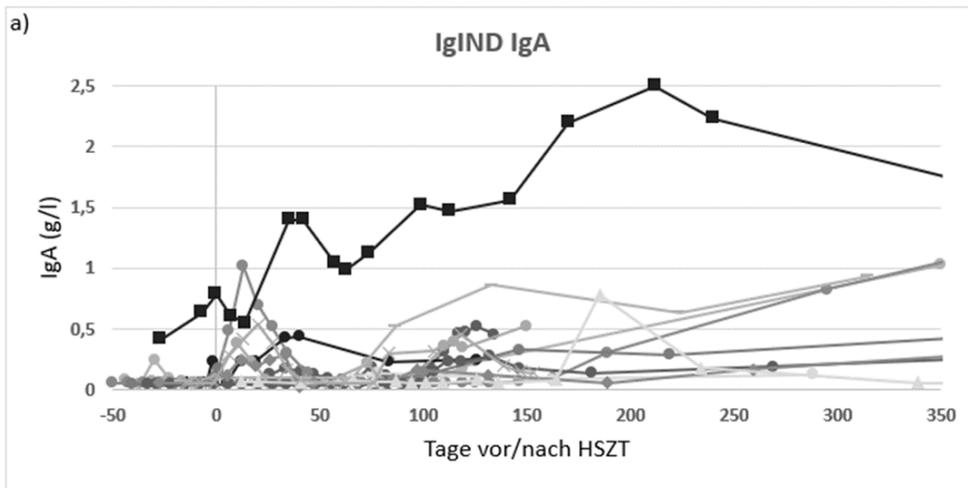


Abbildung 11 a und b) Verlauf der Immunglobulin A-Spiegel vor bzw. nach hämatopoetischer Stammzelltransplantation bei Patienten ohne Immunglobulinsubstitution (IgIND, n=16 Patienten, Abbildung 11a) und bei Patienten mit Immunglobulinsubstitution (IgDEP, n= 9 Patienten, Abbildung 11b), Universitätsklinikum Ulm, 1982-2015. In Abbildung 11b) ist aus Gründen der Übersichtlichkeit ein Messwert nicht angegeben (IgA-Spiegel von 6 g/l an Tag 12 nach HSZT). Abkürzungen: IgIND: Kohorte, die unabhängig von Immunglobulinen ist; IgDEP: Kohorte, die abhängig von Immunglobulinen ist; IgA: Immunglobulin A; HSZT: hämatopoetische Stammzelltransplantation.

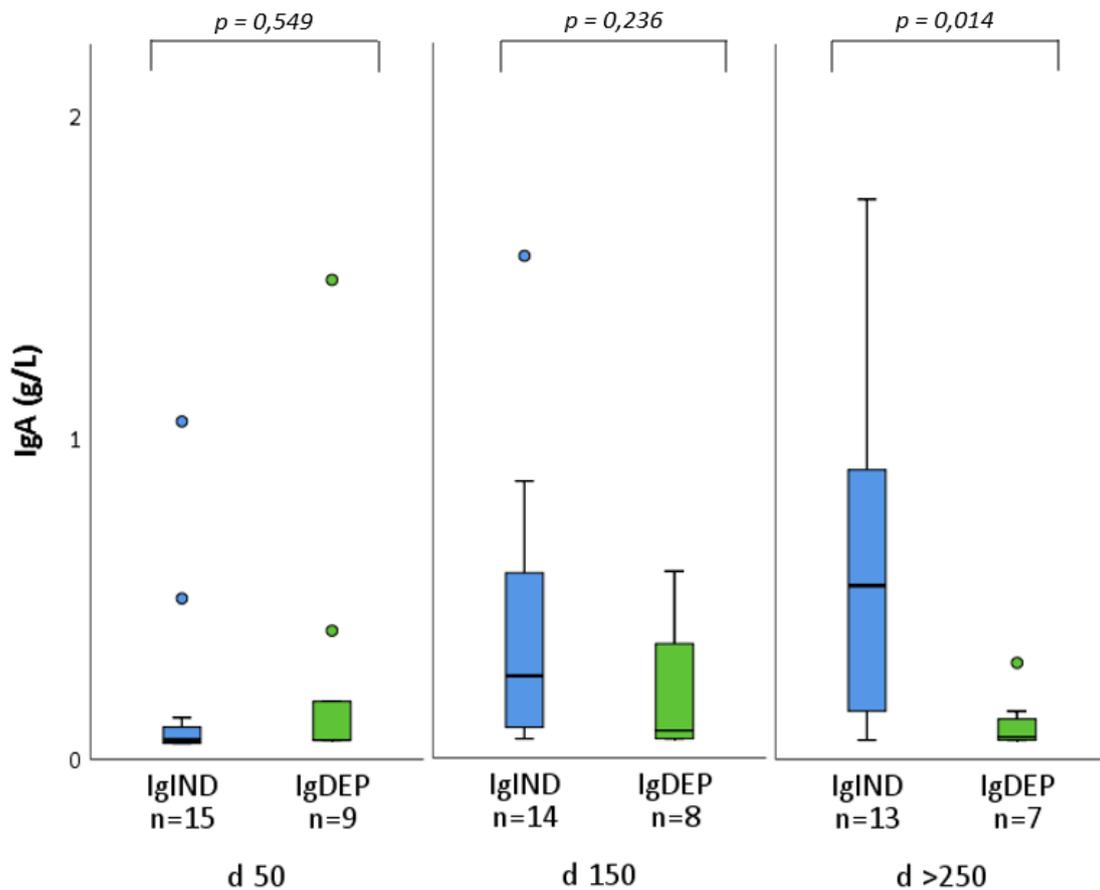


Abbildung 12 Darstellung der Spiegel von Immunglobulin A der beiden Patientenkohorten IgIND (blau markiert) bzw. IgDEP (grün markiert) zu den drei ausgewählten Untersuchungszeitpunkten 50, 150 bzw. mindestens 250 Tage nach HSZT, Universitätsklinikum Ulm, 1982-2015. Im Rahmen der statistischen Untersuchung konnte mit Hilfe des Student's t-Test zwischen den beiden Kohorten zum Zeitpunkt von mindestens 250 Tagen nach HSZT ein statistisch signifikanter Unterschied ($p=0,014$) festgestellt werden. Unter der jeweiligen Patientenpopulation ist vermerkt, von wie vielen Patienten zum gewählten Untersuchungszeitpunkt Daten verfügbar waren. Abkürzungen: HSZT: hämatopoetische Stammzelltransplantation; IgA: Immunglobulin A; g/L: Gramm pro Liter; IgIND: Kohorte, die unabhängig von Immunglobulinen ist; IgDEP: Kohorte, die abhängig von Immunglobulinen ist; d: Tag.

3.1.4 Zusammenfassung

Die Auswertung der Daten zeigt also, dass anhand der Spiegel von IgG und IgM weder sehr kurzfristig nach HSZT noch im weiteren Verlauf Aussagen über den langfristigen Verlauf der B-Zell Funktion und der Notwendigkeit einer Immunglobulinsubstitution möglich ist.

Der Spiegel von IgA über 250 Tage nach HSZT zeigt in der untersuchten Kohorte einen signifikanten Unterschied ($p=0,014$) zwischen den beiden Patientengruppen und kann sich somit als Parameter für die langfristige Immunrekonstitution dienen.

3.2 Impf-Antikörper

Dieses Kapitel der Arbeit bezieht sich nur auf die Patientenkohorte IgIND, da bei Patienten, die eine Immunglobulinsubstitution erhalten, eine Untersuchung der spezifischen Impf-Antikörper nicht sinnvoll ist.

Von 12 der 16 Patienten der Gruppe IgIND liegen Informationen über die spezifischen Impf-Antikörper nach HSZT vor.

Bei 7 der 12 Patienten liegen dokumentierte Werte innerhalb des 1. Jahres nach HSZT vor und bei 2 Patienten liegen Untersuchungsergebnisse im weiteren Verlauf der Nachsorge vor.

Bei 3 Patienten finden sich Erwähnungen in Arztbriefen, die auf eine suffiziente Impf-Antikörper Produktion schließen lassen. Hier liegen jedoch keine dokumentierten Impftiter vor.

Bei allen Patienten der untersuchten Kohorte lassen sich – sofern Untersuchungsergebnisse vorliegen – spezifische Impfantikörper nachweisen, was eindeutig für die Funktionalität des neu etablierten Immunsystems inklusive der spezifischen humoralen Immunfunktion spricht (vgl. Tabelle 7).

Bei einem Patienten (UPN 346), der zu Beginn der Untersuchung der Kohorte IgDEP zugeordnet wurde, konnte durch den Nachweis von spezifischen Impf-Antikörpern in Zusammenschau mit anderen erhobenen Befunden die Gabe von Immunglobulinen beendet werden (siehe 4.6., Daten aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht in Tabelle 7 dargestellt).

Tabelle 7 Darstellung der Impf-Antikörper der Patienten der Kohorte IgIND, Universitätsklinikum Ulm, 1982-2015, n=16. Soweit vorliegend ist der Titer nach durchgeführter Impfung angegeben. Falls keine absoluten Zahlen vorliegen, wurden Daten aus Arztbriefen entnommen. Leere Felder in der Tabelle entsprechen nicht vorliegenden Daten. Abkürzungen: UPN: Patientenummer; HSZT: hämatopoetische Stammzelltransplantation; IE: internationale Einheiten; Str. pneum: Streptococcus pneumoniae; H. infl. B: Haemophilus influenzae Typ B; AK: Antikörper. Normwert für Tetanus AK: >0,01 IE/ml; Normwert für Str. pneum. 0,9-29,2 mg/l im ersten Lebensjahr, im Testbereich von UPN 454 >3,3mg/l (*); Normwert für H. infl. B: >0,15 mg/ml).

UPN	HSZT-Datum	Datum Impf-AK	Jahre nach HSZT	Tetanus (IE/ml)	Str. pneum. (mg/l)	H. infl. B (mg/l)	Kommentare
15	04.06.1982						Keine Befunde vorliegend. Im Arztbrief 33,2 Jahre nach HSZT „gute“ Impf-AK dokumentiert.
289	31.10.1997						Keine Befunde vorliegend. Im Arztbrief 24 Jahre nach HSZT „gute“ Impf-AK nach COVID-19-Impfung dokumentiert.
349	08.02.1999	28.01.2000	1,0	0,73			
368	28.06.1999	04.09.2000	1,2	3,38			
400	28.03.2000						Keine Befunde vorliegend. Im Arztbrief 9,2 Jahre nach HSZT sicherer Impfschutz für Tetanus, Pneumokokken, H. influenzae und Diphtherie dokumentiert.
446	04.09.2001	04.12.2002	1,2	2,08			
454	27.11.2001	30.06.2020	18,6	0,13	58,1*		Keine Daten im ersten Jahr nach KMT dokumentiert. 18,6 Jahre nach KMT „gute“ Impf-AK
469	05.06.2002	19.02.2003	0,7	1,37			
537	15.06.2004	26.07.2005	1,1	0,21			
558	16.02.2005						Entlassung am 18.07.2005, Empfehlung zur Immunisierung und Impf-AK Kontrolle, jedoch kein Befund vorliegend.
589	21.02.2006						Keine Befunde vorliegend. Im Arztbrief 2 Jahre nach HSZT sicherer Impfschutz dokumentiert.
619	20.12.2006						Keine Befunde vorliegend. Im Arztbrief 6 Monate Immunisierung und Impf-AK Kontrolle empfohlen, jedoch keine erneute Vorstellung erfolgt.
782	01.08.2012	17.03.2013	0,6	2,88	25,8	0,66	
839	30.04.2014	19.10.2018	4,5	0,36	63		Keine Daten im ersten Jahr nach KMT dokumentiert. Daten 4 Jahre nach KMT
856	10.02.2015	10.11.2015	0,7	2,24	257,04	9	
875	08.09.2015						Entlassung am 20.12.16. Keine Daten dokumentiert.

3.3 Chimärismus

Um den Einfluss des Chimärismus auf die zu erwartende B-Zell Funktion zu untersuchen, wurden retrospektiv Daten der Kohorte zu zwei verschiedenen Zeitpunkten analysiert.

Im Sinne der Fragestellung wurden Chimärismusanalysen betrachtet, welche im ersten Jahr nach HSZT durchgeführt worden sind und somit auch in engem zeitlichen Zusammenhang mit der Untersuchung der B-Zell Subpopulationen stehen (siehe Tabelle 8).

Anschließend erfolgte die Auswertung der Chimärismus Daten zum letzten verfügbaren Zeitpunkt, da anhand der zuletzt verfügbaren Daten die zuverlässigste Information zur langfristigen Entwicklung des Chimärismus abgeleitet werden kann und letztlich die Einteilung der Patienten in die Gruppen IgDEP und IgIND mit diesem Befund eng korreliert. Wie in Kapitel 1.3.2.2. ausgeführt besteht eine Korrelation zwischen non-T-cell Chimärismus und B-Zell-Funktionen.

Es waren nicht bei allen Patienten zu den gewünschten Untersuchungszeitpunkten Daten verfügbar, weswegen im ersten Teil der Untersuchung nur 19 von 25 Patienten eingeschlossen werden konnten.

Aufgrund der Tatsache, dass einige Patienten zum weiteren Follow-Up in andere Kliniken beziehungsweise ins Ausland verlegt oder entlassen wurden, variiert der Abstand der vorliegenden Daten zur HSZT teilweise erheblich. Bei vier Patienten entsprach die bereits ausgewertete Untersuchung im ersten Jahr nach HSZT der letzten verfügbaren Untersuchung, sodass zum zweiten Analysezeitpunkt insgesamt nur Daten von 21 Patienten zur Verfügung standen.

Besonderes Augenmerk wird auf den linienspezifischen Chimärismus der T- bzw. B-Lymphozyten und Monozyten gelegt. Falls kein linienspezifischer Chimärismus vorliegt, werden die Ergebnisse der Untersuchungen der nicht selektierten kernhaltigen Zellen dargestellt.

Patienten mit *IL2RG/JAK3*-SCID haben im Rahmen des Krankheitsbildes in der Regel keine autologen T-Zellen (Ausnahmen siehe Kapitel 4.3.), dennoch ist der alleinige Nachweis von Spender-T-Zellen nach HSZT kein eindeutiger Hinweis auf ein Stammzellengraftment (Eigenschaft der peripheren polyklonalen Expansion der Spender-T-Zellen, vergleiche Kapitel 1.3.2.2.).

Der Nachweis von Spender B-Zellen, Monozyten oder Stammzellen hingegen kann jedoch hinweisend für ein Stammzellengraftment und somit für die Etablierung einer B-Zell-

Funktion sein. Im Folgenden werden diese Subpopulationen (B-Lymphozyten, Monozyten, Stammzellen) als non-T-cell Kompartiment zusammengefasst (vergleiche unter anderem Tabelle 8).

Tabelle 8 Darstellung des Chimärismus hinsichtlich des Spenderanteils im ersten Jahr nach HSZT und zum letzten verfügbaren Zeitpunkt, Universitätsklinikum Ulm, 1982-2015, IgIND n=16, IgDEP n=9. Zudem ist der Tabelle zu entnehmen, ob bei den Patienten ein Engraftment im non T-cell compartment nachweisbar ist und ob spezifische Impf-Antikörper nach Impfung vorhanden sind. Abkürzungen: UPN: Patientenummer; IVIG: intravenöse Immunglobulinsubstitution; t (y): Abstand der Untersuchung in Bezug zur HSZT in Jahren; Kond.: Konditionierung (0: keine Kond., 1: Kond. erhalten). Methoden: HLA: Chimärismusanalyse nach Anfärben der Zellen mit spender- bzw. empfängerspezifischen HLA-Merkmalen; XY-FISH: Fluoreszenz in situ Hybridisierung und geschlechterspezifische Auftrennung der Zellen bei verschiedenen Geschlechtern zwischen Empfänger und Spender; BG: Auftrennung der Zellen von Spender und Empfänger hinsichtlich Blutgruppen; STR: Zuordnung der Zellen hinsichtlich short tandem repeats der DNA von Spender und Empfänger. *: keine Chimärismusdaten innerhalb des ersten Jahres verfügbar. **: Die Untersuchung innerhalb des ersten Jahres nach HSZT, die bereits ausgewertet wurde, entspricht der zuletzt verfügbaren. Grau hinterlegt sind diejenigen Patienten, welche der Kohorte IgDEP zuzuordnen sind. Fortsetzung der Tabelle auf der Folgeseite. Leere Felder in der Tabelle bedeuten, dass keine Daten zum Untersuchungszeitpunkt vorliegen.

UPN	IVIG	Kond.	Chimärismus (% Spender)										Non T-cell engraft- ment	Impf- AK
			Erstes Jahr nach HSZT					Zuletzt verfügbarer Untersuchungszeitpunkt						
			t (y)	CD3+	CD19+	CD14+	Methode/Sonstiges	t (y)	CD3+	CD19+	CD14+	Methode/Sonstiges		
15	IgIND	0	*				HLA	33,1	100	5	1	HLA	Ja	Ja
88	IgDEP	0	*				HLA	24,6	100	0	0	HLA	Nein	
246	IgDEP	0	*				HLA	20,1	100	0	0	HLA	Nein	
250	IgDEP	0	*				HLA	8,3	86	0	1	HLA	Nein	
289	IgIND	0	0,8	50	12	41	HLA	18,8	100	73	82	HLA	Ja	
346	IgDEP	1	0,4	100	49	54	HLA	19,3	100	30	11	HLA	Ja	ja
349	IgIND	0	0,5				XY-FISH/BG Vollblut: 100% Spender	11,1				XY-FISH: Vollblut 100%	Ja	Ja
358	IgDEP	1	0,5	100			HLA/BG: Erythrozyten: 1%	7,4	100			STR: CD3-: 0%,	nein	
368	IgIND	0	*					15,9				STR: Vollblut Spender>Empfänger	Ja	Ja
400	IgIND	1	0,6				STR/BG: Vollblut 100%	5,3				STR: Vollblut 100%	Ja	Ja
402	IgDEP	1	0,7	100	15	5,9	HLA	6,4	100	0	0	HLA	Nein	
446	IgIND	1	0,5				XY-FISH: Vollblut 100%	15,0	100	100	84	HLA	Ja	Ja
454	IgIND	1	0,7	100	41	21	HLA	14,3	100	22	26	HLA	Ja	Ja
469	IgIND	1	0,4	100	33	27	HLA	13,4	100	28	26	HLA	Ja	Ja
485	IgDEP	0	0,7	98	2,5	0	HLA	15,4	100	0	0	HLA	Nein	

UPN	IVIG	Kond.	Chimärismus (% Spender)										Non t-cell engraft- ment	Impf- AK
			Erstes Jahr nach HSZT					Zuletzt verfügbarer Untersuchungszeitpunkt						
			t (y)	CD3+	CD19+	CD14+	Methode/Sonstiges	t (y)	CD3+	CD19+	CD14+	Methode/Sonstiges		
506	IgDEP	0	1,0	100	7,3	2,7	HLA	**				HLA	Ja	
522	IgDEP	0	0,3	98	0	0	HLA	3,0	100	0	0	HLA	Nein	
537	IgIND	1	0,3	67	96	97	HLA	15,4	100	100	100	HLA	Ja	Ja
558	IgIND	1	0,4	100	100	100	HLA	**				HLA	Ja	
589	IgIND	1	0,7	100	100	100	HLA	12,3	100	90	86	HLA	Ja	Ja
619	IgIND	0	0,4	100			STR: CD3-: Spender>Empfänger, CD34: 0%	**					Ja	
782	IgIND	0	*					2,6	100			XY-FISH: CD3-: 0%	Nein	Ja
839	IgIND	1	1,0	100			XY-FISH CD3-: 96%	5,2	100			XY-FISH: CD3-: 0%	Initial ja, dann nein	Ja
856	IgIND	1	0,5	100	55	2,4	HLA	1,0	100	26	0	HLA	Ja	Ja
875	IgIND	0	0,4	100			STR CD3-: Empfänger>Spender	**					Ja	Ja

3.3.1 T-Zellen

Im ersten Jahr nach HSZT lagen bei 19 Patienten Chimärismusdaten vor; hiervon bei 16 Patienten mit linienspezifischen Angaben zum T-Zell Chimärismus. Bei 3 Patienten wurden nicht spezifisch T-Zellen, sondern lediglich Vollblut untersucht.

Ein vollständiger Spenderchimärismus der T-Zellen zeigte sich bei 14 von 16 Patienten (88%), bei 2 von 16 (19%) Patienten konnten bei einem Spenderanteil von 50% (UPN 289) bzw. 67% (UPN 537) autologe T-Lymphozyten nachgewiesen werden.

Bei der genauen Betrachtung dieser Patienten fällt auf, dass bei UPN 537 im Rahmen der linienspezifischen Chimärismusanalyse mittels HLA-Färbung in der spenderspezifischen Färbung nur ein Anteil von 67% detektiert wurde, in der empfängerspezifischen Gegenfärbung wurden jedoch 0% nachgewiesen. Wie es zu diesem Ergebnis gekommen ist, lässt sich retrospektiv nicht mehr überprüfen, jedoch ist davon auszugehen, dass dieser Patient auch zu diesem frühen Zeitpunkt nach HSZT keine autologen T-Zellen hatte. Im weiteren Verlauf entwickelte der Patient einen kompletten Spenderchimärismus ohne Nachweis jeglicher autologer Zellen.

Bei Patient UPN 289 konnten bereits vor HSZT bereits autologe T-Zellen nachgewiesen werden. Der Patient nimmt eine spezielle Rolle ein, da bei ihm ein so genanntes Omenn-Syndrom vorlag. Bei den im Rahmen dieser Untersuchung nachgewiesenen T-Zellen handelt es sich also um residuelle autologe T-Zellen bei wahrscheinlich hypomorpher *JAK3*-Mutation im Rahmen des Omenn-Syndroms, die sich im ersten Jahr nach HSZT in abnehmender Zahl nachweisen lassen. Bereits 17 Monate nach HSZT konnten keine autologen T-Lymphozyten mehr nachgewiesen werden.

Die drei Patienten, bei denen keine linienspezifischen Daten zum Spenderanteil der T-Lymphozyten vorlagen, hatten alle einen 100-prozentigen Spenderchimärismus im Vollblut (UPN 349, 400, 446), sodass auch hier von einem vollständigen Anteil an Spender T-Lymphozyten auszugehen ist.

Bei 21 Patienten waren Chimärismusdaten jenseits des ersten Jahres nach HSZT verfügbar, Bei 18 von 21 Patienten wurde ein linienspezifischer T-Zell Chimärismus durchgeführt; bei 3 Patienten wurde lediglich Vollblut untersucht.

17 von 18 Patienten (94%) hatten einen vollständigen Spenderchimärismus, während bei einem Patienten (UPN 250) bei einem Spenderanteil von 86% auf T-zellulärer Ebene auch

autologe T-Zellen nachweisbar waren. Bei näherer Betrachtung dieser Patientin fiel auf, dass eine Reversion der *JAK3*-Mutation stattgefunden hat. Weitere Informationen zu dieser Patientin finden sich in Kapitel 4.3.

Bei drei Patienten lag kein linienspezifischer Chimärismus, sondern lediglich eine Untersuchung aus Vollblut vor, wobei zwei Patienten einen vollständigen Spenderchimärismus (UPN 349, 400) und einer einen mehrheitlichen Spenderchimärismus (UPN 368) zeigte. Da hier der Spenderanteil den Anteil an T-Zellen an den kernhaltigen Zellen im peripheren Blut übersteigt, ist indirekt mit hoher Wahrscheinlichkeit von einem kompletten Spenderchimärismus der T-Zellen auszugehen.

Erwartungsgemäß zeigten alle Patienten der Kohorte ein langfristig stabiles Engraftment im T-Zell-Kompartiment, da dies Voraussetzung für ein Langzeitüberleben von Patienten mit SCID darstellt.

3.3.2 B-Zellen

Im ersten Jahr nach HSZT lagen bei 19 Patienten Chimärismusdaten vor, hiervon bei 12 Patienten linienspezifische Angaben zum B-Zell Chimärismus.

Bei 2 dieser 12 Patienten (17%) zeigte sich ein vollständiger autologer Spenderanteil, bei 7 Patienten (58%) ein gemischter Chimärismus und bei 3 Patienten (25%) ein vollständiger Spender B-Zell Chimärismus.

Die 7 Patienten ohne linienspezifischen B-Zell Chimärismus zeigten folgende Ergebnisse:

- 3 Patienten mit 100% Vollblutchimärismus (UPN 349, 400, 446)
- 1 Patient ohne Angabe von Daten zum non-T-cell-Kompartiment (UPN 358)
- 3 Patienten, bei denen ein Chimärismus auf CD3 negative Zellen durchgeführt wurde. Dort zeigte sich bei einem Patienten ein Anteil von 96% Spenderzellen (UPN 839), einmal ein größerer Anteil von Spender als Empfängerzellen (UPN 619) und einmal ein Überwiegen die autologen Zellen (UPN 875).

Jenseits des ersten Jahres nach HSZT lagen bei insgesamt 21 Patienten Chimärismusdaten vor, hiervon bei 15 Patienten linienspezifische Angaben zum B-Zell Chimärismus.

Bei 6 dieser 15 Patienten (40%) zeigte sich ein vollständig autologer Chimärismus, 7 Patienten (47%) wiesen einen gemischten Chimärismus auf und bei 2 Patienten (13%) konnte ein vollständiger Spenderchimärismus nachgewiesen werden.

Die 6 Patienten ohne linienspezifischen B-Zell Chimärismus haben sich wie folgt dargestellt:

- Zwei Patienten mit 100% Vollblut-Chimärismus (UPN 349, 400)
- ein Patient mit überwiegendem Spenderanteil im Vollblut (UPN 368)
- Drei Patienten mit komplett autologen CD3 negativen Zellen (UPN 358, 782, 839).

Bei Betrachtung der Daten fallen zudem noch weitere Aspekte auf.

Tabelle 8 ist zu entnehmen, dass der linienspezifische Chimärismus im Verlauf der Zeit variabel zu sein scheint. Bei den Patienten UPN 402 und 485 konnte im ersten Jahr nach HSZT in der HLA-Färbung ein linienspezifischer B-Zell Chimärismus von 31% bzw. 2,5% nachgewiesen werden. Bei beiden Patienten konnten in der Langzeituntersuchung bei gleicher Methodik keine Spender B-Zellen nachgewiesen werden und beide Patienten benötigen eine Immunglobulinsubstitution.

Bei den Patienten UPN 782 und 839 wiederum zeigt sich, dass diese in der zuletzt vorliegenden Untersuchung trotz nicht nachweisbarem Spenderanteil in der Population der CD3 negativen Zellen – also allen Zellen, die nicht T-Lymphozyten entsprechen; non T-cell compartment – keine Immunglobulinsubstitution benötigen.

Mögliche Ursachen, wieso manche Patienten trotz fehlendem Spender Chimärismus auf B-Zell Ebene keine Immunglobulinsubstitution benötigen, werden im Diskussionsteil der Arbeit erörtert.

Der Zusammenhang zwischen dem B-Zell-Chimärismus und B-Zell-Funktionen wird in Kapitel 3.3.4. näher erläutert.

3.3.3 Monozyten

Im ersten Jahr nach HSZT lagen bei 19 Patienten Chimärismusdaten vor; hiervon bei 12 Patienten linienspezifische Angaben zum Monozyten Chimärismus.

Bei 4 dieser 12 Patienten (33%) zeigte sich ein vollständig autologer Chimärismus, 5 Patienten wiesen einen gemischten Chimärismus auf und bei 3 Patienten konnte ein vollständiger Spenderchimärismus nachgewiesen werden.

Bei 7 Patienten gab es keine Angaben zum linienspezifischen Chimärismus. Diese Patienten entsprechen denen, die bereits im Rahmen des B-Zell Chimärismus genauer definiert wurden (UPN 349,358, 400, 446, 619, 839, 875).

Jenseits des ersten Jahres nach HSZT lagen Chimärismusdaten von 21 Patienten vor, hiervon bei 15 Patienten linienspezifische Angaben zum Monozyten Chimärismus.

Bei 8 dieser 15 Patienten (53%) konnte ein rein autologer Chimärismus nachgewiesen werden, bei 6 Patienten (40%) ein gemischter Chimärismus und bei einem Patienten (7%) ein vollständiger Spenderchimärismus.

Bei 6 Patienten lagen keine linienspezifischen Untersuchungsergebnisse vor (UPN 349, 358, 368, 400, 782, 839).

3.3.4 Zusammenhang zwischen linienspezifischem Chimärismus und der Notwendigkeit einer Immunglobulinsubstitution

Im Sinne der Fragestellung, einen Parameter für die Vorhersage über die Notwendigkeit einer Immunglobulinsubstitution zu finden, wird nun die Korrelation zwischen dem Immunglobulin-Status und dem Chimärismus untersucht.

Tabelle 9 Darstellung der Abhängigkeit von Immunglobulinen (IgDEP vs. IgIND) in Bezug auf den linienspezifischen Spenderanteil der jeweiligen Zellpopulation im ersten Jahr nach HSZT bzw. zum zuletzt verfügbaren Zeitpunkt, Universitätsklinikum Ulm, 1982-2015. In der linken Spalte ist der Spenderanteil in der durchgeführten Chimärismusanalyse angegeben. In den weiteren Spalten ist die Verteilung der Patienten der verschiedenen Kohorten zu beiden analysierten Untersuchungszeitpunkten aufgeschlüsselt. In dieser Tabelle sind nur Patienten dargestellt, bei denen Daten zum linienspezifischen Chimärismus vorliegen. Abkürzungen: HSZT: hämatopoetische Stammzelltransplantation, IgDEP: Patientenkohorte mit Notwendigkeit einer Immunglobulinsubstitution; IgIND: Patientenkohorte ohne Notwendigkeit einer Immunglobulinsubstitution.

T-Zellen				
Spenderanteil Chimärismus	Im ersten Jahr nach HSZT		Zuletzt verfügbare Untersuchung	
	IgDEP	IgIND	IgDEP	IgIND
<5%	-	-	-	-
5-95%	0	3	1	0
>95%	5	8	7	10
B-Zellen				
Spenderanteil Chimärismus	Im ersten Jahr nach HSZT		Zuletzt verfügbare Untersuchung	
	IgDEP	IgIND	IgDEP	IgIND
<5%	2	0	6	0
5-95%	3	4	1	6
>95%	0	3	0	2
Monozyten				
Spenderanteil Chimärismus	Im ersten Jahr nach HSZT		Zuletzt verfügbare Untersuchung	
	IgDEP	IgIND	IgDEP	IgIND
<5%	3	1	6	2
5-95%	2	3	1	5
>95%	0	3	0	1

3.3.4.1 T-Zellen

Betrachtet man den linienspezifischen Chimärismus auf T-Zell-Ebene, so fällt auf, dass 13 von 16 (Untersuchung im ersten Jahr nach HSZT) bzw. 17 von 18 Patienten (spätester verfügbarer Zeitpunkt) einen vollständigen Spenderchimärismus aufweisen.

Es gibt keine Korrelation zwischen dem Nachweis eines hohen Anteils von Spender T-Zellen und der Notwendigkeit einer Immunglobulinsubstitution.

Bei den Patienten, bei denen sich autologe T-Zellen nachweisen lassen, stellt sich die Frage, wie diese Patienten bei dem vorliegenden Krankheitsbild (T⁻ B⁺ - SCID) zu autologen T-Zellen kommen. Erklärungsansätze hierzu folgen im Diskussionsteil (siehe Kapitel 4.3.).

3.3.4.2 B-Zellen

Bei Analyse der Daten fällt auf, dass Patienten, die einen großen Spenderanteil an B-Zellen aufweisen, keine Immunglobulinsubstitution benötigen (siehe Tabelle 9).

In der Kohorte IgIND liegt im ersten Jahr nach HSZT der Chimärismus auf B-Zell Ebene zwischen 12% und 100% (im Mittel 62%), wohingegen er in der Kohorte IgDEP zwischen 0% und 49% (Mittelwert 15%) liegt.

Es gibt jedoch auch Patienten, die zum gewählten Untersuchungszeitpunkt einen relevanten Spenderanteil an B-Zellen haben, jedoch zur Kohorte IgDEP zuzuordnen sind (UPN 346, 402).

Zum letzten verfügbaren Zeitpunkt lassen die Daten vermuten, dass ein noch konsistenterer Zusammenhang zwischen dem Nachweis von Spender B-Zellen und der Unabhängigkeit von einer Immunglobulinsubstitution vorliegt.

So benötigen auch im Verlauf alle Patienten, die einen vollständig autologen B-Zell Chimärismus zum gewählten Untersuchungszeitpunkt haben, eine Immunglobulinsubstitution, wohingegen 8 von 9 Patienten mit dem Nachweis von Spender B-Zellen unabhängig von Immunglobulinen leben und sich somit eine ausreichende B-Zell Funktion nachweisen lässt. Der Spenderanteil variiert zwischen 5% und 100% (Mittelwert 54%).

Ein Patient (UPN 346), der einen Spenderanteil von 30% zeigt, aber Immunglobuline benötigt, wird im Laufe der Arbeit ausführlich diskutiert und stellt einen Ausnahmefall dar.

Aus den Daten lässt sich ableiten, dass zu einem Zeitpunkt von mehr als einem Jahr nach HSZT bereits ein geringer Anteil an Spender B-Zellen ausreicht, um eine ausreichende Immunfunktion zu gewährleisten. Wie hoch dieser Anteil jedoch sein muss, lässt sich aus den vorliegenden Ergebnissen nicht ableiten.

Wie bereits beschrieben, gibt es jedoch auch Patienten (UPN 782 und UPN 839), die zwar keine Spender B-Zellen aufweisen, jedoch eine suffiziente B-Zell Funktion haben. Mögliche Erklärungsursachen hierzu folgen im Verlauf (siehe Kapitel 4.5.).

3.3.4.3 Monozyten

Bei den Monozyten zeigt sich ein ähnliches Bild wie bei den B-Lymphozyten.

Bei Patienten der Gruppe IgIND variiert der Spenderanteil zum frühen Untersuchungszeitpunkt zwischen 2,4% und 100% (Mittelwert 55%); in der Kohorte IgDEP zwischen 0 und 54% (Mittelwert 12,5%).

Lassen sich Monozyten vom Spender zu einem frühen Zeitpunkt nachweisen, so benötigen lediglich 2 von 8 Patienten im weiteren Verlauf eine Immunglobulinsubstitution.

Einer dieser beiden Patienten (UPN 402) weist zwar zunächst einen Spenderanteil von 5,9% auf, zeigt aber in Folgeuntersuchungen einen rein autologen Chimärismus auf Monozytenebene.

Der zweite Patient (UPN 346) zeigt mit 54% einen hohen Spenderanteil im ersten Jahr nach HSZT und auch in der Folgeuntersuchung 19 Jahre nach HSZT können 11% Spendermonozyten nachgewiesen werden. Trotz des Nachweises der Spenderzellen gehört der Patient der Gruppe IgDEP an. Detaillierte Informationen zu diesem Patienten und zur Interpretation der Daten wird wie bereits erwähnt im Diskussionsteil besprochen (siehe 4.7.).

In der Langzeituntersuchung lassen sich bei 6 von 8 Patienten der Gruppe IgIND Spender-Monozyten nachweisen. In dieser Kohorte variiert der Spenderanteil zwischen 0 und 100% (Mittelwert 51%); in der Kohorte IgDEP zeigt sich ein Spenderanteil von 0 bis 11% (Mittelwert 1,8%).

Zwei Patienten der Kohorte IgIND (UPN 15, 856) sind erwähnenswert, da sie mit einem Spenderanteil von 1% bzw. 0% einen autologen Chimärismus auf Monozyten-Ebene haben. Zwar liegen bei den Patienten UPN 782 und UPN 839 keine linienspezifischen Angaben zum

Chimärismus vor, jedoch lassen die vorliegenden Daten aus der Untersuchung des non T-Cell compartment schließen, dass auch bei ihnen keine Spendermonozyten vorliegen. Es scheint, als könnten diese Patienten ohne Immunglobulinsubstitution leben, auch wenn sich kein Engraftment auf Monozyten-Ebene nachweisen lässt. Mögliche Erklärungsansätze hierfür folgen im weiteren Verlauf (siehe 4.5.).

3.3.5 Zusammenfassung

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der reine Nachweis von Spender T-Zellen erwartungsgemäß keine Korrelation über die Notwendigkeit einer Immunglobulinsubstitution zeigt.

Der Nachweis von Spender B-Zellen und Monozyten ist ein wichtiges Diagnosekriterium, um Rückschlüsse über die Rekonstitution des B-Zell-Systems und der damit verbundenen zu erwartenden Immunfunktion zu ermöglichen. Ob dies zu einem frühen Zeitpunkt möglich ist, ist aufgrund der ausgesprochenen Dynamik der Chimärismus-Analysen – vor allem im kurzen Intervall nach HSZT– jedoch äußerst fraglich.

Die vorliegenden Daten zum linienspezifischen Chimärismus zeigen zudem, dass sich der Chimärismus innerhalb der verschiedenen Zellkompartimente einer Dynamik unterliegt und die Ergebnisse im ersten Jahr nach HSZT durchaus zu denen in der Langzeitnachsorge differieren können.

Des Weiteren gibt es Patienten (UPN 15, 782, 839 und 856), bei denen trotz des (in der zu dieser Zeit gewählten Methodik) langfristig fehlenden Nachweises von Spender B-Zellen oder Monozyten im peripheren Blut keine Immunglobulinsubstitution notwendig ist.

3.4 Zelluläre Subpopulationen

Zusätzlich zu den bisher beschriebenen retrospektiven Datenanalysen wurden im Rahmen dieser Arbeit nun verfügbare Blutproben der Patienten in der Durchflusszytometrie analysiert, um Hinweise in der Zusammensetzung der lymphozytären Subpopulationen (mit besonderem Augenmerk auf die B-zellulären-Subpopulationen) bezüglich der Notwendigkeit einer Immunglobulin-Substitution nach HSZT zu finden. Falls von einem Patienten im definierten Zeitraum zwischen 80 und 250 Tagen nach HSZT mehr als eine Probe zur Verfügung stand, wurde im Sinne der Fragestellung die früheste Probe ausgewählt.

Zur Auswertung der Ergebnisse wurden die Patienten auch hier wieder in die Gruppen IgIND und IgDEP gegliedert.

3.4.1 Lymphozyten

In einem ersten Schritt wurden die Patienten der beiden Kohorten hinsichtlich der absoluten Lymphozytenzahl pro Mikroliter verglichen. Bei einem Patienten (UPN 15) lagen zum Untersuchungszeitpunkt keine Daten über die Lymphozyten vor.

Im Mittel hatten die Patienten der Gruppe IgIND 2868 Lymphozyten pro Mikroliter; die Patienten der Gruppe IgDEP 2219 Lymphozyten pro Mikroliter (siehe Abbildung 13). Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen festgestellt werden ($p=0,445$).

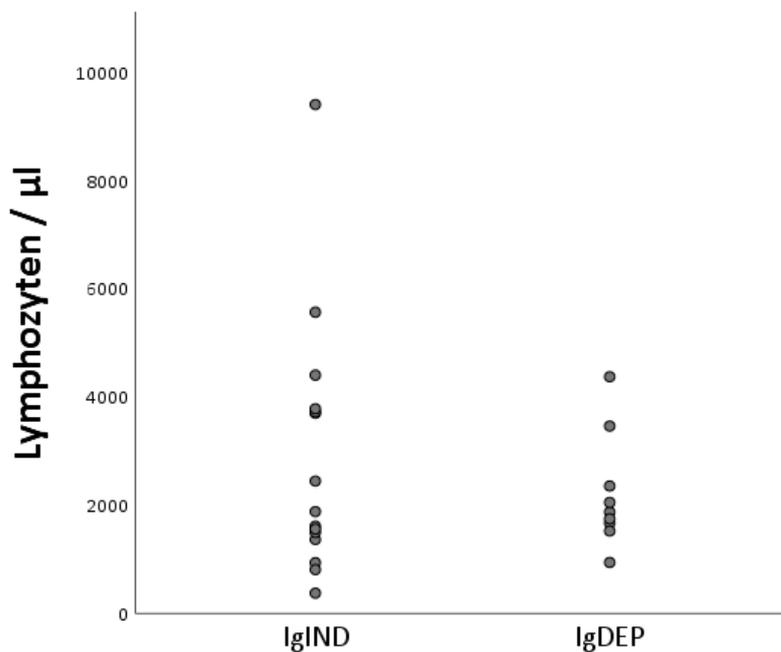


Abbildung 13 Darstellung der absoluten Lymphozytenzahl pro Mikroliter für die beiden Kohorten IgIND ($n=16$) und IgDEP ($n=9$), Universitätsklinikum Ulm, 1982-2015. Abkürzungen: μl : Mikroliter; IgDEP: Patientenkohorte mit Notwendigkeit einer Immunglobulinsubstitution; IgIND: Patientenkohorte ohne Notwendigkeit einer Immunglobulinsubstitution.

Tabelle 10 Darstellung der Daten aus der B-Zell Phänotypisierung und aus der Chimärismus-Analyse, sofern zeitnah zur BZP durchgeführt, Universitätsklinikum Ulm, 1982-2015. In den linken drei Spalten sind allgemeine Patientendaten aufgeführt. Die Spalten, die als BZP zusammengefasst sind, nennen den Zeitpunkt der Durchführung der BZP in Tagen nach HSZT, die absolute Zahl an Lymphozyten zum Untersuchungszeitpunkt und die jeweiligen Anteile an B-Zellen (CD19+ Zellen), memory B-Zellen (CD27+) und class-switched memory B-cells (IgM-CD27+). Die rechten Spalten – zusammengefasst unter der Überschrift Chimärismus-Analyse zeigen den Abstand zwischen der CA und BZP und jeweils den Spenderanteil auf T-Zell, B-Zell und Monozytenebene. Abkürzungen: B-Zell Phänotypisierung (BZP); Chimärismus-Analyse (CA); UPN: Patientennummer, IVIG: intravenöse Immunglobulinsubstitution; CD: cluster of differentiation; IgIND: unabhängig von IVIG; IgDEP: abhängig von IVIG; d: Tage; HSZT: hämatopoetische Stammzelltransplantation; Kond.: Konditionierung (0: keine Kond., 1: Kond. erhalten). Grau hinterlegt sind diejenigen Patienten, welche der Gruppe IgDEP zuzuordnen sind. Stehen Daten zu einem Untersuchungszeitpunkt nicht zur Verfügung so ist das entsprechende Feld leer. Fortsetzung der Tabelle auf der Folgeseite.

Patientendaten			B-Zell Phänotypisierung (BZP)					Linienspezifische Chimärismus-Analyse (CA)			
UPN	IVIG Status	Kond.	d nach HSZT	Lymphozyten (absolut)	% CD19 von Lymphozyten	% CD27 von CD19	% IgM-CD27+ von CD27+	d zwischen BZP und CA	% Spender T-Zellen	% Spender B-Zellen	% Spender Monozyten
15	IgIND	0	233		38	4,30	2,33				
88	IgDEP	0	127	3460	57	3,80	2,63				
246	IgDEP	0	141	1745	43	3,90	0,00				
250	IgDEP	0	182	4370	10	3,20	0,00				
289	IgIND	0	163	1494	65	7,10	26,76	116	50	12	41
346	IgDEP	1	140	1666	40	0,90	11,11	15	100	49	54
349	IgIND	0	100	1558	21	11,80	25,45				
358	IgDEP	1	103	2048	79	4,40	0,00	62	100		
368	IgIND	0	224	9398	25	25,20	19,04				
400	IgIND	1	107	808	21	8,80	62,50				
402	IgDEP	1	154	2352	27	4,10	0,00	-1	95	31	5,9
446	IgIND	1	160	936	14	5,90	28,81				
454	IgIND	1	212	1610	32	7,00	11,43	29	100	41	21
469	IgIND	1	160	3720	38	3,90	10,26	0	100	33	27
485	IgDEP	0	120	1872	61	5,10	0,00	133	98	2,5	0
506	IgDEP	0	185	940	6	3,70	0,00	169	100	7,3	2,7

Patientendaten			B-Zell Phänotypisierung (BZP)					Chimärismus-Analyse (CA)			
UPN	IVIG Status	Kond.	d nach HSZT	Lymphozyten (absolut)	% CD19 von Lymphozyten	% CD27 von CD19	% IgM-CD27+ von CD27+	d zwischen BZP und CA	% Spender T-Zellen	% Spender B-Zellen	% Spender Monozyten
522	IgDEP	0	107	1520	51	5,50	1,82	7	98	0	0
537	IgIND	1	97	374	24	8,60	19,78	1	67	96	97
558	IgIND	1	136	1880	58	6,10	13,11	6	100	100	100
589	IgIND	1	239	2444	30	12,10	13,23	0	100	100	100
619	IgIND	0	126	5562	30	3,70	11,10	10	100		
782	IgIND	0	162	3695	21	3,00	6,67				
839	IgIND	1	133	1364	15	1,60	25,00	222	100		
856	IgIND	1	181	3780	19	9,80	8,16	0	100	55	2,4
875	IgIND	0	146	4400	20	1,70	11,76	0	100		

3.4.2 B-Zellen

Im nächsten Schritt wurde der prozentuale Anteil der B-Zellen (CD19⁺) innerhalb der Lymphozytenpopulation betrachtet (siehe Abbildung 14). Auch in dieser Zellpopulation konnte kein signifikanter Unterschied dargestellt werden (Mittelwerte für IgIND 29,4%, für IgDEP 41,6%; $p=0,126$).

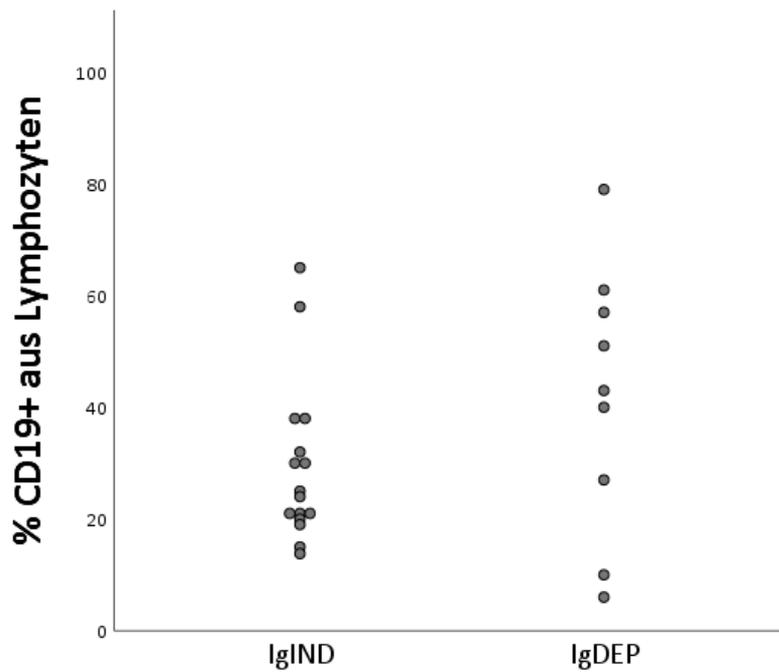


Abbildung 14 Darstellung des prozentualen Anteils von CD19⁺ Zellen (B-Lymphozyten) innerhalb der Gesamtpopulation der Lymphozyten für die Kohorten IgIND (n=16) und IgDEP (n=9), Universitätsklinikum Ulm, 1982-2015. Abkürzungen: IgDEP: Patientenkohorte mit Notwendigkeit einer Immunglobulinsubstitution; IgIND: Patientenkohorte ohne Notwendigkeit einer Immunglobulinsubstitution.

3.4.3 CD27⁺ B-Zellen

In einem weiteren Schritt wurde die CD27 positive Population – also die memory B-cells – innerhalb der CD19 positiven B-Lymphozyten analysiert (siehe Abbildung 15).

Bei Betrachten der Daten fällt auf, dass die Kohorte der IgIND einen höheren Anteil an memory B-cells generiert. In der statistischen Analyse bestätigt sich hinsichtlich dieser Zellpopulation ein signifikanter Unterschied (Mittelwert IgIND 7,53% bzw. 3,84% IgDEP; $p=0,02$).

Nichtsdestotrotz sind in der Kohorte IgDEP ebenfalls eine nachweisbare Anzahl an CD27 positiven B-Zellen nachzuweisen. Bei genauerer Differenzierung fällt auf, dass es sich hierbei vor allem um „Marginalzonen-like“ B-Zellen handelt, die ebenfalls das Oberflächenmerkmal CD27 tragen (siehe 1.1.2.3.).

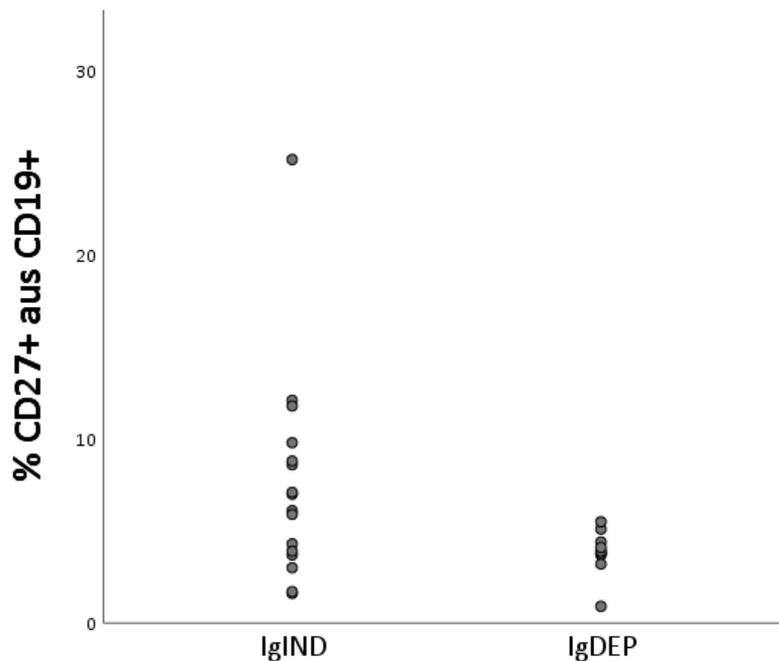


Abbildung 15 Darstellung des prozentualen Anteils von CD27⁺ Zellen innerhalb der Gesamtpopulation der CD19⁺ Zellen für die Kohorten IgIND (n=16) und IgDEP (n=9), Universitätsklinikum Ulm, 1982-2015. Jeder dargestellte Punkt entspricht einem erhobenen Messwert. Abkürzungen: IgDEP: Patientenkohorte mit Notwendigkeit einer Immunglobulinsubstitution; IgIND: Patientenkohorte ohne Notwendigkeit einer Immunglobulinsubstitution; CD: cluster of differentiation.

bestimmten Fällen auch ein niedriger Anteil an class-switched memory B-cells aus, um eine ausreichende Immunfunktion zu gewährleisten. Mögliche Erklärungen werden im weiteren Verlauf diskutiert.

In der Kohorte IgDEP fällt auf, dass sich bei drei Patienten class-switched memory b-cells nachweisen lassen, obwohl die Patienten eine Immunglobulinsubstitution benötigen.

Ein Patient (UPN 346) wird im weiteren Verlauf gesondert betrachtet (siehe 4.7.).

Die Patienten UPN 88 und UPN 522 zeigen einen kleinen Anteil von memory b-cells, die den Klassenwechsel vollzogen haben, benötigen jedoch im Verlauf Immunglobuline. Weitere Verlaufskontrollen 24 Jahre (UPN 88) bzw. 3 Jahre (UPN522) nach HSZT zeigen jedoch, dass sich bei diesen Patienten keine class-switched memory b-cells mehr nachweisen lassen (data not shown, weiter Erläuterungen siehe 4.4.).

Um aus diesen Daten einen klinischen Parameter zu generieren, der als Cut Off zur Differenzierung der beiden Kohorten dient, wurde eine Grenzwertoptimierungsanalyse (ROC-Analyse, siehe Abbildung 17) durchgeführt.

Hierbei zeigte sich, dass mehr als 4,65% class-switched memory B-Zellen innerhalb der CD27⁺ memory B-cells in der untersuchten Kohorte mit einer Sensitivität von 93,8% und einer Spezifität von 89,9% (siehe Abbildung 16, gestrichelte Linie) einen optimalen Grenzwert liefert.

In anderen Worten ausgedrückt heißt das, dass lediglich einer von 16 Patienten einen Anteil über 4,65% class-switched memory B-Zellen aufweist und trotzdem eine Immunglobulinsubstitution benötigt.

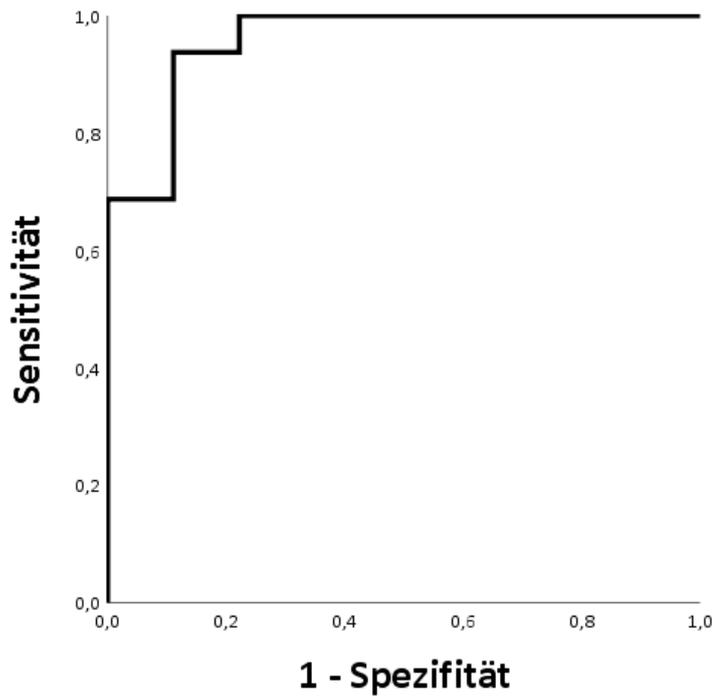


Abbildung 17 ROC-Analyse zur Grenzwertoptimierung zwischen den Populationen IgIND (n=16) und IgDEP (n=9) hinsichtlich des Anteils der class-switched memory B-cells innerhalb der memory B-cells (siehe Abbildung 17) zur Ermittlung eines Cut Offs mit optimaler Sensitivität und Spezifität, Universitätsklinikum Ulm, 1982-2015. Auf der y-Achse ist die Sensitivität aufgetragen, auf der x-Achse aus Gründen der Darstellung 1-Spezifität. Im Rahmen dieser Untersuchung zeigt mit einer Sensitivität von 93,8% und einer Spezifität von 89,9% der Cut-off von 4,65% class-switched memory B-cells innerhalb der memory B-cells als optimaler Grenzwert zwischen den Populationen. Abkürzungen: IgDEP: Patientenkohorte mit Notwendigkeit einer Immunglobulinsubstitution; IgIND: Patientenkohorte ohne Notwendigkeit einer Immunglobulinsubstitution, ROC: Receiver Operating Characteristic.

3.5 Konditionierung

Von den 25 in dieser Arbeit untersuchten Patienten haben 12 Patienten eine Konditionierung vor HSZT erhalten und 13 nicht.

Im Folgenden wird dargestellt, ob die Konditionierung einen Einfluss auf das Engraftment der verschiedenen Zell-Linien und schlussendlich auf die Funktion des Immunsystems hat. Beachtet werden muss jedoch, dass im Rahmen dieses Abschnitts lediglich die haploidentisch transplantierten Patienten untersucht werden können, da nur für diese Gruppe ein quantifizierbarer linienspezifischer Chimärismus vorliegt.

Auf T-Zell Basis zeigt sich im ersten Jahr nach HSZT bei Patienten mit Konditionierung ein Spenderanteil von durchschnittlich 96,7% (67%-100%), bei Patienten ohne Konditionierung von 91% (50%-100%). Zum letzten verfügbaren Untersuchungszeitpunkt lässt sich ein Spenderanteil von durchschnittlich 100% (mit Konditionierung) bzw. 98% (86-100%; ohne Konditionierung) nachweisen. Zu keinem Zeitpunkt kann ein signifikanter Unterschied dargestellt werden ($p=0,502$ respektive $p=0,351$).

Tabelle 11 Darstellung des Spender-Chimärismus (in%) in Abhängigkeit von Konditionierung (0: keine Konditionierung; 1: Konditionierung) und Erhebungszeitpunkt, Universitätsklinikum Ulm, 1982-2015.

		Konditionierung		p
		0 (n=13)	1 (n=12)	
% Spender T-Zellen	früh	91% (50-100)	96,7% (67-100)	0,502
	spät	98,3% (86-100)	100%	0,351
% Spender B-Zellen	früh	5,5 (0-12)	61,1 (15-100)	0,001
	spät	11% (0-73)	52 (0-100)	0,053
% Spender Monozyten	früh	10,9 (0-41%)	50,5 (5,9-100)	0,052
	spät	16,8 (0-82%)	41 (0,100)	0,146

Betrachtet man den Chimärismus auf B-Zell Ebene zu den beiden Untersuchungszeitpunkten, dann zeigt sich, dass Patienten mit Konditionierung einen höheren Spenderanteil aufweisen.

Patienten mit Konditionierung haben in der Untersuchung im ersten Jahr nach HSZT einen Spenderanteil von durchschnittlich 61,1% (15%-100%) und zum letzten verfügbaren Zeitpunkt von durchschnittlich 52% (0%-100%), wohingegen Patienten ohne Konditionierung einen dominanten Anteil autologer B-Zellen haben (frühe Untersuchung

durchschnittlich 5,5% (0%-12%); späte Untersuchung durchschnittlich 11% (0%-73%). Es zeigt sich zu einem frühen Zeitpunkt ein signifikanter Unterschied ($p=0,001$), zu einem späten Zeitpunkt jedoch nicht ($p=0,053$).

Definiert man B-Zell Funktion mit dem oben definierten Cut-Off von über 4,6% IgM-negativer Zellen in der CD27-positiven B-Zell-Population, so zeigt sich, dass 83% der Patienten mit Konditionierung (10/12) darüber liegen und damit eine suffiziente B-Zell Funktion haben. Bei Patienten ohne Konditionierung sind es lediglich 46%.

Zudem zeigt sich, dass von den 12 konditionierten Patienten nur 3 Patienten von einer Immunglobulinsubstitution abhängig sind (25%); bei den Patienten ohne Konditionierung es hingegen 6 Patienten von 13 (46%) sind.

Bei den Monozyten verhält es sich ähnlich. So zeigen Patienten mit Konditionierung einen Spender-Anteil von 50,5% (5,9-100) bzw. 41% (0-100%) und Patienten ohne Konditionierung 10,9 (0-41) bzw. 16,8% (0-82). Zu keinem Zeitpunkt zeigt sich ein statistisch signifikanter Unterschied (früher Zeitpunkt $p=0,052$; später Zeitpunkt $p=0,146$).

4 Diskussion

Im Folgenden sollen nun die aus dieser Arbeit generierten Ergebnisse vor dem Hintergrund des aktuellen Standes der Wissenschaft diskutiert werden.

Bei der Diskussion der hier dargestellten Daten muss beachtet werden, dass es sich bei schweren kombinierten Immundefekten um seltene Erkrankungen handelt und es dadurch nur wenige Patienten gibt, die zur Analyse zur Verfügung stehen. Die Aussagekraft der Ergebnisse ist dadurch eingeschränkt beurteilbar.

Viele der zitierten Arbeiten sind Übersichtsarbeiten aus einer Kohorte mit verschiedenen SCID-Entitäten, wohingegen im Rahmen dieser Arbeit ausschließlich *IL2RG/JAK3*-SCID Patienten analysiert worden sind.

4.1 Status Quo – Immunglobuline nach HSZT

In einer großen Übersichtsarbeit aus dem Jahr 2010 wurden Daten über Patienten mit SCID nach HSZT aus 18 amerikanischen und europäischen Zentren zusammengefasst. Hierbei zeigte sich, dass 300 von 656 erfassten Patienten – also knapp 46% – nach der HSZT eine Immunglobulinsubstitution benötigen. [6] Eine Untersuchung des deutschen nationalen Registers primärer Immundefekte konnte zeigen, dass 24 Prozent (20/83 untersuchten Patienten) der analysierten SCID-Patienten eine Immunglobulinsubstitution nach HSZT benötigen. [18]

In vielen weiteren Arbeiten ist die Rekonstitution des Immunsystems im Organismus des Empfängers und die damit verbundene Notwendigkeit der Immunglobulinsubstitution nach HSZT ein intensiv diskutiertes Thema. [9,47,55,60].

Wieso manche Patienten auf lange Zeit von Immunglobulinen abhängig sind und manche nicht, ist in vielen Einzelfällen unklar.

Es gibt jedoch offensichtlich einen Zusammenhang zwischen der Abhängigkeit von Immunglobulinen und der zugrundeliegenden Erkrankung (genetische Entität des SCID), Art und Intensität der Konditionierung, spenderabhängigen Kriterien und insbesondere des nach der Transplantation erreichten Chimärismus. [55]

Ziel dieser Arbeit ist es, einen Parameter zu erarbeiten, der zur Beurteilung der B-zellulären Funktion beitragen und darüber hinaus Hinweise liefern kann, ob eine Therapie mit Immunglobulinen notwendig ist oder nicht.

Aktuell gibt es keine einheitlichen Richtlinien, wie mit der Immunglobulinsubstitution nach HSZT verfahren werden soll. So entscheidet der behandelnde Arzt je nach Klinik des Patienten und dem Verlauf nach HSZT, wann und ob ein Auslassversuch sinnvoll erscheint. Zudem spielen Faktoren wie die Dauer und Intensität der Immunsuppression, die Analyse von Chimärismusdaten, Serumspiegeln von Immunglobulinen und der Nachweis von spezifischen Impfantikörpern eine wichtige Rolle bei der Entscheidung. Für Impfungen sollte jedoch bereits eine mehrwöchige Pause der Immunglobulinsubstitution eingehalten werden, damit die in den Immunglobulinpräparaten befindlichen Antikörper die Impfantigene nicht neutralisieren und die Impfantwort durch Bestimmung der spezifischen Impfantikörper überprüft werden kann. [42,52]

4.2 Der Immunglobulinspiegel als prädiktiver Marker für die Notwendigkeit einer Immunglobulinsubstitution

Man könnte meinen, dass die Messung der Immunglobulinspiegel im Blut der Patienten einen Hinweis darüber geben kann, ob nach einer HSZT eine suffiziente humorale B-Zell Funktion vorliegt.

Wir konnten anhand der in dieser Arbeit generierten Daten zeigen, dass weder der Spiegel von IgG noch der Spiegel von IgM zu den definierten Untersuchungszeitpunkten 50 Tage, 150 Tage oder mindestens 250 Tage nach HSZT eine prädiktive Aussagekraft zur zukünftigen Immunfunktion erlaubt.

Lediglich der Spiegel von IgA zum spätesten von uns gewählten Analysezeitpunkt (mindestens 250 Tage nach HSZT) konnte einen signifikanten Unterschied ($p=0,014$) zwischen den Kohorten abbilden.

Die Aussagekraft von IgG im Vergleich der beiden Patientengruppen IgDEP und IgIND ist nur eingeschränkt beurteilbar. Um einen validen Serumspiegel der IgG-Eigenproduktion in der Kohorte IgDEP zu messen, müsste man die Applikation der Immunglobuline für einen Zeitraum von mindestens drei Monaten unterbrechen, was vor dem Hintergrund des sich regenerierenden Immunsystems und drohender Infektionen ein relevantes klinisches Risiko darstellt und zudem keine frühe Aussage über die Rekonstitution des B-zellulären Kompartiments im Sinne der Fragestellung erlauben würde.

Zudem kann der Spiegel – vor allem bei sehr jungen Patienten – auch durch diaplazentar übertragenes maternales IgG beeinflusst werden. [7]

Betrachtet man den Spiegel von IgM im Serum der beiden Patientengruppen, so scheint ein gewisser Unterschied sichtbar zu sein, der jedoch keine statistische Signifikanz erreicht. Ähnliche Ergebnisse wurden vor Kurzem von einer Arbeitsgruppe aus den USA publiziert. So konnte auch dort ein gewisser Unterschied des IgM Spiegels zwischen Patienten mit und ohne Immunglobulinsubstitution festgestellt werden, jedoch erwies sich ein normwertiger IgM Spiegel nicht prädiktiv für die Unabhängigkeit von Immunglobulinen. [47]

Des Weiteren muss erwähnt werden, dass auch bei einigen Patienten vor HSZT normwertige Spiegel von IgM nachgewiesen werden konnten. [7]

Dies konnte zum Teil auch bei unseren Patienten gezeigt werden.

Der Spiegel von IgA zu dem in dieser Arbeit am spätesten untersuchten Zeitpunkt (mindestens 250 Tage nach HSZT) zeigte den einzigen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den untersuchten Kohorten ($p=0,014$).

So korrelierte in unserer Kohorte der IgA Spiegel ab Tag 250 mit der Unabhängigkeit einer Immunglobulinsubstitution.

Die Wichtigkeit der IgA-Sekretion nach HSZT zeigt sich auch in einer großen amerikanischen Untersuchung, die in ihrer Arbeit B-Zell Funktion als Unabhängigkeit von Immunglobulinsubstitution und einem normalen Serumspiegel von IgA definieren. [55] Daten vor HSZT zeigen, dass vor allem *IL2RG/JAK3*-Defizienz mit einem Mangel von IgA assoziiert ist. [7] Diese Erkenntnisse können auch auf die von uns untersuchten Patienten übertragen werden.

Wichtig bei der Diskussion von IgA-Spiegeln ist jedoch zu erwähnen, dass die Normwerte für IgA bei gesunden Kindern in dieser Altersspanne physiologischerweise auch das komplette Fehlen von IgA mit einschließen. [77]

Somit scheinen die Serumspiegel für IgA – trotz eines statistisch signifikanten Unterschieds zwischen der IgIND- und IgDEP- Gruppe – nicht geeignet, um als Hinweis auf einen B-zellulären Funktionsdefekt genutzt zu werden. Ein nachweisbarer IgA Serumspiegel kann lediglich im positiven Falle als hinweisend gewertet werden.

4.3 Non T-cell engraftment wichtig für die Etablierung einer humoralen spezifischen Immunfunktion

Bei Betrachtung des immunologischen Phänotyps von Patienten mit *IL2RG*- bzw. *JAK3*-Defekt könnte man annehmen, dass das Engraftment von Spender T-Zellen ausreichen sollte, um die autologen B-Zellen, welche bisher kein T-Zell Signal zur weiteren Differenzierung erhalten konnten, zu aktivieren, da diese bereits im Organismus des Empfängers vorhanden sind.

In den bei unseren Patienten durchgeführten Chimärismus-Analysen konnte kein Zusammenhang zwischen T-Zell Engraftment und B-Zell Funktion dargestellt werden.

Somit bestätigt sich in dieser Kohorte der primäre B-Zell-Defekt für alle Patienten der Kohorte - wie in der Literatur für Patienten mit Varianten in *JAK3* oder *IL2RG* wiederholt beschrieben. Das entscheidende Kriterium für eine humorale Immunfunktion ist folglich das Engraftment von Spender B-Zellen (beziehungsweise insbesondere non T-cells). [8,47,74]

Bei SCID-Entitäten mit anderen genetischen Ursachen und somit anderer Pathophysiologie (beispielsweise Defekte, die *ZAP70*, *CD3D* oder *IL7RA* betreffen), reicht das alleinige T-Zell Engraftment hingegen aus, um eine ausreichende B-Zell Funktion zu erreichen. [32]

Obwohl wie erwähnt nach erfolgreicher HSZT alle T-Zellen vom Spender kommen sollten, konnte im Rahmen der linienspezifischen Chimärismus-Analysen in unserer Kohorte bei wenigen Patienten auch ein autologer Anteil von T-Zellen – auch zu sehr späten Untersuchungszeitpunkten – gezeigt werden.

Ein erster möglicher Erklärungsansatz hierfür ist das Phänomen der Reversion. So können einzelne autologe T-zelluläre Vorläufer eine Reversion ihres genetischen Defekts durchlaufen und diesen dadurch korrigieren. Hierunter versteht man eine „Rückmutation“ der genetischen Variante zum Wildtyp. Durch Expression eines Wildtyp-Proteins ist es diesen T-zell-Vorläufern möglich, eine (weitestgehend) normale Entwicklung zu durchlaufen und zu reifen, funktionsfähigen T-Zellen auszudifferenzieren. Dies konnte bereits in einzelnen Fällen beschrieben werden und kann die Ursache für einen mildereren Krankheitsverlauf oder das spätere Erkennen einer Erkrankung sein. [22,35,36,40,49] Dieser Prozess sollte prinzipiell auch nach einer erfolgreichen Transplantation bei

persistierenden autologen Stammzellen möglich sein. Einzelfälle wurden auch in dieser Kohorte bereits identifiziert und finden sich gerade in wissenschaftlicher Aufarbeitung (unter anderem UPN 250; diese Daten wurden bisher noch nicht publiziert. Für Rückfragen bitte persönliche Kommunikation PD Dr. med. M. Hönig, Klinik für Kinder- und Jugendmedizin, Universitätsklinik Ulm).

Eine zweite Erklärungsmöglichkeit für den scheinbaren Nachweis autologer T-Zellen nach Stammzelltransplantation in dieser Kohorte kann in methodischen Schwächen liegen.

So zeigt sich bei Patient UPN 537 in der Untersuchung knapp vier Monate nach HSZT ein Anteil von lediglich 67% positiv für einen spezifischen Antikörper gegen das Spender-HLA-Allel. In diesem Fall wurde eine Gegenfärbung mit einem Antikörper durchgeführt der spezifisch des Empfänger-Allel nachweisen müsste (data not shown), und die 33% autologen T-Zellen anfärben müsste. Diese Kontrolle fällt jedoch negativ aus, d.h. der Empfänger-spezifische HLA-Antikörper bindet an keinerlei Zellen. Somit ist davon auszugehen, dass ein kompletter Spenderchimärismus der T-Zellen vorliegt und keine autologen T-Zellen nachweisbar sind.

Eine weitere mögliche Ursache für den Nachweis autologer T-Zellen bei einem schweren kombinierten Immundefekt ist die Diagnose eines Omenn-Syndroms. Im Rahmen dieses Krankheitsbildes lassen sich im Gegensatz zu den anderen SCID-Entitäten T-Lymphozyten im Blut des Patienten nachweisen. [1,63,71] So lässt sich auch erklären, wieso bei Patient UPN 289 (Diagnose eines Omenn-Syndroms bei *JAK3*-Mutation) autologe T-Zellen in der Untersuchung 10 Monate nach HSZT nachweisbar waren. In einer Folgeuntersuchung 17 Monate nach HSZT sind diese jedoch nicht mehr nachweisbar.

4.4 Class-switched memory B-cells als diskriminierende Zellpopulation

Im Rahmen der B-Zell Phänotypisierung zeigte sich die Population der class-switched memory B-cells als diskriminierend für die zu erwartende B-Zell Funktion.

Wie viele Spender B-Lymphozyten für eine ausreichende B-Zell Funktion und die damit verbundene Unabhängigkeit von regelmäßigen Immunglobulinsubstitutionen benötigt sind ist unklar, jedoch scheint ein kleiner im peripheren Blut messbarer Anteil ausreichend zu sein, was sich auch in unserer Kohorte zeigt. [17,74]

Der Immunphänotyp von *IL2RG/JAK3*-SCID Patienten vor Transplantation zeigt, dass die autologen B-Zellen nicht bis zu klassengewechselten IgM negativen und IgG oder IgA positiven B-Zellen ausreifen können. [74]

Es scheint so, als läge bei den autologen B-Zellen ein Entwicklungsarrest vor, der die Differenzierung in class-switched memory B-cells verhindert. Einige Arbeiten konnten zeigen, dass vor allem die Rolle von Interleukin 21 wichtig für diese Stufe der B-Zell Entwicklung ist. Diese Tatsache erklärt, wieso autologe B-Zellen keine weiteren Entwicklungsschritte vollziehen können, da die IL21-Signaltransduktion bei Patienten mit *IL2RG/JAK3*-SCID dysfunktional ist. [47,59,74]

Zuletzt konnte eine Publikation zeigen, dass sich bei Patienten mit Defekten in *IL2RG* und *JAK3* nach Stammzelltransplantation nur Spender B-Zellen nach in vitro Stimulation mit CD40L und Interleukin 21 zu class-switched memory B-cells entwickeln können, wohingegen autologe (und damit funktionslose) B-Zellen diesen Entwicklungsschritt nicht durchführen können. [47]

Durch die Untersuchungen an der hier beschriebenen Patientenkohorte konnten wir nun zeigen, dass der Entwicklungsarrest auf Ebene der CD27⁺IgM⁺ Marginalzonen-like B-Zellen stattfindet (Jacobsen et al., Publikation aktuell in Vorbereitung).

CD27 ist ein Oberflächenprotein, das Gedächtniszellen nach T-Zell-Hilfe und Isotypenswitch exprimieren, aber auch auf der Oberfläche von einem anderen B-zellulären Differenzierungswegs – den sogenannten Marginalzonen-like B-Zellen – nachgewiesen werden kann. Diese entwickeln sich unabhängig von Interleukin 21 und brauchen für ihre Ausreifung nach bisherigem Verständnis keine T-Zell-Hilfe.

So können in der Population der CD27 positiven Zellen auch autologe B-Zellen gefunden werden (siehe Abbildung 16), jedoch können ausschließlich die Spender B-Zellen den

Differenzierungsschritt zu IgM-CD27+ Gedächtniszellen leisten, da nur diese das IL21-Signal verarbeiten können.

Des Weiteren konnte in unserer Arbeitsgruppe (Jacobsen et al., Publikation aktuell in Vorbereitung) gezeigt werden, dass der Anteil der class-switched memory B-cells umso höher ist, je kleiner der Anteil von Spender B-Zellen ist. Dies kann erklären, wieso Patienten mit einem sehr kleinen Anteil von Spender B-Zellen eine ausreichende B-Zell Funktion haben und keine Immunglobuline benötigen.

Zudem stammen unsere und die zitierten Ergebnisse sämtlich aus Untersuchungen von peripherem Blut der Patienten, die nicht zwingend repräsentativ für die Zusammensetzung des gesamten B-Zell-Kompartimentes sind. Es ist daher wichtig zu bemerken, dass wir in diesen Untersuchungen keine Informationen über wesentliche Teile des B-lymphozytären Systems in den diagnostisch schwer zugänglichen lymphatischen Organen wie Knochenmark, Lymphknoten, Milz oder den Schleimhäuten beitragen können.

Betrachtet man die Patienten UPN 782 und 839 so fällt auf, dass diese im Rahmen der zuletzt vorliegenden Chimärismus Untersuchung einen Spenderanteil von 0% in der CD3 negativen Zellpopulation – und somit einen rein autologen Anteil von B-Zellen – haben. Diese beiden Patienten müssen folglich der Kohorte IgDEP zuzuordnen sein, benötigen jedoch entgegen der Erwartung keine Immunglobulinsubstitution.

Dies könnte dadurch erklärt werden, dass der Anteil an Spender B-Zellen zu klein ist, um mit den aktuell verfügbaren Methoden detektiert zu werden und ein sogenanntes Mikroengraftment vorliegt. [2,54,70]

Des Weiteren ist analog zu der Überlegung bei den autologen T-Lymphozyten denkbar, dass auch autologe B-Lymphozyten eine Reversion ihrer genetischen Mutation erfahren.

So können die autologen Zellen durch eine „Rückmutation“ zum Wildtyp oder durch eine kompensatorische genetische Variante plötzlich wieder funktionsfähig sein.

Das Phänomen der Reversion konnte bereits bei Patienten mit einem Immundefekt bewiesen werden, jedoch bisher nur auf Ebene der T-Lymphozyten. [22,35,36,40,49]

Ob B-Lymphozyten ebenfalls durch eine Reversion ihre Funktion wieder erlangen können, wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht nachgegangen, ist jedoch ein Ansatzpunkt für zukünftige Forschungsprojekte. So könnte man beispielsweise eine gezielte Chimärismus-

Analyse an isolierten B-Lymphozyten durchführen. Im Rahmen dieser Analyse müsste die Population der switched memory B-cells ausschließlich aus Spenderzellen bestehen. Falls autologe B-Zellen innerhalb dieser Population nachgewiesen werden, müsste in diesen B-Zellen eine Reversion stattgefunden haben, da sie ansonsten nicht zum Klassenwechsel fähig wären.

Insgesamt untermauern die Ergebnisse aus anderen Arbeiten die Wichtigkeit unserer Erkenntnisse aus der B-Zell Phänotypisierung und die Bedeutung von class-switched memory B-cells für die Entwicklung einer funktionalen humoralen B-Zell Immunität. [47] So müssen class-switched memory B-cells, die in einer Patientenprobe nachgewiesen werden, bei der hier untersuchten Kohorte zwingend vom Spender kommen, da wir zeigen konnten, dass die autologen B-Zellen nicht funktional sind und in vivo nicht den entscheidenden Differenzierungsschritt vollziehen können.

Somit kann in einer durchflusszytometrischen Analyse der Nachweis einer Zellpopulation des Spenders ohne größeren methodischen Aufwand im Rahmen der Routineuntersuchungen nach HSZT gelingen.

Auch die Tatsache, dass ein kleiner Anteil von class-switched memory B-cells in anderen Arbeiten als ausreichend deklariert wurde, passt zu den Ergebnissen dieser Untersuchung.

Wir konnten bei drei Patienten (UPN 88, 346, 522) allerdings class-switched memory B-cells nachweisen, obwohl diese Patienten der Kohorte IgDEP zugeordnet wurden und somit Immunglobuline benötigen, obwohl man bei ihnen scheinbar funktionierende Zellen des Spenders nachweisen kann.

Bei Patient UPN 88 konnten 2,33% class-switched memory b-cells innerhalb der CD27 positiven Population an Tag 127 nach HSZT nachgewiesen werden. Leider gibt es bei diesem Patienten keine Daten zum Chimärismus zum Untersuchungszeitpunkt der B-Zell Phänotypisierung. Im Follow-Up nach 24 Jahren konnten jedoch ausschließlich autologe Zellen auf Ebene der B-Zellen bzw. der Monozyten nachgewiesen werden. Vermutlich handelt es sich bei diesem Patienten um ein transientes Engraftment der Spender B-Zellen, da zwar an Tag 127 nach HSZT class-switched memory b-cells vorliegen, im Verlauf jedoch nur noch autologe Zellen nachweisbar sind.

Bei Patient UPN 522 liegt ein Anteil von 1,82% class-switched memory B-cells innerhalb der CD27 positiven Zellpopulation vor. Bei diesem Patienten konnten 7 Tage nach durchgeführter B-Zell Phänotypisierung ausschließlich autologe Monozyten und B-Zellen nachgewiesen werden. Auch im Follow-Up nach 3 Jahren zeigten sich ausschließlich Spender T-Zellen, aber lediglich autologe Zellen auf Ebene der B-Zellen und Monozyten. Somit scheint es sich bei ihm auch um ein transientes Phänomen zu handeln. Der Patient UPN 346 wird im weiteren Verlauf gesondert betrachtet (siehe 4.7.)

4.5 B-Zell Funktion ist in Ausnahmefällen ohne Stammzellengraftment möglich

Wie bereits beschrieben, ist das Engraftment von non T-cells (in dieser Mischpopulation sind die Spender B-Zellen enthalten) entscheidend für die Rekonstitution der B-Zell Funktion. In dieser Mischpopulation aus Lymphozyten und Monozyten sind die Spender B-Zellen repräsentiert und es gilt die Erfahrung, dass sich Spender B-Zellen nur beim Anwachsen pluripotenter hämatopoetischer Stammzellen im Knochenmark ausdifferenzieren können.

Im Rahmen der Analyse fallen zwei Patienten (UPN 782, 839) auf, bei denen im Rahmen der Chimärismus-Analyse kein Hinweis auf ein Stammzellengraftment vorliegt, jedoch keine Immunglobulinsubstitution benötigt wird.

Bei UPN 782 liegt nur eine Chimärismus-Analyse knapp 2,5 Jahre nach HSZT vor. Im Rahmen dieser Analyse zeigte sich ein Spenderanteil von 100% auf T-Zell Ebene und ein ausschließlich autologer Anteil im non T-cell compartment.

Im Rahmen der B-Zell Untersuchung zeigen sich jedoch class-switched memory B-cells, was zwingend für das Vorliegen von Spender B-Zellen spricht, da die autologen B-Zellen wie bereits beschrieben keinen Klassenwechsel vollziehen können.

Bei UPN 839 zeigte sich einem Jahr nach HSZT ein Spenderanteil von 96% auf non T-cell Ebene. 5 Jahre später kann nur ein rein autologer Anteil im untersuchten non T-cell compartment detektiert werden.

Auch bei diesem Patienten finden sich zu späteren Untersuchungszeitpunkten class-switched memory B-cells, die zwingend vom Spender kommen müssen.

Wieso sich bei diesen Patienten zu späten Untersuchungszeitpunkten kein Engraftment auf non T-cell Ebene nachweisen lässt, kann nicht eindeutig belegt werden.

Ein möglicher Erklärungsversuch ist die unzureichende Sensitivität der Untersuchungsmethode. Bei beiden Patienten wurde die Chimärismus-Analyse mittels XY-FISH durchgeführt. Diese Untersuchungsmethode kann sehr kleine Zellpopulationen nur schwer detektieren. Selbst bei STR-Analysen – dem Goldstandard zur quantitativen linienspezifischen Chimärismus-Analyse – beschränkt sich das Detektionslevel von kleinen Populationen je nach Quelle und Art der Analyse auf 0,1% bis 5%. [2,54,70]

Des Weiteren kann vermutet werden, dass die bei UPN 839 anfangs nachgewiesenen Spender B-Zellen ausreichend waren, um langlebige Immunglobulinproduzierende Plasmazellen im Knochenmark zu etablieren. So können in den weiteren Untersuchungen zwar keine Spender B-Zellen im peripheren Blut nachgewiesen werden können, jedoch reichen die initial nachweisbaren Spender B-Zellen aus, um eine langfristige humorale Immunität zu gewährleisten.

Man könnte die Hypothese aufstellen, dass das non T-cell Engraftment initial nachweisbar gewesen ist, der Spenderanteil jedoch im Verlauf verloren ging.

Dieses Phänomen zeigt sich auch bei den Patienten UPN 402 und UPN 485. Beide Patienten haben in der Chimärismus Analyse im ersten Jahr nach HSZT einen nachweisbaren Anteil von Spender B-Zellen, im weiteren Verlauf jedoch auch einen rein autologen Anteil im non t-Cell compartment.

Ein dritter Erklärungsversuch für den ausschließlichen Nachweis von autologen non T-cells, ohne der Notwendigkeit von Immunglobulinen kann die Tatsache sein, dass im Rahmen der Chimärismus-Analysen der Spender-Anteil lediglich im peripheren Blut (und gegebenenfalls im Knochenmark gemessen wird) und keine Informationen bezüglich der Verhältnisse in den sekundär lymphatischen Organen vorliegen. Ein so genanntes peripheres B-Zell Engraftment ohne Stammzellengraftment scheint möglich zu sein, konnte jedoch bisher noch nicht belegt oder im Tierversuch gezeigt werden.

Ein weiterer Überlegungsansatz wäre die Reversion autologer B-Zellen. Wie bereits im Kapitel 4.4. erwähnt, ist in einigen Fällen die Reversion von T-Lymphozyten beschrieben worden. [22,35,36,40,49]

Dadurch wird der genetische Defekt innerhalb der Zelle behoben und die T-Lymphozyten sind wieder funktional. Bisher wurde dieses Phänomen nicht bei B-Lymphozyten beschrieben, dies könnte jedoch denkbar sein und ist ein Ansatzpunkt für weitere Forschungsprojekte (siehe 4.4.).

4.6 Durch eine Konditionierung gelingt bei *IL2RG/JAK3-SCID* ein besseres B-Zell

Engraftment.

Patienten mit *IL2RG/JAK3-SCID* brauchen nicht zwingend eine Konditionierung im Vorfeld ihrer HSZT, da die Patienten bei dieser Krankheitsentität keine autologen T-Zellen haben und eine Abstoßungsreaktion somit relativ unwahrscheinlich ist, jedoch scheint die Konditionierung ein wichtiger Faktor für das Öffnen von Nischen im Knochenmark zu sein, in denen sich die Stammzellen des Spenders einnisten können.

Ob und wie intensiv eine Konditionierung durchgeführt werden soll, ist ein intensiv diskutiertes Thema und hängt von multiplen Parametern wie dem Zustand des Empfängers und dessen Belastung durch Infektionen, vom zur Verfügung stehenden Spender und nicht zuletzt vom molekularen Defekt des Empfängers ab. [32]

Letzterer hat Einfluss auf die Funktion der B-Zellen nach Etablierung eines T-Zell-Systems und auf die Möglichkeit einer Abstoßung durch vorhandene NK-Zellen. Verschiedene Arbeiten zeigen, dass durch eine Konditionierung das Engraftment von B-Zellen und deren Funktion verbessert wird [28,31], jedoch gibt es auch Patienten, die ohne Konditionierung eine B-Zell Funktion entwickeln. [16,27,32]

Dies spiegelt sich auch in den Daten der hier beschriebenen Kohorte wider.

So benötigen Patienten in unserer Kohorte nach Konditionierung in 75% der Fälle keine langfristige Immunglobulinsubstitution, jedoch gibt es auch 6 Patienten, die auch ohne Konditionierung eine ausreichende B-Zell Funktion etablieren konnten.

Gegen eine Konditionierung kann sprechen, dass es durch die Toxizität der Chemotherapie zu häufig reversiblen, aber auch irreversiblen Schäden an verschiedenen Organen kommen kann und es nicht zu einer wesentlichen Verbesserung des Gesamt-Überlebens der Patienten kommt.

Zusätzlich müssen noch unbekannt oder bekannte Langzeitschäden wie kognitive Beeinträchtigung, Wachstums- und Entwicklungsverzögerung, hormonelle Regulationsstörungen und gonadale Dysfunktion berücksichtigt werden. [28,31,32]

Da sich aber auch für das T-Zell-System nach HSZT ein besseres Langzeitergebnis nach Konditionierung zeigt, empfiehlt die aktuelle Leitlinie der Inborn Errors Working Party der Europäischen Gesellschaft für Immundefizienz (ESID) bei Patienten mit SCID eine Konditionierung, es sei denn, es sprechen klinische Gründe dagegen. [41]

Zusammenfassend sollte bei jedem Patienten eine Risikoabwägung zwischen den Nebenwirkungen einer Chemotherapie und der ausbleibenden Immunrekonstitution getroffen werden.

Mögliche Ansätze wie die Dosisreduktion der Chemotherapie oder die Entwicklung neuer weniger toxischer Ansätze zur Konditionierung können in Zukunft wichtig werden. [17,32]

4.7 Beendigung der Immunglobulinsubstitution aufgrund der vorliegenden Ergebnisse

Der Patient UPN 346 nahm nach Analyse der Chimärismus-Daten und der B-Zell Phänotypisierung wie bereits an einigen Stellen dieser Arbeit erwähnt eine Sonderstellung ein.

So zeigte der Patient in der frühen Chimärismus-Analyse einen Spenderanteil von 49% auf B-Zell-Ebene und einen Spenderanteil von 54% auf Monozyten-Ebene. Der Anteil der Spenderzellen zeigte sich auch in Nachuntersuchungen knapp 19 Jahre nach HSZT konstant (30% Spenderanteil B-Zellen, 11% Spenderanteil Monozyten).

In der B-Zell Phänotypisierung zeigte der Patient einen Anteil von 11% class-switched memory B-cells innerhalb der CD27 positiven Zellen und lag damit als einziger Patient der Kohorte IgDEP über den berechneten Cut off von 4,65%.

Auch eine weitere Analyse knapp 20 Jahre nach HSZT bestätigte den weiterhin relevanten Anteil an class-switched memory B-cells (data not shown).

Aufgrund der Diskrepanz der erhobenen Werte entschieden wir uns, mit dem Patienten und der nachsorgenden Klinik Kontakt aufzunehmen.

Die Immunglobulinsubstitution, die der Patient mehrere Jahrzehnte vermeintlich benötigt hatte, wurde beendet und nachdem spezifische Impfantikörper nach der Grundimmunisierung nachgewiesen werden konnten, konnte die Immunglobulinsubstitution schließlich beendet werden.

Der Patient wurde im Rahmen dieser Untersuchung weiterhin in der Kohorte IgDEP geführt, da die Beendigung der Immunglobulinsubstitution während der Auswertung der Daten initiiert wurde.

Bei diesem Patienten konnten wir die klinische Relevanz der erhobenen Daten untermauern und zeigen, dass die Ergebnisse dieser Arbeit auch prospektiv anzuwenden sind.

4.8 Praktikabilität der Untersuchungsmethoden im Klinikalltag

Wir konnten zeigen, dass man mit Hilfe einer einfach durchzuführenden Methode wie der Durchflusszytometrie in einem frühen Zeitraum nach HSZT einen spezifischen und sensitiven Parameter für die zu erwartende B-Zell Funktion finden kann.

Die Durchflusszytometrie ist eine Methode, die vielen Laboren zur Verfügung steht und im klinischen Alltag bereits etabliert ist. Die Untersuchung kann mit überschaubarem Aufwand im Rahmen von routinemäßigen Untersuchungen stattfinden.

Zwar kann man durch HLA-Analysen sehr sicher herausfinden, wie der linienspezifische Spenderchimärismus der jeweiligen Zellreihen ist, jedoch sind diese aufwändigen Untersuchungen nur in wenigen Laboren etabliert und an die Bedingung geknüpft, dass die Patienten nicht HLA-identisch transplantiert wurden und passende HLA-Antikörper für die Methode vorliegen.

Im Rahmen der B-Zell Phänotypisierung in der Durchflusszytometrie können wir zwar Spenderzellen nicht von autologen Zellen trennen, jedoch können wir aufgrund der hier bereits mehrfach erwähnten Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe (Jacobsen et al, Publikation in Vorbereitung) davon ausgehen, dass die Population der class-switched memory B-cells ausschließlich aus Spenderzellen bestehen muss.

Des Weiteren spricht für die von uns dargestellten Ergebnisse und Methodenwahl, dass die Durchflusszytometrie auch bei sehr kleinen Zellpopulationen valide Untersuchungsergebnisse liefern kann. Bisherige Methoden der linienspezifischen Chimärismus-Analyse wie beispielsweise die STR-Analyse hingegen sind bei sehr kleinen Zellpopulationen vermutlich nicht mehr sensitiv genug. [70]

4.9 Limitationen und mögliche Weiterentwicklungen

Abschließend sollen Limitationen dieser Arbeit und mögliche Ansatzpunkte für weitere Fragestellungen diskutiert werden.

Initial soll die Einteilung der Patienten in die Kohorten IgDEP und IgIND besprochen werden. Die Patienten der Kohorte IgIND können anhand des klinischen Eindrucks (keine Infektneigung) und laborchemischer Parameter (Nachweis von spezifischen Impfantikörpern) gut in die entsprechende Kohorte eingeteilt werden. Bei der Zuordnung in die Kohorte IgDEP stehen jedoch keine eindeutigen Positivbefunde zur Verfügung.

Die Einteilung der Patienten erfolgte auf der Grundlage von Immunglobulinspiegeln im Serum (Schwächen der Immunglobulinspiegel wurden in Kapitel 4.2. besprochen), Chimärismus-Analysen und non-T-Zell Engraftment (siehe Kapitel.4.3.).

In den entsprechenden Kapiteln wurde bereits gezeigt, dass sich die Parameter nicht zur eindeutigen Entscheidung über die Notwendigkeit von Immunglobulinen eignen.

Theoretisch könnten sich in der Kohorte IgIND Patienten verbergen, die keine Immunglobulinsubstitution benötigen, jedoch auf Grundlage der bisher verfügbaren Daten in diese eingeordnet wurden (siehe Diskussion zu Patient UPN 346 in Kapitel 4.7).

Mit den neu gewonnen Informationen aus der B-Zell Phänotypisierung kann nun ein weiterer Faktor mit in die Entscheidung fließen, ob ein Patient eine Immunglobulinsubstitution benötigt oder nicht und führte bei Patient UPN346 bereits zu deren Beendigung.

Im Rahmen der Literaturrecherche fiel auf, dass die Population der Marginalzonen-like B-cells eine noch weitgehend unerforschte Zellpopulation ist. In Kapitel 4.4. wurde bereits erwähnt, dass die autologen B-Zellen einen Entwicklungsarrest im Stadium der MZ like B-cells erleben. Die hier beschriebene Patientenkohorte könnte in einer weiteren Untersuchung wichtige Hinweise auf den Einfluss von T-Zell Hilfe oder Interleukin 21 im Rahmen der B-Zell Differenzierung liefern. Hierbei könnten autologe (und damit weiterhin *IL2RG* oder *JAK3* defiziente B-Zellen) vor HSZT mit autologen nach HSZT sowie Spender B-Zellen bei Patienten mit gemischtem B-Zell Chimärismus verglichen werden.

5 Zusammenfassung

Defekte in den Genen *JAK3* und *IL2RG* resultieren in einem schweren kombinierten Immundefekt (SCID) mit fehlenden T-Zellen und vorhandenen, jedoch dysfunktionalen B-Zellen (immunologischer Phänotyp T⁻ B⁺-SCID).

Die einzige kurative Therapieoption ist nach aktuellem Stand der Wissenschaft eine hämatopoetische Stammzelltransplantation (HSZT). Mögliche gentherapeutische Therapieansätze befinden sich derzeit in der Entwicklung.

Ziel dieser Arbeit war es, einen frühen prädiktiven Marker für die Rekonstitution und Funktion von B-Lymphozyten nach HSZT zu finden, um bereits in den ersten 3-8 Monaten nach Transplantation zu entscheiden, ob eine langfristige Immunglobulinsubstitution notwendig ist. Zudem wurden bisher erhobene Entscheidungsparameter wie Spenderchimärismus und Immunglobulinspiegel bezüglich ihrer Belastbarkeit überprüft.

Bei Patienten mit vorhandenen kryokonservierten Proben zwischen Tag 97 und Tag 239 nach HSZT wurde als möglicherweise zusätzlich hilfreicher Parameter die B-Zell Phänotypisierung experimentell untersucht.

Als Ergebnis dieser Untersuchungen konnte ein Anteil von mehr als 4,65% IgM negativer und somit klassengewechserter Gedächtniszellen (class-switched memory B-cells) an der Gesamtpopulation der CD27 positiven B-Zellen als Parameter identifiziert werden, der auf eine Rekonstitution der spezifischen humoralen Immunfunktion hinweist.

Neben der Aussagekraft der Ergebnisse spricht die Praktikabilität und die Verfügbarkeit der Methode für die Einbindung der Analyse die Transplantationsnachsorge der Patienten mit diesen SCID-Entitäten.

Diese retrospektiv erhobenen Daten sollten prospektiv unter Berücksichtigung einer größeren Fallzahl validiert werden.

Die Erkenntnisse aus der B-Zell Phänotypisierung könnten in Zukunft nicht nur in der Nachsorge von Patienten nach HSZT weiterhelfen. Auch für Patienten nach Gentherapie, mit anderen B-zellulären Funktionsdefekten oder nach therapeutischer B-Zell Depletion könnte der Parameter wichtige Hinweise auf die B-Zell-Funktion bieten.

6 Literaturverzeichnis

1. Aleman K, Noordzij J G, de Groot R, van Dongen J J, Hartwig N G: Reviewing Omenn syndrome. *European journal of pediatrics*, 160: 718-725 (2001)
2. Alizadeh M, Bernard M, Danic B, Dauriac C, Birebent B, Lapart C, Lamy T, Le Prisé P, Beauplet A, Bories D, Semana G, Quelvennec E: Quantitative assessment of hematopoietic chimerism after bone marrow transplantation by real-time quantitative polymerase chain reaction. *Blood*, 99: 4618-4625 (2002)
3. Bader P, Niethammer D, Willasch A, Kreyenberg H, Klingebiel T: How and when should we monitor chimerism after allogeneic stem cell transplantation? *Bone marrow transplantation*, 35: 107-119 (2005)
4. Bonilla F A, Oettgen H C: Adaptive immunity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 125: S33-S40 (2010)
5. Buckley R H: The multiple causes of human SCID. *The Journal of clinical investigation*, 114: 1409-1411 (2004)
6. Buckley R H: B-cell function in severe combined immunodeficiency after stem cell or gene therapy: a review. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 125: 790-797 (2010)
7. Buckley R H, Schiff R I, Schiff S E, Markert M L, Williams L W, Harville T O, Roberts J L, Puck J M: Human severe combined immunodeficiency: Genetic, phenotypic, and functional diversity in one hundred eight infants. *The Journal of pediatrics*, 130: 378-387 (1997)
8. Buckley R H, Schiff S E, Schiff R I, Markert M L, Williams L W, Roberts J L, Myers L A, Ward F E: Hematopoietic Stem-Cell Transplantation for the Treatment of Severe Combined Immunodeficiency. *N Engl J Med*, 340: 508-516 (1999)
9. Buckley R H, Win C M, Moser B K, Parrott R E, Sajaroff E, Sarzotti-Kelsoe M: Post-transplantation B cell function in different molecular types of SCID. *Journal of clinical immunology*, 33: 96-110 (2013)
10. Cattaneo F, Recher M, Masneri S, Baxi S N, Fiorini C, Antonelli F, Wysocki C A, Calderon J G, Eibel H, Smith A R, Bonilla F A, Tsitsikov E, Giliani S, Notarangelo L D, Pai S: Hypomorphic Janus kinase 3 mutations result in a spectrum of immune defects, including partial maternal T-cell engraftment. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 131: 1136-1145 (2013)
11. Cerutti A, Cols M, Puga I: Marginal zone B cells: virtues of innate-like antibody-producing lymphocytes. *Nature reviews. Immunology*, 13: 118-132 (2013)

12. Chaplin D D: Overview of the immune response. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 125: S3-S23 (2010)
13. Chinn I K, Shearer W T: Severe Combined Immunodeficiency Disorders. *Immunology and Allergy Clinics of North America*, 35: 671-694 (2015)
14. Clemente I, Goncalo A, Faria C, Dias M, Barbosa I, Mendes C: Relevance of Chimerism Analysis After Allogeneic Stem Cell Transplantation. *Transplantation proceedings*, 49: 890-892 (2017)
15. DiSanto J P, Rieux-Laucat F, Dautry-Varsat A, Fischer A, de Saint Basile G: Defective human interleukin 2 receptor gamma chain in an atypical X chromosome-linked severe combined immunodeficiency with peripheral T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91: 9466-9470 (1994)
16. Dvorak C C, Hassan A, Slatter M A, Hönig M, Lankester A C, Buckley R H, Pulsipher M A, Davis J H, Güngör T, Gabriel M, Bleesing J H, Bunin N, Sedlacek P, Connelly J A, Crawford D F, Notarangelo L D, Pai S, Hassid J, Veys P, Gennery A R, Cowan M J: Comparison of outcomes of hematopoietic stem cell transplantation without chemotherapy conditioning by using matched sibling and unrelated donors for treatment of severe combined immunodeficiency. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 134: 935-943.e15 (2014)
17. Dvorak C C, Long-Boyle J, Dara J, Melton A, Shimano K A, Huang J N, Puck J M, Dorsey M J, Facchino J, Chang C K, Cowan M J: Low Exposure Busulfan Conditioning to Achieve Sufficient Multilineage Chimerism in Patients with Severe Combined Immunodeficiency. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, 25: 1355-1362 (2019)
18. El-Helou S, Biegner A, Bode S, Ehl S R, Heeg M, Maccari M E, Ritterbusch H, Speckmann C, Rusch S, Scheible R, Warnatz K, Atscheckzei F, Beider R, Ernst D, Gerschmann S, Jablonka A, Mielke G, Schmidt R E, Schürmann G, Sogkas G, Baumann U H, Klemann C, Viemann D, von Bernuth H, Krüger R, Hanitsch L G, Scheibenbogen C M, Wittke K, Albert M H, Eichinger A, Hauck F, Klein C, Rack-Hoch A, Sollinger F M, Avila A, Borte M, Borte S, Fasshauer M, Hauenherm A, Kellner N, Müller A H, Ülzen A, Bader P, Bakhtiar S, Lee J, Heß U, Schubert R, Wölke S, Zielen S, Ghosh S, Laws H, Neubert J, Oommen P T, Hönig M, Schulz A, Steinmann S, Schwarz K, Dückers G, Lamers B, Langemeyer V, Niehues T, Shai S, Graf D, Möglich C, Schmalzing M T, Schwaneck E C, Tony H, Dirks J, Haase G, Liese J G, Morbach H, Foell D, Hellige A, Wittkowski H, Masjosthusmann K, Mohr M, Geberzahn L, Hedrich C M, Müller C, Rösen-Wolff A, Roesler J, Zimmermann A, Behrends U, Rieber N, Schauer U, Handgretinger R, Holzer U, Henes J ö, Kanz L, Boesecke C, Rockstroh J K, Schwarze-Zander C, Wasmuth J, Dilloo D, Hülsmann B, Schönberger S, Schreiber S, Zeuner R, Ankermann T, Bismarck P v, Huppertz H, Kaiser-Labusch P, Greil J, Jakoby D, Kulozik A E, Metzler M, Naumann-Bartsch N, Sobik B, Graf N, Heine S, Kobbe R, Lehmborg K, Müller I, Herrmann F, Horneff G, Klein A, Peitz J, Schmidt N, Bielack S, Groß-Wieltsch U, Classen C F, Klasen J, Deutz P, Kamitz D, Lassay L, Tenbrock K, Wagner N, Bernbeck B, Brummel B, Lara-Villacanas E, Münstermann E, Schneider D T, Tietsch N, Westkemper M, Weiß M, Kramm C, Kühnle I, Kullmann S, Girschick H, Specker C, Vinnemeier-Laubenthal E, Hae-

nicke H, Schulz C, Schweigerer L, Müller T G, Stiefel M, Belohradsky B H, Soetedjo V, Kinde G, Grimbacher B: The German National Registry of Primary Immunodeficiencies (2012–2017). *Frontiers in Immunology*, 10: 1272 (2019)

19. Farmand S, Baumann U, von Bernuth H, Borte M, Foerster-Waldl E, Franke K, Habermehl P, Kapaun P, Klock G, Liese J, Marks R, Muller R, Nebe T, Niehues T, Schuster V, Warnatz K, Witte T, Ehl S, Schulze I, Association of the Scientific Medical Societies in Germany (AWMF): Interdisciplinary AWMF guideline for the diagnostics of primary immunodeficiency. *Klinische Padiatrie*, 223: 378-385 (2011)

20. Felgentreff K, Perez-Becker R, Speckmann C, Schwarz K, Kalwak K, Markelj G, Avcin T, Qasim W, Davies E G, Niehues T, Ehl S: Clinical and immunological manifestations of patients with atypical severe combined immunodeficiency. *Clinical Immunology*, 141: 73-82 (2011)

21. Fischer A: Severe combined immunodeficiencies (SCID). *Clinical and experimental immunology*, 122: 143-149 (2000)

22. Fischer A, Hacein-Bey-Abina S: Gene therapy for severe combined immunodeficiencies and beyond. *The Journal of experimental medicine*, 217: (2019)

23. Fischer A, Le Deist F, Hacein-Bey-Abina S, André-Schmutz I, De Saint Basile G, De Villartay J, Cavazzana-Calvo M: Severe combined immunodeficiency. A model disease for molecular immunology and therapy. *Immunological reviews*, 203: 98-109 (2005)

24. Flinn A M, Gennery A R: Adenosine deaminase deficiency: a review. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 13: 65 (2018)

25. Fry T J, Mackall C L: Immune reconstitution following hematopoietic progenitor cell transplantation: challenges for the future. *Bone marrow transplantation*, 35: S53-S57 (2005)

26. Germain R N: T-cell development and the CD4–CD8 lineage decision. *Nature Reviews Immunology*, 2: 309-322 (2002)

27. Haddad E, Leroy S, Buckley R H: B-cell reconstitution for SCID: Should a conditioning regimen be used in SCID treatment? *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 131: 994-1000 (2013)

28. Haddad E, Logan B R, Griffith L M, Buckley R H, Parrott R E, Prockop S E, Small T N, Chaisson J, Dvorak C C, Murnane M, Kapoor N, Abdel-Azim H, Hanson I C, Martinez C, Blesing J J H, Chandra S, Smith A R, Cavanaugh M E, Jyonouchi S, Sullivan K E, Burroughs L, Skoda-Smith S, Haight A E, Tumlin A G, Quigg T C, Taylor C, Dávila Saldaña B J, Keller M D, Seroogy C M, Desantes K B, Petrovic A, Leiding J W, Shyr D C, Decaluwe H, Teira P, Gillio A P, Knutsen A P, Moore T B, Kletzel M, Craddock J A, Aquino V, Davis J H, Yu L C, Cuvelier G D E, Bednarski J J, Goldman F D, Kang E M, Shereck E, Porteus M H, Connelly J A, Fleisher T A, Malech H L, Shearer W T, Szabolcs P, Thakar M S, Vander Lugt M T, Heimall J, Yin Z, Pulsipher M A, Pai S, Kohn D B, Puck J M, Cowan M J, O'Reilly R J, Notarangelo L D:

SCID genotype and 6-month posttransplant CD4 count predict survival and immune recovery. *Blood*, 132: 1737-1749 (2018)

29. Harskamp J C, van Egmond E H M, Vos H L, Halkes S J M, Willemze R, Falkenburg J H F, Marijt E W A: Myeloid Chimerism Reflects Engraftment of Donor Hematopoiesis, Whereas T Cell Chimerism Reflects Survival and Expansion of Donor and Recipient Residual Mature T Cells Early After T Cell Depleted Allogeneic Stem Cell Transplantation. *Blood*, 114: 4475-4475 (2009)

30. Hatzimichael E, Tuthill M: Hematopoietic stem cell transplantation. *Stem cells and cloning : advances and applications*, 3: 105-117 (2010)

31. Heimall J, Logan B R, Cowan M J, Notarangelo L D, Griffith L M, Puck J M, Kohn D B, Pulsipher M A, Parikh S, Martinez C, Kapoor N, O'Reilly R, Boyer M, Pai S, Goldman F, Burroughs L, Chandra S, Kletzel M, Thakar M, Connelly J, Cuvelier G, Davila Saldana B J, Shereck E, Knutsen A, Sullivan K E, DeSantes K, Gillio A, Haddad E, Petrovic A, Quigg T, Smith A R, Stenger E, Yin Z, Shearer W T, Fleisher T, Buckley R H, Dvorak C C: Immune reconstitution and survival of 100 SCID patients post-hematopoietic cell transplant: a PIDTC natural history study. *Blood*, 130: 2718-2727 (2017)

32. Heimall J, Puck J, Buckley R, Fleisher T A, Gennery A R, Neven B, Slatter M, Haddad E, Notarangelo L D, Baker K S, Dietz A C, Duncan C, Pulsipher M A, Cowan M J: Current Knowledge and Priorities for Future Research in Late Effects after Hematopoietic Stem Cell Transplantation (HCT) for Severe Combined Immunodeficiency Patients: A Consensus Statement from the Second Pediatric Blood and Marrow Transplant Consortium International Conference on Late Effects after Pediatric HCT. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, 23: 379-387 (2017)

33. Holler E, Greinix H, Zeiser R: Acute Graft-Versus-Host Disease. In: Carreras E, Dufour C, Mohty M and Kröger N (Hrsg) *The EBMT Handbook: Hematopoietic Stem Cell Transplantation and Cellular Therapies*, Springer International Publishing, Cham, S. 323-330 (2019)

34. Hönig M, Schulz A, Friedrich W: Hematopoietic stem cell transplantation for severe combined immunodeficiency. *Klinische Padiatrie*, 223: 320-325 (2011)

35. Hou Y, Gratz H, Ureña Bailén G, Gratz P, Schilbach-Stückle K, Renno T, Güngör D, Mader D, Malenke E, Antony J, Handgretinger R, Mezger M: Somatic Reversion of a Novel IL2RG Mutation Resulting in Atypical X-Linked Combined Immunodeficiency. *Genes*, 13: 35 (2021)

36. Hsu A P, Pittaluga S, Martinez B, Rump A P, Raffeld M, Uzel G, Puck J M, Freeman A F, Holland S M: IL2RG reversion event in a common lymphoid progenitor leads to delayed diagnosis and milder phenotype. *Journal of clinical immunology*, 35: 449-453 (2015)

37. Jagannathan-Bogdan M, Zon L I: Hematopoiesis. *Development (Cambridge, England)*, 140: 2463-2467 (2013)

38. Jolles S, Sewell W A C, Misbah S A: Clinical uses of intravenous immunoglobulin. *Clinical and experimental immunology*, 142: 1-11 (2005)
39. Kovanen P E, Leonard W J: Cytokines and immunodeficiency diseases: critical roles of the γ c-dependent cytokines interleukins 2, 4, 7, 9, 15, and 21, and their signaling pathways. *Immunological reviews*, 202: 67-83 (2004)
40. Kuijpers T W, van Leeuwen E, M.M., Barendregt B H, Klarenbeek P, aan de Kerk D, J., Baars P A, Jansen M H, de Vries N, van Lier R, A.W., van der Burg M: A reversion of an IL2RG mutation in combined immunodeficiency providing competitive advantage to the majority of CD8⁺ T cells. *Haematologica*, 98: 1030-1038 (2013)
41. Lankester A C, Albert M H, Booth C, Gennery A R, Güngör T, Höning M, Morris E C, Moshous D, Neven B, Schulz A, Slatter M, Veys P, Inborn Errors Working Party of the European Society for Blood and Marrow Transplantation and the European Society for Immune Deficiencies, and European Reference Network on Rare Primary Immunodeficiency Autoinflammatory Autoimmune diseases (RITA): EBMT/ESID inborn errors working party guidelines for hematopoietic stem cell transplantation for inborn errors of immunity. *Bone marrow transplantation*, 56: 2052-2062 (2021)
42. Laws H, Baumann U, Bogdan C, Burchard G, Christopeit M, Hecht J, Heininger U, Hilgendorf I, Kern W, Kling K, Kobbe G, Külper W, Lehrnbecher T, Meisel R, Simon A, Ullmann A, de Wit M, Zepp F: Impfen bei Immundefizienz. *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz*, 63: 588-644 (2020)
43. Lee S J, Vogelsang G, Flowers M E D: Chronic graft-versus-host disease. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, 9: 215-233 (2003)
44. Ljungman P, Cordonnier C, Einsele H, Englund J, Machado C M, Storek J, Small T, Center for International Blood and Marrow Transplant Research, National Marrow Donor Program, European Blood and Marrow Transplant Group, American Society of Blood and Marrow Transplantation, Canadian Blood and Marrow Transplant Group, Infectious Disease Society of America, Society for Healthcare Epidemiology of America, Association of Medical Microbiology and Infectious Diseases Canada, Centers for Disease Control and Prevention: Vaccination of hematopoietic cell transplant recipients. *Bone marrow transplantation*, 44: 521-526 (2009)
45. Mamcarz E, Zhou S, Lockey T, Abdelsamed H, Cross S J, Kang G, Ma Z, Condori J, Dowdy J, Triplett B, Li C, Maron G, Aldave Becerra J C, Church J A, Dokmeci E, Love J T, da Matta Ain, Ana C., van der Watt H, Tang X, Janssen W, Ryu B Y, De Ravin S S, Weiss M J, Youngblood B, Long-Boyle J, Gottschalk S, Meagher M M, Malech H L, Puck J M, Cowan M J, Sorrentino B P: Lentiviral Gene Therapy Combined with Low-Dose Busulfan in Infants with SCID-X1. *N Engl J Med*, 380: 1525-1534 (2019)
46. Mebius R E, Kraal G: Structure and function of the spleen. *Nature Reviews Immunology*, 5: 606-616 (2005)

47. Miggelbrink A M, Logan B R, Buckley R H, Parrott R E, Dvorak C C, Kapoor N, Abdel-Azim H, Prockop S E, Shyr D, Decaluwe H, Hanson I C, Gillio A, Dávila Saldaña B J, Eibel H, Hopkins G, Walter J E, Whangbo J S, Kohn D B, Puck J M, Cowan M J, Griffith L M, Haddad E, O'Reilly R J, Notarangelo L D, Pai S: B-cell differentiation and IL-21 response in IL2RG/JAK3 SCID patients after hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*, 131: 2967-2977 (2018)
48. Mikkola H K A, Orkin S H: The journey of developing hematopoietic stem cells. *Development*, 133: 3733 (2006)
49. Miyazawa H, Wada T: Reversion Mosaicism in Primary Immunodeficiency Diseases. *Frontiers in immunology*, 12: 783022-783022 (2021)
50. Murphy K M, Weaver C: Entwicklung der B-Lymphozyten. *Janeway Immunologie*, 9. Auflage, Springer Spektrum, S. 379-401 (2018)
51. Murphy K M: Chimerism Analysis Following Hematopoietic Stem Cell Transplantation. In: Czader M (Hrsg) *Hematological Malignancies*, Humana Press, Totowa, NJ, S. 137-149 (2013)
52. Niehues T, Bogdan C, Hecht J, Mertens T, Wiese-Posselt M, Zepp F: Impfen bei Immundefizienz. *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz*, 60: 674-684 (2017)
53. Ogonek J, Kralj Juric M, Ghimire S, Varanasi P R, Holler E, Greinix H, Weissinger E: Immune Reconstitution after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Frontiers in immunology*, 7: 507-507 (2016)
54. Oliver D H, Thompson R E, Griffin C A, Eshleman J R: Use of Single Nucleotide Polymorphisms (SNP) and Real-Time Polymerase Chain Reaction for Bone Marrow Engraftment Analysis. *The Journal of Molecular Diagnostics*, 2: 202-208 (2000)
55. Pai S, Logan B R, Griffith L M, Buckley R H, Parrott R E, Dvorak C C, Kapoor N, Hanson I C, Filipovich A H, Jyonouchi S, Sullivan K E, Small T N, Burroughs L, Skoda-Smith S, Haight A E, Grizzle A, Pulsipher M A, Chan K W, Fuleihan R L, Haddad E, Loechelt B, Aquino V M, Gillio A, Davis J, Knutsen A, Smith A R, Moore T B, Schroeder M L, Goldman F D, Connelly J A, Porteus M H, Xiang Q, Shearer W T, Fleisher T A, Kohn D B, Puck J M, Notarangelo L D, Cowan M J, O'Reilly R J: Transplantation Outcomes for Severe Combined Immunodeficiency, 2000–2009. *N Engl J Med*, 371: 434-446 (2014)
56. Patel S R, Ortín M, Cohen B J, Borrow R, Irving D, Sheldon J, Heath P T: Revaccination with Measles, Tetanus, Poliovirus, Haemophilus influenzae Type B, Meningococcus C, and Pneumococcus Vaccines in Children after Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Clinical Infectious Diseases*, 44: 625-634 (2007)
57. Pesu M, Candotti F, Husa M, Hofmann S R, Notarangelo L D, O'Shea J J: Jak3, severe combined immunodeficiency, and a new class of immunosuppressive drugs. *Immunological reviews*, 203: 127-142 (2005)

58. Pillai S, Cariappa A: The follicular versus marginal zone B lymphocyte cell fate decision. *Nature Reviews Immunology*, 9: 767-777 (2009)
59. Recher M, Berglund L J, Avery D T, Cowan M J, Gennery A R, Smart J, Peake J, Wong M, Pai S, Baxi S, Walter J E, Palendira U, Tangye G A, Rice M, Brothers S, Al-Herz W, Oettingen H, Eibel H, Puck J M, Cattaneo F, Ziegler J B, Giliani S, Tangye S G, Notarangelo L D: IL-21 is the primary common γ chain-binding cytokine required for human B-cell differentiation in vivo. *Blood*, 118: 6824-6835 (2011)
60. Scarselli A, Di Cesare S, Capponi C, Cascioli S, Romiti M L, Di Matteo G, Simonetti A, Palma P, Finocchi A, Lucarelli B, Pinto R M, Rana I, Palumbo G, Caniglia M, Rossi P, Carsetti R, Cancrini C, Aiuti A: Longitudinal Evaluation of Immune Reconstitution and B-cell Function After Hematopoietic Cell Transplantation for Primary Immunodeficiency. *Journal of clinical immunology*, 35: 373-383 (2015)
61. Schroeder H W, Cavacini L: Structure and function of immunoglobulins. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 125: S41-S52 (2010)
62. Schütz C, Hauck F, Albert M H, Hönig M, Borte S, Wahn V, Schulz A, Nennstiel U, Speckmann C: Neugeborenenenscreening auf schwere kombinierte Immundefekte. *Monatsschrift Kinderheilkunde*, 167: 1027-1032 (2019)
63. Shearer W T, Dunn E, Notarangelo L D, Dvorak C C, Puck J M, Logan B R, Griffith L M, Kohn D B, O'Reilly R J, Fleisher T A, Pai S, Martinez C A, Buckley R H, Cowan M J: 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: 1092-1098 (2014)
64. Stephan J L, Vlekova V, Deist F L, Blanche S, Donadieu J, Saint-Basile G D, Durandy A, Griscelli C, Fischer A: Severe combined immunodeficiency: A retrospective single-center study of clinical presentation and outcome in 117 patients. *The Journal of pediatrics*, 123: 564-572 (1993)
65. Styczynski J, Gil L, on behalf of the EBMT Paediatric Diseases, Working Party: Prevention of infectious complications in pediatric HSCT. *Bone marrow transplantation*, 42: S77-S81 (2008)
66. Tangye S G, Al-Herz W, Bousfiha A, Chatila T, Cunningham-Rundles C, Etzioni A, Franco J L, Holland S M, Klein C, Morio T, Ochs H D, Oksenhendler E, Picard C, Puck J, Torgerson T R, Casanova J, Sullivan K E: 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 (2020)
67. Trivedi V B, Dave A P, Dave J M, Patel B C: Human Leukocyte Antigen and Its Role in Transplantation Biology. *Transplantation proceedings*, 39: 688-693 (2007)
68. Turvey S E, Broide D H: Innate immunity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 125: S24-S32 (2010)

69. Valcárcel D, Sureda A: Graft Failure. In: Carreras E, Dufour C, Mohty M and Kröger N (Hrsg) *The EBMT Handbook: Hematopoietic Stem Cell Transplantation and Cellular Therapies*, Springer International Publishing, Cham, S. 307-313 (2019)
70. Vicente D C, Laranjeira A B A, Miranda E C M, Yunes J A, de Souza, C.A.: Chimerism interpretation with a highly sensitive quantitative PCR method: 6 months median latency before chimerism drop below 0.1%. *Bone marrow transplantation*, 51: 874-875 (2016)
71. Villa A, Notarangelo L D, Roifman C M: Omenn syndrome: Inflammation in leaky severe combined immunodeficiency. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 122: 1082-1086 (2008)
72. Warnatz K, Schlesier M: Flowcytometric phenotyping of common variable immunodeficiency. *Cytometry Part B: Clinical Cytometry*, 74B: 261-271 (2008)
73. White H, Thrasher A, Veys P, Kinnon C, Gaspar H B: Intrinsic defects of B cell function in X-linked severe combined immunodeficiency. *European journal of immunology*, 30: 732-737 (2000)
74. Wolff D, Lawitschka A: Chronic Graft-Versus-Host Disease. In: Carreras E, Dufour C, Mohty M and Kröger N (Hrsg) *The EBMT Handbook: Hematopoietic Stem Cell Transplantation and Cellular Therapies*, Springer International Publishing, Cham, S. 331-345 (2019)
75. Woof J M, Mestecky J: Mucosal immunoglobulins. *Immunological reviews*, 206: 64-82 (2005)
76. Yel L: Selective IgA deficiency. *Journal of clinical immunology*, 30: 10-16 (2010)

7 Anhang

Tabelle 12 Darstellung der genetischen Veränderungen (Klasse 1 nach Einteilung der International Union of Immunological Societies) und die daraus resultierenden Erkrankungen. Aus Gründen der Wissenschaftlichkeit sind die Erkrankungen in der englischen Sprache dargestellt. Abkürzungen: CD: cluster of differentiation; DNA: desoxyribonuclein acid; SCID: severe combined immunodeficiency. [66]

T-B+ SCID	
Betroffenes Gen	Erkrankung
<i>IL2RG</i>	common gamma chain SCID
<i>JAK3</i>	Januskinase 3 deficiency
<i>IL7R</i>	Interleukin 7 Rezeptor Untereinheit alpha deficiency
<i>PTPRC</i>	CD45 deficiency
<i>CD3D</i>	CD3δ deficiency
<i>CD3E</i>	CD3ε deficiency
<i>CD3Z</i>	CD3ζ deficiency
<i>CORO1A</i>	Coronin-1A deficiency
T-B- SCID	
Betroffenes Gen	Erkrankung
<i>RAG 1/2</i>	Recombination activating gene deficiency
<i>DCLRE1C</i>	DNA cross-link repair 1C (Artemis) deficiency
<i>PRKDC</i>	DNA dependent protein kinase catalytic subunit deficiency
<i>NHEJ1</i>	Cernunnos/XLF deficiency
<i>LIG4</i>	DNA ligase IV deficiency
<i>ADA</i>	Adenosine deaminase deficiency
<i>AK2</i>	Adenylat kinase 2 defect
<i>RAC2</i>	Activated RAC2 defect
Kombinierter Immundefekt, weniger ausgeprägt als SCID	
Betroffenes Gen	Erkrankung
<i>CD40LG</i>	CD40 ligand (CD154) deficiency
<i>CD40</i>	CD40 deficiency
<i>ICOS</i>	Inducible co-stimulator deficiency
<i>ICOSLG</i>	Inducible co-stimulator ligand deficiency
<i>CD3G</i>	CD3γ deficiency
<i>CD8A</i>	CD8 deficiency
<i>ZAP70</i>	Zeta-chain-associated protein kinase 70 deficiency (ZAP70 Loss of function)
<i>ZAP70</i>	Zeta-chain-associated protein kinase 70 combined hypomorphic and activating mutations
<i>TAP1</i>	Major histocompatibility complex class I deficiency
<i>TAP2</i>	
<i>TAPBP</i>	
<i>B2M</i>	

<i>CIITA</i>	Major histocompatibility class II deficiency group A, B, C, D
<i>RFXANK</i>	
<i>RFX5</i>	
<i>RFXAP</i>	
<i>IKZF1</i>	IKAROS deficiency
<i>DOCK8</i>	Dedicator of cytokinesis 8 deficiency
<i>DOCK2</i>	Dedicator of cytokinesis 2 deficiency
<i>POLD1/2</i>	Polymerase delta 1/2 deficiency
<i>RHOH</i>	Ras homolog gene family deficiency
<i>STK4</i>	Serin/threonine protein kinase 4 deficiency
<i>TRAC</i>	T-cell receptor alpha deficiency
<i>LCK</i>	Lymphocyte-specific protein tyrosin kinase deficiency
<i>ITK</i>	Interleukin-2-inducible t-cell kinase deficiency
<i>MALT1</i>	Mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma translocation protein 1 deficiency
<i>CARD11</i>	Caspase recruitment domain family member 11 deficiency
<i>BCL10</i>	B-cell lymphoma L10 deficiency
<i>IL21</i>	Interleukin-21 deficiency
<i>IL21R</i>	Interleukin-21 Receptor deficiency
<i>TNFRSF4</i>	Tumor necrosis factor receptor superfamily member 4 deficiency
<i>IKBKB</i>	Inhibitor of nuclear factor kappa-b kinase subunit beta deficiency
<i>MAP3K14</i>	NF-kappa-b-inducing kinase (NIK) deficiency
<i>RELB</i>	RELB proto-oncogene NF-kappa-b subunit deficiency
<i>RELA</i>	RELA proto-oncogene NF-kappa-b subunit deficiency
<i>MSN</i>	Moesin deficiency
<i>TFRC</i>	Transferrin receptor deficiency
<i>REL</i>	Proto-oncogene c-Rel deficiency
<i>FCHO1</i>	F-BAR domain only protein 1 deficiency

8 Danksagung

Die Danksagung wurde aus Gründen des Datenschutzes entfernt.

9 Lebenslauf

Der Lebenslauf wurde aus Gründen des Datenschutzes entfernt.

Der Lebenslauf wurde aus Gründen des Datenschutzes entfernt.