



## Genen panel Severe Combined Immunodeficiency (SCID)

### 1. Introductie

Vanaf 1 januari 2021 is de ernstige afweerstoornis severe combined immunodeficiency (SCID) officieel toegevoegd aan het Nederlandse hielprikscreeningsprogramma. Verschillende gendefecten kunnen ter grondslag liggen aan SCID (1). SCID wordt primair gekenmerkt door de afwezigheid van functionele T-lymfocyten. Zonder behandeling overlijden de meeste SCID-patiënten voor het eerste levensjaar aan ernstige recidiverende infecties. Indien patiënten echter vroeg behandeld met een hematopoëtische stamceltransplantatie, kan de ziekte worden genezen (2). De tijd die gewonnen kan worden door neonatale screening is van groot belang voor deze patiënten, omdat zij een curatieve behandeling kunnen krijgen in de asymptomatische fase waarin zij nog geen ernstige infecties hebben opgedaan. Er kan getest worden op SCID door de kwantificatie van TRECs ofwel *T-cell receptor excision circles*. TRECs zijn stabiele circulaire DNA fragmenten die als bijproduct gevormd worden tijdens de herschikking van de T-cel receptor (TCR) in voorloper T-cellen in de thymus (3). Indien een pasgeborene zich presenteert met afwezige of lage TREC-waarden zal deze worden doorverwezen naar een kinderarts-immunoloog in een van de academische medische centra voor aanvullende diagnostiek. Een lage TREC-waarde betekent dat een kind *mogelijk* de ziekte SCID heeft. Er zijn namelijk ook andere aandoeningen bekend die gepaard gaan met lage of afwijkende T-cellen en daarmee met lage TRECs bij de geboorte (nevenbevindingen). Sommige van deze nevenbevindingen kunnen niet curatief behandeld worden. Een uniform vervolgsbeleid na een afwijkend SCID-screening resultaat is opgesteld door de landelijke Adviescommissie Neonatale Screening (ANS)-SCID. Naast immunofenotypering om verlaging of afwezigheid van T-cellen vast te stellen is genetische analyse een belangrijk onderdeel van het diagnostisch proces om een (genetische) diagnose te kunnen stellen. Voor deze genetische analyse is een SCID-genenpanel opgesteld in samenwerking met kinderartsen-immunologen, klinisch genetici, immunologen, laboratoriumspecialisten klinische genetica en betrokkenen vanuit het Centrum voor Bevolkingsonderzoek (RIVM). Dit SCID-genen panel kan als leidraad gebruikt worden door alle academische centra in de vervolgsdiagnostiek na een afwijkend SCID-screening resultaat.

### 2. Samenvatting overwegingen

#### Genen die worden opgenomen in het SCID-panel

Er zijn een aantal overwegingen om genen op te nemen in het SCID-genen panel. Allereerst is het van belang dat mutaties in het gen geassocieerd zijn met een immuunstoornis. Om deze reden is de *International Union of Immunological Societies* (IUIS) classificatie geraadpleegd. De IUIS heeft in 2019 een rapport uitgebracht waarin alle gendefecten die een relatie hebben tot immuundeficiënte aandoeningen zijn opgenomen (4). Om specifiek de meest voorkomende SCID-mutaties in Nederland mee te nemen, werd ook het artikel van de Pagter *et al.* uit 2015 geraadpleegd (5). Hierin worden de mutaties van de 43 bekende SCID patiënten van 1998 t/m 2013 in Nederland beschreven. Daarnaast is het van belang dat de mutaties in de genen ook geassocieerd zijn met afwijkende lage TREC-aantallen. De afwijkende screeningsresultaten moeten namelijk verklaard kunnen worden door het gendefect. Belangrijke



informatie werd hierover verschaft door het artikel van Kwan *et al.* uit 2014 waarin de ervaringen van neonatale screening voor SCID uit elf screeningsprogramma's in de Verenigde Staten van 2008 t/m 2013 werden gedeeld (6). Tot slot is een belangrijke overweging dat de geassocieerde immuundeficiënties behandeld kunnen worden met een stamceltransplantatie. Hier speelde de ervaringen van de screeningsprogramma's uit de Verenigde Staten en de expertise van de kinderartsen-immunologen een belangrijke rol. Voor het SCID-genenpanel werden tevens als referentiekader externe SCID-genen panels gebruikt. Daarnaast werden ter referentie de genen benoemd in het Gezondheidsraadrapport "Neonatale screening: nieuwe aanbevelingen" uit 2015 meegenomen (7). Voor een uitgebreide beschrijving van de overwegingen per gen zie hoofdstuk 4: "Beargumentering genen die opgenomen zijn in het SCID panel."

### **Genen die niet worden opgenomen in het SCID-panel**

Er is een aantal overwegingen om genen niet op te nemen in het SCID-panel terwijl ze wel beschreven worden in het Gezondheidsraadrapport, in externe SCID panels of in de IUIS classificatie.

Allereerst is het mogelijk dat mutaties in genen wel tot een immuundeficiëntie-beeld leiden, maar niet gepaard gaan met lage TREC-aantallen. In dat geval zouden de lage aantallen TRECs die gevonden werden tijdens de analyses van de hielprikscreening niet verklaard kunnen worden door het gendefect. Voorbeelden hiervan zijn *CD40*-gen (OMIM 109535) en het *CD40L*-gen (OMIM 300386). Deze genen zijn wel opgenomen in externe SCID panels en worden ze beschreven in de IUIS criteria onder *combined immunodeficiencies*, omdat deze mutaties klinisch resulteren in een gecombineerde afweerstoornis, maar niet gepaard gaan met T-lymfocytopenie of lage TRECs. Het kan ook voorkomen dat een mutatie in een gen wel leidt tot een immuundeficiëntie, maar dat er nog er weinig evidence is hiervoor beschreven in de literatuur. Zo is voor het *POLE2* gen (OMIM 602670) slechts één patiënt beschreven met een mutatie en een gecombineerde afweerstoornis wat wordt gezien als te weinig bewijs om het gen toe te voegen aan het SCID-genen panel (8).

Het is ook mogelijk dat mutaties in genen wel gepaard gaan met lage aantallen T-lymfocyten en lage TRECs, maar dat er geen indicatie is voor een stamceltransplantatie. Een voorbeeld hiervan is het 22q11.2 deletie syndroom/DiGeorge syndroom (zie ook hoofdstuk 3 "Discussiepunten"). Ook valt het *BCL11B* gen hieronder. Varianten in dit BAF chromatin remodeling complex subunit 11b (OMIM 606558) gen gaan gepaard gaan met congenitale afwijkingen, neurocognitieve defecten, dysmorphe kenmerken en T-cel deficiëntie. Recent studies laten zien dat deze patiënten zich presenteren met lage TRECs (9), maar het staat niet vast dat deze patiënten met dit neurale beeld worden getransplanteerd. Daarnaast zijn er mutaties in genen waarbij niet alleen geen stamceltransplantatie-indicatie is, maar waarbij het stamceltransplantatie traject bij een sterk bekorte levensverwachting actief vermeden dient te worden zoals bij mutaties in het *ATM*-gen (zie ook alinea ATM in hoofdstuk 3 "Discussiepunten").

Tot slot kan het zo zijn dat er mutaties in de panels zijn beschreven die niet gepaard gaan met lage TRECs of immuundeficiënties. Een voorbeeld hiervan is *XRCC4* (OMIM 194363) wat genoemd wordt in het Gezondheidsraadrapport. Tot nu toe zijn mutaties in het *XRCC4* gen niet geassocieerd met immuundeficiënties en het gen is dan ook niet opgenomen in de IUIS classificatie (10, 11).



### 3. Discussiepunten

#### DiGeorge syndroom en TBX1

DiGeorge ook wel het 22q11.2 deletie syndroom (OMIM 188400) of velocardiofaciaal syndroom genoemd, wordt in de meeste gevallen veroorzaakt door een deletie op chromosoom 22. Zeldzamer zijn de mutaties in het *TBX1* gen op locatie 22q11.21 die geassocieerd zijn met DiGeorge (OMIM 602054). Het *TBX1* gen codeert voor het T-box 1 eiwit, een transcriptiefactor. Het T-box 1 eiwit speelt een belangrijke rol tijdens de embryonale ontwikkeling. Mutaties in het *TBX1* gen leiden tot een verstoring in de ontwikkeling van spieren, botten, belangrijke bloedvaten, maar ook van de thymus. DiGeorge kan zich op verschillende manieren presenteren, maar veelvoorkomend zijn aangeboren hartafwijkingen, schizis en typische uiterlijke kenmerken. De deletie van een deel van chromosoom 22 of een mutatie in *TBX1* kunnen beiden ook leiden tot een verstoring in het afweersysteem en dus lage TRECs. DiGeorge patiënten komen niet in aanmerking voor een stamceltransplantatie. In zeldzame gevallen ontvangen DiGeorge patiënten een thymustransplantatie, maar deze behandeling wordt alleen in Londen uitgevoerd. Daarnaast wordt er onderzoek gedaan naar behandeling met HLA-identieke (gematureerde) T-cellen.

Genetische opsporing van de 22q11 deletie wordt in de academische centra van Nederland gedaan met een SNP-array. Een mutatie in het *TBX1* gen kan wel met een WES worden opgespoord. Er is besloten om de deze analyses niet standaard met de WES van het SCID-panel uit te voeren. Aangezien DiGeorge patiënten niet in aanmerking komen voor een stamceltransplantatie, is een spoeddiagnose van DiGeorge na een afwijkende TREC-uitslag niet geïndiceerd. Wanneer er echter enige (fenotypische) verdenking is op DiGeorge zal naast het SCID-panel ook een SNP-array worden uitgevoerd. Op deze manier worden ouders minder lang in onzekerheid gehouden over de diagnose. Een mutatie in *TBX1* is veel zeldzamer dan een deletie. Alleen indien er geen afwijkingen in de SNP-array gevonden worden en er toch een sterke blijvende verdenking op DiGeorge is, zal aanvullend het *TBX1*-gen worden geanalyseerd.

#### ATM

Het *ATM*-gen ofwel het *ataxia telangiectasia mutated* gen is betrokken bij celgroei/deling, ontwikkeling van o.a. het zenuwstelsel en DNA *repair* (OMIM 607585). Er zijn enkele honderden pathogene mutaties in het *ATM*-gen beschreven die kunnen leiden tot het ziektebeeld ataxia telangiectasia (AT). AT is een autosomaal recessief overervende aandoening die gepaard gaat met coördinatiestoornissen, spierzwakte, vaatafwijkingen, een verstoring in het afweersysteem en kankerpredispositie. Ook dragers van één pathogene *ATM* mutatie (bijvoorbeeld ouders van kinderen met AT) hebben een enigszins verhoogd risico op het krijgen van kanker (zie onder). De incidentie van AT is ongeveer 1:109.000 pasgeborenen (12). Patiënten met AT kunnen zich ook presenteren met lage TRECs, hoewel het duidelijk is dat niet alle AT patiënten zullen worden opgespoord met de TREC-screening (13). AT-patiënten hebben sterk bekorte levensverwachting. Al zijn er voor AT geen curatieve opties, het vroegtijdig opsporen van AT kan voor patiënten en familie een ingrijpend diagnostisch traject wegnemen. Dit is echter geen argument voor neonatale screening. Zoals de regels van de neonatale screeningsprogramma's stellen, moet het screenen op onbehandelbare aandoeningen vermeden proberen te worden. De ziektelast van patiënten met AT wordt in de meeste gevallen nauwelijks gedefinieerd door ernstige recidiverende infecties. Het vroeg



stellen van de diagnose AT heeft dan ook weinig klinische behandelingsgevolgen op immunologisch gebied.

Stamceltransplantatie is geen curatieve optie voor AT patiënten, omdat hier alleen de immunologische verstoring wordt hersteld en (zo goed als zeker) niet de neurologische aandoening. Het is dan ook niet wenselijk dat AT-patiënten in het (chemotherapie) conditionering/stamceltransplantatie traject terecht komen. Het komt in zeldzame gevallen voor dat patiënten met een afwijkende TREC-waarde en afwijkend immunofenotype, zonder onderliggende SCID-mutatie, met ernstige immuundeficiënties toch in aanmerking komen voor stamceltransplantatie. Het is van belang bij deze patiënten pathogene mutaties in het *ATM*-gen te hebben uitgesloten te hebben voor het conditionering/stamceltransplantatie traject gestart wordt. De analyse van het *ATM*-gen kan het beste geïntegreerd worden in een getrappt follow-up schema. Indien er zich een pasgeborene presenteert met lage TRECs en vrijwel afwezige T-cellen bij immunofenotypering zal eerst het SCID-genen panel worden geanalyseerd. Indien er geen genetische diagnose uit het SCID-genen panel komt, kunnen ouders verder gecounseld worden door de kinderarts en klinische geneticus voor verdere genetische analyse. Een uitgebreide genetische analyse met bijvoorbeeld het primaire immuundeficiëntie (PID)-panel omvat ook een analyse van het *ATM*-gen waarbij voorafgaand met ouders besproken moet worden dat er ook ongeneselijke ernstige ziekten uit de genetische analyse kunnen komen.

Het *ATM*-gen is een groot gen en mutaties komen in veel varianten voor. Bij een kind met AT zijn beide varianten in het gen per definitie pathogene mutaties. Bij toevallsbevindingen (één variant in het *ATM* gen ofwel heterozygote mutaties) is het moeilijk te voorspellen of deze pathogeen zijn of niet. Er zijn heterozygote pathogene mutaties beschreven in het *ATM*-gen die gepaard gaan met een verhoogde kans op borstkanker. Draggers van de mutatie zullen eerder in het borstkankerscreeningstraject komen. Het risico op dragerschap van pathogene mutaties is vrij hoog (1:150 tot 1:200) (14). Indien een pasgeborene met lage TREC-waarden geen SCID maar AT blijkt te hebben, dan betekent dit dat ouders beide drager zijn. Zij hebben dus beiden een verhoogd risico op borstkanker. Deze bevindingen zou ook zonder screening aan het licht zijn gekomen wanneer de diagnose AT op een later moment bij hun kind gesteld werd. Wanneer het *ATM*-gen wordt geanalyseerd in het PID-panel omdat er geen diagnose uit het SCID-panel kwam, kan er ook dragerschap gevonden worden van een pathogene *ATM*-mutatie. Zowel het kind als de ouders hebben een verhoogd risico op borstkanker. Deze bevinding heeft binnen de familie (stamboom) ook consequenties. De uitslag 'een verhoogd risico op borstkanker bij het kind, één van de ouders en overige familieleden' kan dus een nevenbevinding van de SCID-screening zijn. Het is daarom van groot belang dat ouders hierover goed gecounseld worden voorafgaand aan het inzetten het PID-panel met *ATM*. Er moet specifiek worden gevraagd of ouders willen weten of er een verhoogd risico is op borstkanker bij het kind en dus bij andere familieleden.

### **Spoed whole exome sequencing (WES)**

In overleg met de kinderartsen en genetisch laboratoriumspecialisten is besloten dat de genetische analyse na een afwijkende TREC-uitslag met spoed zal worden uitgevoerd. De uitslag is dan binnen 2-4 weken beschikbaar. Een belangrijk argument voor het laten uitvoeren van een spoed WES is dat er minder functionele testen hoeven worden uitgevoerd. Daarnaast zijn ouders minder lang in onzekerheid. Een



tegenargument is dat in het geval van een clean-cut immunofenotypisch beeld (bijv. T-B+NK- bij een jongen) de genetische diagnose niet veel invloed heeft op het starten van het SCT-traject. Daar tegenover staat dat de meeste gevallen zich niet zullen presenteren met een *clean-cut* diagnose. De kosten voor een spoed WES moeten wel in de KEA/KBA worden meegenomen. Hierbij moet ook een berekening worden gedaan in hoeveel procent van de gevallen een genetische spoed diagnose invloed heeft gehad op het vervolgtraject.

### **Trioanalyse**

Een trioanalyse van het genetische materiaal van kind en ouders heeft de voorkeur boven enkel de analyse van het kind. Bij een trioanalyse zal in het genoom van ouders alleen worden gekeken naar de varianten die gevonden zijn bij het kind. Het kind is leidend. Een trioanalyse verschaft direct duidelijkheid over de gevonden bevindingen, er is geen extra bevestigend onderzoek meer nodig. Ouders blijven hierdoor minder lang in onzekerheid. Er kunnen uitspraken gedaan worden over overervingspatronen en ook *de novo* mutaties kunnen worden gedetecteerd. Wanneer er in eerste instantie geen trioanalyse wordt uitgevoerd, is voor de interpretatie van de bevindingen altijd op een later moment alsnog analyse van het genoom van ouders geïndiceerd. Ook logistiek gezien heeft een trioanalyse de voorkeur. De kosten van een trioanalyse worden verhaald via de zorgverzekering van het kind. Ouders hoeven dus niet hun 'eigen risico' in te leveren. Wanneer er een bewezen familiemutatie is, is het voldoende om alleen targeted genotypering uit te voeren. Het kostenaspect van een trioanalyse zal ook worden meegenomen in de update van de kosteneffectiviteit- baten analyse (KEA/KBA )door TNO.

### **Laagdrempelig PID-panel inzetten**

Indien er geen mutatie wordt gevonden in een van de genen van het SCID-genen panel, kan er door de kinderarts-immunoloog en de klinisch geneticus gesproken worden met ouders over het uitbreiden van de genetische diagnostiek. Het PID-genenpanel kan in worden gezet wanneer er geen mutatie wordt gevonden in het SCID-genen panel maar er wel sprake blijft van T-cel lymfocytopenie. In het PID-genen panel zijn er echter ook genen opgenomen waarbij varianten geassocieerd zijn met afweerstoornissen zonder stamceltransplantatie-indicatie of zelfs ziektebeelden waarbij er én geen curatieve behandeling is én een verkorte levensverwachting. In het geval van uitgebreide genetische diagnostiek is counseling van ouders dus van groot belang,

## **4. Beargumentering genen die opgenomen zijn in het SCID panel**

### **ADA (adenosine deaminase)**

Het ADA-gen codeert voor het *enzyme adenosine deaminase* (OMIM 608958). Adenosine deaminase zet deoxyadenosine, wat toxisch is voor lymfocyten, om in de ongevaarlijke stof deoxyinosine. Mutaties in het gen kunnen leiden tot een verstoring in de productie van het enzym en daarmee tot een verstoring in de ontwikkeling van lymfocyten (ADA-SCID). Voor patiënten met ADA-SCID is naast stamceltransplantatie ook gentherapie een curatieve behandelingsoptie (referentie nog toe te voegen). Van de 43 SCID-patiënten in Nederland van 1998 t/m 2013 hadden vijf patiënten een onderliggende mutatie in het ADA-gen. Van de 52 SCID-patiënten in USA van 2008 t/m 2013 hadden vijf patiënten een onderliggende mutatie



in het ADA-gen. Het gen is beschreven in de IUIS-classificatie bij T-B- SCID. Het gen wordt tevens genoemd in het Gezondheidsraadrapport en in de externe SCID-genen panels.

### **AK2 (adenylate kinase 2)**

Adenylate kinases spelen een belangrijke rol in het adenine nucleotide metabolisme en in de hematopoëse (OMIM 103020). Mutaties in het gen kunnen leiden tot een SCID-beeld (reticular dysgenesis) met afwezigheid van granulocyten en vrijwel complete deficiëntie van lymfocyten in het perifere bloed. Van de 43 SCID-patiënten in Nederland van 1998 t/m 2013 had één patiënt een onderliggende mutatie in het AK2-gen. Het gen is beschreven in de IUIS-classificatie bij T-B- SCID en wordt tevens genoemd in het Gezondheidsraadrapport en in de externe SCID-genen panels.

### **CD3 genen**

Het CD3E (OMIM 186830), CD3D (OMIM 186790) en CD3G (OMIM 186740) genen coderen voor het CD3-polypeptiden. Samen vormen de polypeptiden en de T-celreceptoren heterodimeren het T-celreceptor-CD3 complex. De polypeptiden vormen een belangrijke rol in de T-cel ontwikkeling en mutaties in het gen kunnen dan ook leiden tot een ernstige T-cel gerelateerde immunodeficiëntie (SCID). Van de 43 SCID-patiënten in Nederland van 1998 t/m 2013 had één patiënt een onderliggende mutatie in het CD3E-gen. De genen zijn beschreven in de IUIS-classificatie bij T-B+ SCID. De genen worden tevens genoemd in het Gezondheidsraadrapport en in de externe SCID-genen panels.

### **CD247**

Het CD247 gen codeert voor het T-celreceptor zèta eiwit (OMIM 186780). Samen met de T-celreceptor heterodimeren en de CD3-moleculen wordt het T-celreceptor-CD3-complex gevormd. De zèta keten speelt een belangrijke rol in het vertalen van de respons vanaf de antigeenherkenning tot verschillende intracellulaire signaaltransductie *pathways*. Lage expressie van het gen resulteert in een verminderde immuunrespons. Daarnaast zijn er mutaties beschreven in het CD247 gen die resulteren in een T-cel deficiëntie (15). Het gen is beschreven in de IUIS-classificatie bij T-B+ SCID en wordt tevens benoemd in het Gezondheidsraadrapport. Het gen is niet opgenomen in de externe SCID-genen panels.

### **CD8A**

Het CD8A antigeen is een glycoproteïne aanwezig op het celoppervlak van cytotoxische T-cellen (OMIM 186910). Het eiwit werkt als een co-receptor met de T-cel receptor om antigenen te herkennen vanaf de MHC klasse I moleculen van een antigeen presenterende cel (APC). De CD8 homodimeer stimuleert ook overleving en differentiatie van geactiveerde lymfocyten in geheugencellen. Mutaties in het gen kunnen leiden tot een afwezigheid van CD8-positieve cellen en daarmee een immunologisch defect. Dit immunologische defect gaat gepaard met lage TRECs (16). Het gen is beschreven in de IUIS-classificatie onder *combined immunodeficiencies* met normale CD4 cellen. Het CD8A gen staat niet beschreven in het Gezondheidsraadrapport, maar is wel opgenomen in de externe SCID-genen panels.

### **CORO1A (Coronin 1A)**





Het CORO1A gen codeert voor een eiwit uit de *WD-repeat protein* familie (OMIM 605000). Deze familie van eiwitten zijn betrokken bij een groot aantal cellulaire processen als *cell cycle progression*, signaaltransductie, apoptose en gen regulatie. Daarnaast maken ze onderdeel uit van het cytoskelet van *highly motile* cellen. Mutaties in het gen kunnen leiden tot een immuundeficiëntie gekarakteriseerd door de afwezigheid van CD4+ T-cellen (SCID). Het gen is beschreven in de IUIS-classificatie bij T-B+ SCID. Het gen wordt tevens genoemd in het Gezondheidsraadrapport en in de externe SCID-genen panels.

#### **DCLRE1C (DNA cross-link repair 1C of Artemis)**

Het DCLRE1C gen codeert voor een nucleair eiwit dat betrokken is bij de V(D)J recombinatie van de T-cel receptor en DNA *repair* (OMIM 605988). Mutaties in het gen kunnen leiden tot T-B- SCID met defecten in het DNA *repair* mechanisme en de V(D)J recombinatie. Deze patiënten hebben een verhoogde gevoeligheid voor ioniserende straling. Van de 43 SCID-patiënten in Nederland van 1998 t/m 2013 hadden drie patiënten een onderliggende mutatie in het Artemis-gen. Van de 52 SCID-patiënten in USA van 2008 t/m 2013 had twee patiënten een onderliggende mutatie in het DCLRE1C-gen. Het gen is beschreven in de IUIS-classificatie bij T-B- SCID. Het gen wordt tevens genoemd in het Gezondheidsraadrapport en in de externe SCID-genen panels.

#### **DOCK2 (dedicator of cytokinesis 2)**

Het DOCK2 eiwit komt voornamelijk tot expressie in perifere leukocyten (OMIM 603122). Het is betrokken bij *remodeling* van het actine cytoskelet wat nodig is voor de migratie van lymfocyten als reactie op chemokine signalering. Mutaties in het gen kunnen leiden tot een vorm *van een gecombineerde afweerstoornis* gekarakteriseerd door T-lymfocytopenie en verminderde B- en NK-cel functie. Het gen is beschreven in de IUIS-classificatie bij *combined immunodeficiencies*. Het DOCK2 gen staat niet beschreven in het Gezondheidsraadrapport, aangezien de relatie tussen het gendefect en immuundeficiënties pas recentelijk aan het licht kwam (17). Het gen is wel opgenomen in één van de externe SCID-genen panels.

#### **DOCK8 (dedicator of cytokinesis 8)**

Het DOCK8 eiwit helpt bij het behoud van de structuur van T-cellen en NK-cellen (OMIM 611432). Het ondersteunt tevens bij migratie van deze cellen naar plekken van infectie. Daarnaast is het ook betrokken bij chemische *signalling pathways* die B-cellen stimuleren tot maturatie en antilichaamproductie. Mutaties in het gen kunnen leiden tot het hyper-IgE syndroom, een ernstige afweerstoornis. Het gen is beschreven in de IUIS-classificatie bij *combined immunodeficiencies* met lage T-cellen en B-cellen. Het DOCK8 gen staat niet beschreven in het Gezondheidsraadrapport, maar het is wel geassocieerd met lage TRECs (18). Het gen is wel opgenomen en in de externe SCID-genen panels.

#### **FCHO1 (FCH domain only protein 1) (toegevoegd op 13-03-2020)**

Het F-BAR domain only protein 1 is betrokken bij clathrin-mediated endocytose, een proces waarbij cellen eiwitten aan het celoppervlak en extracellulaire moleculen internaliseren (OMIM 613437). Mutaties in het *FCHO1* gen gaan gepaard met een ernstig gecombineerde afweerstoornis. Er zijn vijf patiënten in vijf families beschreven waarvan een deel van deze patiënten ook een stamceltransplantatie heeft ondergaan



(19). Het is niet bekend of mutaties in dit gen ook gepaard gaan met lage TRECs maar op basis van de fenotypering kan dit wel worden aangenomen. Aangezien er sprake is van een SCID fenotype zonder comorbiditeit is er besloten het gen op te nemen in het SCID-genen panel. Het gen is tevens beschreven in de IUIS classificatie bij *combined immunodeficiencies*.

### **FOXI3 (toegevoegd op 30-09-2022)**

Het *FOXI3* gen codeert voor de transcriptiefactor Forkhead Box I3 (OMIM 612351), en behoort tot de FOX familie van transcriptoren zoals *FOXN1*, die betrokken zijn bij de ontwikkeling van de non-neuronale ectodermale structuren. Homozygote *Foxi3* knockout muizen hebben een afwijkende ontwikkeling van de thymus, craniofaciale en oor aanleg, en heterozygote *Foxi3* gemuteerde muizen vertonen thymus hypoplasie.

Heterozygote (loss-of-function) varianten in *FOXI3* zijn beschreven bij afwijkende TRECs in de hielprikscreening (26). Bij deze patiënten verklaart de *FOXI3* variant de afwijkende TREC's en is er klinisch een variabele, niet-ernstige T-cel lymfopenie. Ook zijn patiënten met chromosoom 2p21 microdeletie inclusief *FOXI3* beschreven met thymushypo-/aplasie.

*FOXI3* opgenomen in het SCID-genen panel, vanwege de verklaring voor de lage TRECs (zonder transplantatieindicatie?).

### **FOXN1 (toegevoegd op 22-01-2020)**

Het *FOXN1* gen codeert voor de transcriptiefactor Forkhead Box N1 (OMIM 600838). De FOX familie van transcriptiefactoren zijn betrokken bij de ontwikkeling van de epitheliale cellen van de huid en de thymus. *Loss-of-function* mutaties in dit gen resulteren in een complete afwezigheid van de thymus, congenitale alopecia en nagel dystrofie. Deze patiënten hebben een ernstig immuundeficiëntie met stamceltransplantatie. Recent is beschreven dat heterozygote varianten in het *FOXN1* gen ook geassocieerd zijn met T-cel lymfocytopenie, een verhoogd risico op infecties en lage TREC levels bij de geboorte (20). Stamceltransplantatie leidt in deze patiënten echter niet tot T-cel reconstitutie en is daarmee geen curatieve optie. Deze heterozygoten varianten zouden dus als bijvangst kunnen worden gevonden in de SCID screening. Het *FOXN1* gen is beschreven in de IUIS classificatie bij *combined immunodeficiencies with associated or syndromic features*.

### **IL2RG (interleukine 2 receptor subunit gamma)**

Het *IL2RG* gen codeert voor eiwit genaamd de *common gamma chain* (*γc*) (OMIM 308380). Dit eiwit speelt een belangrijk rol in verschillende receptoren betrokken bij het immuunsysteem. Deze receptoren bevinden zich op de oppervlakte van immature stamcellen in het beenmerg. De receptoren reguleren groei en maturatie van verschillende lymfocyten subsets als T-cellen en NK-cellen. Er zijn meer dan 300 mutaties beschreven in het *IL2RG* gen die kunnen leiden tot niet-functionele versies van de *common gamma chain* receptor. Hierdoor kunnen lymfocyten niet normaal ontwikkelen en ontstaat een X-linked T-B+NK-SCID. Van de 43 SCID-patiënten in Nederland van 1998 t/m 2013 hadden negen patiënten een onderliggende mutatie in het *IL2RG*-gen. Van de 52 SCID-patiënten in USA van 2008 t/m 2013 hadden





tien patiënten een onderliggende mutatie in het IL2RG-gen. Het gen is beschreven in de IUIS-classificatie bij T-B+ SCID. Het gen wordt tevens genoemd in het Gezondheidsraadrapport en in de externe SCID-genen panels.

### **IL7R (interleukine 7 receptor)**

De interleukine 7 receptor alfa keten maakt onderdeel uit van zowel de IL-7 receptor als de *thymic stromal lymphopoietin* (TSLP) receptor (OMIM 146661). Deze receptoren bevinden zich op celmembranen van verschillende immuuncellen. Mutaties in het IL7R gen kunnen leiden tot de verstoring van de ontwikkeling van T-cellen en daarmee tot een T-B+NK+ beeld van SCID. Van de 43 SCID-patiënten in Nederland van 1998 t/m 2013 hadden twee patiënten een onderliggende mutatie in het IL7R $\alpha$ -gen. Van de 52 SCID-patiënten in USA van 2008 t/m 2013 hadden zes patiënten een onderliggende mutatie in het IL7R-gen. Het gen is beschreven in de IUIS-classificatie bij T-B+ SCID. Het gen wordt tevens genoemd in het Gezondheidsraadrapport en in de externe SCID-genen panels.

### **JAK3 (Janus kinase 3)**

Het JAK3 eiwit is onderdeel van de JAK/STAT *pathway*, een belangrijke *pathway* die bijdraagt aan het doorgeven externe chemische signalen aan de celnucleus (OMIM 600173). Op deze manier wordt groei en maturatie van bepaalde lymfocyten (T-cellen en NK-cellen) gereguleerd. Er zijn meer dan 50 mutaties beschreven in het JAK3 gen die kunnen leiden tot verstoorde lymfocytenontwikkeling en daarmee een SCID-beeld. Van de 52 SCID-patiënten in USA van 2008 t/m 2013 hadden drie patiënten een onderliggende mutatie in het JAK3-gen. Het gen is beschreven in de IUIS-classificatie bij T-B+ SCID. Het gen wordt tevens genoemd in het Gezondheidsraadrapport en in de externe SCID-genen panels.

### **LAT (linker for activation of T cells)**

Het LAT-eiwit speelt een belangrijke rol in de T-cel antigeen receptor (TCR) en pre-TCR gemedieerde signalering in zowel mature T-cellen als tijdens de ontwikkeling (OMIM 602354). Het LAT eiwit is een transmembraan eiwit wat gefosforyleerd wordt door het ZAP-70/Syk tyrosine kinase. Het eiwit is tevens betrokken in signaleringsprocessen in NK-cellen en mestcellen. Mutaties in het LAT-gen kunnen leiden tot SCID, auto-immuunziekte en hypogammaglobulinemia. Het gen is beschreven in de IUIS-classificatie bij T-B+ SCID. Het wordt niet genoemd in het Gezondheidsraadrapport, aangezien de ontdekking van het LAT-gen en de relatie met *early onset* immuundeficiënties zeer recent ontdekt werd (21). Het gen is wel opgenomen in één van de externe SCID-genen panels.

### **LCK (LCK proto-oncogene, Src family tyrosine kinase)**

Het LCK-gen is onderdeel van de Src familie van proteïne tyrosine kinases (OMIM 153390). Het eiwit speelt een rol in de selectie en maturatie van ontwikkelende T-cellen. Het eiwit is gelokaliseerd op het plasmamembraan waar het bindt aan oppervlakte receptoren als CD4 en CD8. Mutaties in het LCK-gen kunnen leiden tot een primaire immuundeficiëntie gekarakteriseerd door T-cel dysfunctie. Het gen is beschreven in de IUIS classificatie onder *combined immunodeficiencies* met lage CD4+ positieve cellen en



lage regulerende T-cellen. Mutaties in LCK kunnen dus ook gepaard gaan met lage TRECs. Het gen is niet opgenomen in de externe SCID-genen panels. Het is wel beschreven in het Gezondheidsraadrapport.

#### **LIG4 (DNA ligase 4)**

LIG4 is een DNA ligase en speelt een belangrijke rol in de V(D)J recombinitie en bij *repair* van dubbelstrengs DNA-breuken (OMIM 601837). Het heeft interacties met DNA-dependent protein kinase (DNA-PK). Mutaties in het LIG4 gen kunnen leiden tot defecten in de V(D)J-recombinitie daarmee leidend tot een ernstige immuundeficiëntie evt. in combinatie met neurologische afwijkingen (microcefalie en dwerggroei). Van de 43 SCID-patiënten in Nederland van 1998 t/m 2013 had één patiënt een onderliggende mutatie in het LIG4-gen. Het gen is beschreven in de IUIS-classificatie bij T-B- SCID. Het gen wordt tevens genoemd in het Gezondheidsraadrapport en in de externe SCID-genen panels.

#### **NHEJ1 (non-homologous end joining factor 1)**

Het NHEJ1-gen wordt ook wel het XLF-gen genoemd (OMIM 611290). Het NHEJ1 eiwit is een DNA *repair* eiwit betrokken bij de DNA *nonhomologous end joining*. Dit proces is essentieel voor het herstel van dubbelstrengs DNA breuken en V(D)J recombinitie. Mutaties in het gen kunnen leiden tot een T- en B-lymfocytopenie (SCID-beeld) meestal geassocieerd met microcefalie en groeiretardatie. Hypomorfe NHEJ1 mutaties kunnen ook leiden tot een geïsoleerd SCID-beeld. Het gen is beschreven in de IUIS-classificatie bij T-B- SCID. Het gen wordt tevens genoemd in het Gezondheidsraadrapport en in de externe SCID-genen panels.

#### **PAX1 (toegevoegd op 12-03-2021)**

PAX1 behoort tot de paired box (PAX) familie van transcriptiefactoren en speelt een kritische rol in patroonvorming tijdens de embryogenese. Pathogene varianten in PAX1 zijn geassocieerd met het autosomaal recessieve "Otofaciocervical syndrome-2 with T-cell deficiency (OTFCS2)", een zeldzame aandoening gekarakteriseerd door faciale dysmorphieën, gehoorverlies, brachiale defecten, skeletafwijkingen, en milde verstandelijke beperking (OMIM 615560). Recent werden tevens patiënten gerapporteerd met afwijkende/afwezige thymus met T-cel immuundeficiëntie en recidiverende, soms fatale infecties (22, 23): 8 patiënten uit 3 families zijn beschreven met lage TRECs en een SCID T-B+NK+ fenotype bij wie opvallend de T-cel deficiëntie niet werd gecorrigeerd door HSCT in 3 van 4 patiënten ondanks donor chimerisme. Het PAX1 gen is opgenomen in de laatste IUIS update 2021 bij de T-B+ SCID (tabel 1) (24).

#### **PNP (purine nucleoside phosphorylase)**

Purine nucleoside phosphorylase is een enzym wat afvalmoleculen die gevormd worden tijdens DNA-afbraak zoals als deoxyinosine en deoxyguanosine omzet in moleculen als hypoxanthine en guanine die geen stapelingsrisico hebben (OMIM 164050). Het enzym is voornamelijk actief in lymfocyten. Mutaties die leiden tot een purine nucleoside phosphorylase deficiëntie leiden tot toxische stapeling van afvalmoleculen. Dit leidt voornamelijk in immature lymfocyten in de thymus tot apoptose en daarmee tot een verstoord afweersysteem. Van de 43 SCID-patiënten in Nederland van 1998 t/m 2013 hadden drie



patiënten een onderliggende mutatie in het PNP-gen. Het gen is beschreven in de IUIS-classificatie onder 'other defects' omdat het net als bij *late onset* ADA-SCID gepaard kan gaan met een progressieve afname van T-cellen. PNP-deficiëntie presenteert zich dus niet altijd met lage TRECs bij de geboorte. Het gen wordt wel genoemd in het Gezondheidsraadrapport en in de externe SCID-genen panels.

### **PRKDC (protein kinase, DNA-activated, catalytic polypeptide)**

Het PRKDC gen ofwel DNA-PKcs gen codeert voor een katalytische subunit van de DNA-*dependent protein kinase* (DNA-PK) (OMIM 600899). Het speelt een rol bij *repair* van dubbelstrengs DNA breuken en bij V(D)J-recombinatie. Mutaties in het gen kunnen leiden tot een vorm van SCID. In sommige gevallen gaat dit gepaard met dysmorphe kenmerken, groeiretardatie, microcefalie en verstoorde neurologische functies. Het gen is beschreven in de IUIS-classificatie bij T-B- SCID. Het gen wordt tevens genoemd in het Gezondheidsraadrapport en in één van de externe SCID-genen panels.

### **PTPRC (protein tyrosine phosphatase, receptor type C)**

Het PTPRC gen codeert voor een eiwit van de protein tyrosine phosphatase (PTP) familie (OMIM 151460). Deze eiwitten spelen een rol in allerlei cellulaire processen als groei, differentiatie en mitose. PTPRC speelt een essentiële rol in het reguleren van de T-cel en B-cel antigeen receptor signalering. Mutaties in het gen kunnen leiden tot een SCID-beeld. Het gen is beschreven in de IUIS-classificatie bij T-B-+ SCID. Het gen wordt tevens genoemd in het Gezondheidsraadrapport en in één van de externe SCID-genen panels.

### **RAC2 (Rac family small GTPase 2)**

Het RAC2-gen codeert voor een eiwit wat een rol speelt in secretie, fagocytose en cel polarisatie (OMIM 602049). Mutaties in het gen zijn geassocieerd met het neutrofielen immunodeficiëntie syndroom. Het gen is beschreven in de IUIS classificatie onder aangeboren defecten in de fagocyten aantallen of functie. Het artikel van Kwam *et al.* beschrijft echter ook een patiënt met een RAC2-defect diagnose (non-SCID T-cel lymfocytopenie) en lage TRECs. Aangezien bij deze patiënt een stamceltransplantatie geïndiceerd was, wordt het RAC2 gen opgenomen in het SCID-genenpanel. Het gen is niet beschreven in het Gezondheidsraadrapport, maar wel in één van de externe SCID-genen panels.

### **RAG1 en RAG2 (recombination activating 1 en 2)**

Het RAG1 (OMIM 179615) en RAG2 (OMIM 179616) eiwit maakt onderdeel uit van het RAG-complex. Tijdens het V(D)J recombinatieproces, bindt het RAG complex aan een deel van het DNA genaamd de *recombination signal sequence* (RSS), wat naast een V-, D- of J segment is gelegen. Het RAG-complex maakt een opening in het DNA tussen het segment en de RSS. Op deze manier kunnen V, D, J-segmenten in verschillende combinaties worden gearrangeerd worden. Mutaties in het RAG1- en RAG2-gen die leiden tot niet-functionele RAG1 en RAG2 eiwitten kunnen leiden tot een vorm van SCID zonder T- en B-cellen. Afhankelijk van de mutatie kan een RAG-deficiëntie ook resulteren in Omenn syndroom of andere vormen van leaky SCID. Van de 43 SCID-patiënten in Nederland van 1998 t/m 2013 hadden negen patiënten een onderliggende mutatie in het RAG1-gen. Van de 52 SCID-patiënten in USA van 2008 t/m 2013 hadden vijf patiënten een onderliggende mutatie in het RAG1-gen. Van de 43 SCID-patiënten in Nederland van 1998



t/m 2013 hadden twee patiënten een onderliggende mutatie in het RAG2-gen. Van de 52 SCID-patiënten in USA van 2008 t/m 2013 had één patiënt een onderliggende mutatie in het RAG2-gen. Beide genen zijn beschreven in de IUIS-classificatie bij T-B- SCID. Beide gen wordt tevens genoemd in het Gezondheidsraadrapport en in de externe SCID-genen panels.

### **RMRP (RNA component of mitochondrial RNA processing endoribonuclease)**

In tegenstelling tot veel andere genen, codeert het RMRP-gen niet voor een eiwit maar voor een non-coding RNA (OMIM 157660). Verschillende eiwitten kunnen binden aan dit moleculen waardoor het enzym RNase MRP gevormd wordt. Dit enzym speelt een belangrijke rol in de celcyclus en de vertaling van ribosomaal RNA naar eiwitten. Mutaties in het RMRP-gen kunnen leiden tot anauxetische dysplasie, kraakbeen/haar hypoplasie, maar ook tot immuunstoornissen. Van de 43 SCID-patiënten in Nederland van 1998 t/m 2013 had één patiënt een onderliggende mutatie in het RMRP-gen. Van de 52 SCID-patiënten in USA van 2008 t/m 2013 hadden twee patiënten een onderliggende mutatie in het RMRP-gen. Alle patiënten zijn getransplanteerd. Het gen is beschreven in de IUIS-classificatie bij immuno-ossale dysplasieën waarbij het immuunbeeld kan variëren. De analyse van het gen en de variant interpretatie van het gen zijn lastig, aangezien het gen niet codeert voor een eiwit. Er is een *founder mutation* (bekende variant), maar er blijft een risico om ernstige varianten te missen of niet te weten wat een variant betekent. De genetische laboratoriumspecialisten zullen in die gevallen hier onderling contact over opnemen. Het gen is niet opgenomen in het Gezondheidsraadrapport, maar wel in één van de externe SCID-genen panels.

### **MHC klasse I en II deficiënties**

Mutaties in de genen TAP 1 (OMIM 170260), TAP2 (OMIM 170261), TAPBP (OMIM 601962) en B2M (OMIM 109700) kunnen leiden tot een MHC klasse I deficiëntie. Bij een MHC klasse I deficiëntie zal ook het aantal CD8+ T-lymfocyten verlaagd zijn. Er kan namelijk geen selectie plaats vinden in de thymus op basis van MHC klasse I. MHC klasse II moleculen spelen in de thymus ook een belangrijke rol in de maturatie van CD4+ T-cellen. Mutaties die leiden tot MHC klasse I of II deficiënties kunnen dus ook TRECs tot gevolg hebben en hebben eventueel ook een indicatie voor stamceltransplantatie. Mutaties in RFX5 (OMIM 601863), RFXANK (OMIM 603200), RFXAP (OMIM 601861) en CIITA (OMIM 600005) kunnen leiden tot een MHC klasse II deficiëntie. De genen worden beschreven in de IUIS-classificatie onder *combined immunodeficiencies*. De genen zijn niet opgenomen in het Gezondheidsraadrapport of in de externe SCID-genen panels.

### **TTC7A (tetratricopeptide repeat domain 7A)**

Het TTC7A-gen codeert voor een onderdeel van een complex wat ondersteunt bij het van fosfatidylinositol-4 kinase aan het plasmamembraan (OMIM 609332). Mutaties in het gen kunnen leiden tot het gastro-intestinale defecten en immunodeficiëntie syndroom (GIDID). SCID is hierbij een vaak geassocieerd fenotype. Van de 52 SCID-patiënten in USA van 2008 t/m 2013 had één patiënt een onderliggende mutatie in het TTC7A-gen. Het gen is beschreven in de IUIS-classificatie bij *other defects* als *immunodeficiency with multiple intestinal atresias*. Er staat tevens bij vernoemd dat het beeld zich



variabel kan presenteren, maar in sommige gevallen wel met lage of afwezige TRECS. Dit is een argument om het TTC7A op te nemen in het SCID-panel. Het gen wordt niet genoemd in het Gezondheidsraadrapport, maar is wel opgenomen in één van de externe SCID-genen panels.

#### **STK4 (serine/threonine kinase 4)**

Het STK4 ofwel MST1 eiwit is een cytoplasma kinase betrokken bij de stress-geïnduceerde mitogeengeactiveerde *protein kinase* cascade (OMIM 604965). Mutaties in het gen kunnen leiden tot T-cel deficiëntie met of zonder cardiale malformaties. De T-cel deficiëntie wordt gekarakteriseerd door een lage naïeve T-cellen en daarmee mogelijk lage TRECS. Het gen is beschreven in de IUIS-classificatie onder *combined immunodeficiencies*. Het gen is niet beschreven in het Gezondheidsraadrapport of in de externe SCID-genen panels.

#### **ZAP70 (zeta chain of T cell receptor associated protein kinase 70)**

Het ZAP eiwit is onderdeel van een signalerings *pathway* in de ontwikkeling en activatie van CD8+ en CD4+ T-cellen (OMIM 176947). Er zijn meer dan 12 mutaties in het ZAP70-gen beschreven die kunnen leiden tot een SCID-beeld. Het gen is beschreven in de IUIS classificatie onder *combined immunodeficiencies*. ZAP70 deficiëntie kan zich ook presenteren met lage TRECS (25). Van de 43 SCID-patiënten in Nederland van 1998 t/m 2013 had één patiënt een onderliggende mutatie in het ZAP70-gen. Het gen wordt tevens genoemd in het Gezondheidsraadrapport en in één van de externe SCID-genen panels.

## **5. Tabel**

In onderstaande tabel zijn in groen de genen gemarkeerd die opgenomen zullen worden in het definitieve SCID-screeningspanel. In rood zijn de genen gemarkeerd die wellicht wel beschreven worden in andere panels maar die niet gepaard gaan met lage TREC en/of tot een immuundeficiënt beeld leiden. Afkortingen: *IUIS - International Union of Immunological Societies* en *GZR - Gezondheidsraadrapport*.

#### **SCID-genen tabel**

<b>Gen</b>	<b>OMIM gene</b>	<b>Inheritance</b>	<b>IUIS 2020</b>	<b>Comment</b>
ADA	608958	AR	table 1	
AK2	103020	AR	table 1	
B2M	109700	AR	table 1	
CD3D	186790	AR	table 1	
CD3E	186830	AR	table 1	
CD3G	186740	AR	table 1	
CD247	186780	AR	table 1	
CD8A	186910	AR	table 1	
CIITA	600005	AR	table 1	
CORO1A	605000	AR	table 1	
DCLRE1C	605988	AR	table 1	
DOCK2	603122	AR	table 1	



DOCK8	611432	AR	table 1	
FCHO1	613437	AR	table 1	13-03-2020: akkoord toevoegen aan SCID-genen panel CID (severe phenotype), TREC? (probably low), HSCT indicatie
FOXP1	600838	AR/AD LOF	table 2	22-01-2020: akkoord toevoegen aan SCID-genen panel
IL2RG	308380	XLR	table 1	
IL7R	146661	AR	table 1	
JAK3	600173	AR	table 1	
LAT	602354	AR	table 1	
LCK	153390	AR	table 1	
LIG4	601837	AR	table 1	
NHEJ1	611290	AR	table 1	
PAX1	615560	AR	table 1	12-03-2021: akkoord toevoegen aan SCID-genen panel
PNP	164050	AR	table 2	
PRKDC	600899	AR	table 1	
PTPRC	151460	AR	table 1	
RAC2	602049	AD GOF	table 1	
RAG1	179615	AR	table 1	
RAG2	179616	AR	table 1	
RMRP	157660	AR	table 2	
RFX5	601863	AR	table 1	
RFXANK	603200	AR	table 1	
RFXAP	601861	AR	table 1	
TAP1	170260	AR	table 1	
TAP2	170261	AR	table 1	
TAPBP	601962	AR	table 1	
TTC7A	609332	AR	table 2	
STK4	604965	AR	table 1	
ZAP70	176947	AR	table 1	

## 6. Referenties

Informatie over genen via Genetic Home Reference NCBI Gene, UniProt en OMIM.

1. Fischer A, Notarangelo LD, Neven B, Cavazzana M, Puck JM. Severe combined immunodeficiencies and related disorders. *Nature reviews Disease primers*. 2015;1:15061.
2. Heimall J, Logan BR, Cowan MJ, Notarangelo LD, Griffith LM, Puck JM, et al. Immune reconstitution and survival of 100 SCID patients post-hematopoietic cell transplant: a PIDTC natural history study. *Blood*. 2017;130(25):2718-27.
3. Chan K, Puck JM. Development of population-based newborn screening for severe combined immunodeficiency. *J Allergy Clin Immunol*. 2005;115(2):391-8.
4. Bousfiha A, Jeddane L, Picard C, Al-Herz W, Ailal F, Chatila T, et al. Human Inborn Errors of Immunity: 2019 Update of the IUIS Phenotypical Classification. *Journal of clinical immunology*. 2020.





5. de Pagter AP, Bredius RG, Kuijpers TW, Tramper J, van der Burg M, van Montfrans J, et al. Overview of 15-year severe combined immunodeficiency in the Netherlands: towards newborn blood spot screening. *European journal of pediatrics*. 2015;174(9):1183-8.
6. Kwan A, Abraham RS, Currier R, Brower A, Andruszewski K, Abbott JK, et al. Newborn screening for severe combined immunodeficiency in 11 screening programs in the United States. *Jama*. 2014;312(7):729-38.
7. Health Council of the Netherlands. Neonatal screening: new recommendations. The Hague: Health Council of the Netherlands; 2015. Contract No.: publication no. 2015/08.
8. Frugoni F, Dobbs K, Felgentreff K, Aldhekri H, Al Saud BK, Arnaout R, et al. A novel mutation in the POLE2 gene causing combined immunodeficiency. *J Allergy Clin Immunol*. 2016;137(2):635-8.e1.
9. Amatuni GS, Currier RJ, Church JA, Bishop T, Grimbacher E, Nguyen AA, et al. Newborn Screening for Severe Combined Immunodeficiency and T-cell Lymphopenia in California, 2010-2017. *Pediatrics*. 2019;143(2).
10. Murray JE, van der Burg M, H IJ, Carroll P, Wu Q, Ochi T, et al. Mutations in the NHEJ component XRCC4 cause primordial dwarfism. *American journal of human genetics*. 2015;96(3):412-24.
11. Saito S, Kurosawa A, Adachi N. Mutations in XRCC4 cause primordial dwarfism without causing immunodeficiency. *Journal of human genetics*. 2016;61(8):679-85.
12. Rothblum-Oviatt C, Wright J, Lefton-Greif MA, McGrath-Morrow SA, Crawford TO, Lederman HM. Ataxia telangiectasia: a review. *Orphanet J Rare Dis*. 2016;11(1):159-.
13. Mallott J, Kwan A, Church J, Gonzalez-Espinosa D, Lorey F, Tang LF, et al. Newborn screening for SCID identifies patients with ataxia telangiectasia. *Journal of clinical immunology*. 2013;33(3):540-9.
14. van Os NJ, Roeleveld N, Weemaes CM, Jongmans MC, Janssens GO, Taylor AM, et al. Health risks for ataxia-telangiectasia mutated heterozygotes: a systematic review, meta-analysis and evidence-based guideline. *Clinical genetics*. 2016;90(2):105-17.
15. Rieux-Laucat F, Hivroz C, Lim A, Mateo V, Pellier I, Selz F, et al. Inherited and somatic CD3zeta mutations in a patient with T-cell deficiency. *The New England journal of medicine*. 2006;354(18):1913-21.
16. Cossu F. Genetics of SCID. *Italian journal of pediatrics*. 2010;36:76.
17. Dobbs K, Dominguez Conde C, Zhang SY, Parolini S, Audry M, Chou J, et al. Inherited DOCK2 Deficiency in Patients with Early-Onset Invasive Infections. *The New England journal of medicine*. 2015;372(25):2409-22.
18. Dasouki M, Okonkwo KC, Ray A, Folmsbeel CK, Gozales D, Keles S, et al. Deficient T Cell Receptor Excision Circles (TRECs) in autosomal recessive hyper IgE syndrome caused by DOCK8 mutation: implications for pathogenesis and potential detection by newborn screening. *Clinical immunology (Orlando, Fla)*. 2011;141(2):128-32.
19. Calzoni E, Platt CD, Keles S, Kuehn HS, Beaussant-Cohen S, Zhang Y, et al. F-BAR domain only protein 1 (FCHO1) deficiency is a novel cause of combined immune deficiency in human subjects. *J Allergy Clin Immunol*. 2019;143(6):2317-21.e12.
20. Bosticardo M, Yamazaki Y, Cowan J, Giardino G, Corsino C, Scalia G, et al. Heterozygous FOXP1 Variants Cause Low TRECs and Severe T Cell Lymphopenia, Revealing a Crucial Role of FOXP1 in Supporting Early Thymopoiesis. *American journal of human genetics*. 2019;105(3):549-61.
21. Keller B, Zaidman I, Yousefi OS, Hershkovitz D, Stein J, Unger S, et al. Early onset combined immunodeficiency and autoimmunity in patients with loss-of-function mutation in LAT. *The Journal of experimental medicine*. 2016;213(7):1185-99.
22. Paganini I, Sestini R, Capone GL, Putignano AL, Contini E, Giotti I, et al. A novel PAX1 null homozygous mutation in autosomal recessive otofaciocervical syndrome associated with severe combined immunodeficiency. *Clinical genetics*. 2017;92(6):664-8.



23. Yamazaki Y, Urrutia R, Franco LM, Giliani S, Zhang K, Alazami AM, et al. PAX1 is essential for development and function of the human thymus. *Sci Immunol*. 2020;5(44).
24. Tangye SG, Al-Herz W, Bousfiha A, Cunningham-Rundles C, Franco JL, Holland SM, et al. The Ever-Increasing Array of Novel Inborn Errors of Immunity: an Interim Update by the IUIS Committee. *Journal of clinical immunology*. 2021;41(3):666-79.
25. Jilkina O, Thompson JR, Kwan L, Van Caesele P, Rockman-Greenberg C, Schroeder ML. Retrospective TREC testing of newborns with Severe Combined Immunodeficiency and other primary immunodeficiency diseases. *Molecular genetics and metabolism reports*. 2014;1:324-33.
26. Ghosh R, Bosticardo M, Singh S, Similuk M, Delmonte OM, Pala F, et al. FOXP3 haploinsufficiency contributes to low T-cell receptor excision circles and T-cell lymphopenia. *J Allergy Clin Immunol*. 2022 Aug 18;S0091-6749(22)01058-2.