

CD40 Ligand Expression nach Stimulation der T-Zellen

Material	Heparinblut	10 ml
Präanalytik	Transport	innerhalb \leq 24 h bei Raumtemperatur
Besonderheiten	gesunde Kontrolle erforderlich!	
Methode	Durchflusszytometrie	
Analysendauer	2-3 Tage	
Durchführung	von Mo-Do täglich (nicht Freitags, da über Nacht Inkubation)	
Akkreditiert	ja	
Indikation	Klinischer Verdacht auf ein Hyper-IgM-Syndrom.	
untersuchte Populationen	Prozentualer Anteil CD40 Ligand (CD40L) exprimierender T-Zellen nach Stimulation Kontrolle der Aktivierbarkeit der T-Zellen über den Aktivierungsmarker CD69	
Referenzbereiche	CD40L Expression auf aktivierten T-Helfer Zellen:	45-90%
	CD69 Expression auf aktivierten T-Helfer Zellen:	75-99%
	Cave: gesunde Säuglinge können CD40L deutlich erniedrigt exprimieren (eigene gesunde Kontrollen: 0% bei einem Frühgeborenen, 19% bei 8 Monate altem Säugling) der Nachweis bei Säuglingen ist daher nicht zuverlässig möglich und bedarf ggf. einer Wiederholungsanalyse. Zur Sicherung der Diagnose ist eine genetische Untersuchung unerlässlich.	
Zusätzliche Informationen	<p>Für eine Immunantwort sind Interaktionen zwischen unterschiedlichen Zelltypen essentiell. Die Aktivierung einer naiven T-Zelle durch eine antigenpräsentierende Zelle (APC, z.B. Monozyten, Makrophagen, dendritische Zellen, B-Zellen) wird durch die Expression einer Vielzahl stimulatorischer und costimulatorischer Moleküle initiiert, erhalten und modifiziert.</p> <p>Die initiale Aktivierung einer naiven T-Zelle erfolgt durch Binden des antigenspezifischen T-Zell-Rezeptors (TCR) an den MHC/Antigenkomplex auf antigenpräsentierenden Zellen, sowie durch co-stimulatorische Signale. Während der Aktivierung wird CD40L von T-Zellen vermehrt exprimiert und interagiert mit CD40 an der Oberfläche der APC.</p> <p>Ohne diese Interaktion ist die T-Zell-Aktivierung und die klonale T-Zell-Expansion eingeschränkt. Auch auf der Seite der APCs zeigen sich Funktionsdefekte bei mangelnder Interaktion von CD40 und CD40L:</p> <p>Bei B-Zellen führt die CD40-CD40L Interaktion zur Ausbildung sogenannter Keimzentren im Lymphknoten. Diese Keimzentren sind gekennzeichnet durch eine starke Proliferation und klonale Expansion aktivierter B-Zellen. Darüber hinaus werden durch diese Interaktion wesentliche Prozesse in der Reifung der humoralen adaptiven Immunantwort ausgelöst, insbesondere der sogenannte Isotypen-switch: Wechsel der konstanten Anteile des Immunglobulinmoleküls von IgM zu IgG, IgA oder IgE.</p>	

Bei einem Teil der Patienten mit sogenanntem Hyper-IgM-Syndroms (HIGM) liegen Mutationen im Gen für CD40L vor und führen zu einem Fehlen des Moleküls auf T-Zellen. CD40L wird X-chromosomal codiert, so dass (i.d.R.) nur männliche Personen klinisch betroffen sind (HIGM 1). In sehr seltenen Fällen können auch Mädchen betroffen sein, wenn sie Trägerinnen des defekten Gens sind und es gleichzeitig zu einer verschobenen X-Inaktivierung des gesunden X-Chromosoms in den T-Zellen kommt.

Das klinische Bild ist gekennzeichnet durch eine Infektneigung mit T-zellulärem Funktionsdefekt und einer auffälligen Zusammensetzung der Immunglobulinklassen: IgG, IgA und IgE sind vermindert, während IgM eine normale oder erhöhte Serumkonzentration zeigt.

CD40 Ligand (CD154) wird von T-Zellen nicht konstitutiv sondern erst nach Aktivierung exprimiert. Daher werden die Zellen über Nacht mit dem Mitogen PMA (Phorbol 12-Myristate 13-Acetate) in Kombination mit Calcium-Ionophore (Ca-Ionophore) stimuliert.

Der durchflusszytometrische Nachweis von CD40L erfolgt nach der Stimulation durch Markierung der CD40L exprimierenden T-Zellen mit Fluoreszenz-Farbstoff konjugiertem anti-CD40L (anti-CD154). CD40L wird ausschließlich von der CD4+ T-Helfer-Population exprimiert. Da CD4 durch die Stimulation mit PMA in die Zellen internalisiert wird und daher auf der Zelloberfläche reduziert nachweisbar ist, werden CD4+ T-Zellen hier indirekt nachgewiesen, indem eine Gegenfärbung mit anti-CD3 und anti-CD8 durchgeführt wird und auf die CD8 negative T-Zell-Population gated wird.

Um die Stimulation der T-Zellen zu überprüfen, werden parallel zur CD40L Untersuchung Aktivierungsmarker (CD69) - positive T-Zellen nachgewiesen.

Wegen der ggf. reduzierten Expression von CD40L bei Säuglingen und Kleinkindern (s. Referenzbereich), sollte zur Bestätigung der Diagnose eine genetische Untersuchung durchgeführt werden.