

## Degranulations-Assay (CD107a Release)

<b>Material</b>	Heparinblut	10 ml (bei Lymphopenie 15 ml)
<b>Präanalytik</b>	Transport	innerhalb $\leq$ 24 h bei Raumtemperatur
<b>Besonderheiten</b>	<b>gesunde Kontrolle erforderlich</b>	
<b>Methode</b>	Durchflusszytometrie	
<b>Analysendauer</b>	3-5 Tage	
<b>Durchführung</b>	Montag- Donnerstag	
<b>Akkreditiert</b>	ja	
<b>Indikation</b>	Klinischer Verdacht auf eine primäre (familiäre) Form der HLH (Hämophagozytische Lymphohistiozytose).	
<b>untersuchte Populationen</b>	Prozentualer Anteil CD107a - exprimierender Lymphozyten, insbesondere, CD8+ zytotoxischer T- und Natürliche Killer (NK)-Zellen nach Stimulation mit K562-Zellen (zur Stimulation von NK-Zellen) bzw. anti-CD3/CD28 (zur Stimulation von CD8+ CTL)	
<b>Referenzbereiche</b>	<b>CD107a Expression</b> <ul style="list-style-type: none"><li>• von allen ruhenden NK-Zellen nach K562 Stim.: &gt; 10%</li><li>• von allen aktiv. NK-Zellen nach K562 Stimulation: &gt; 20%</li><li>• von allen CD8+ T nach CD3/CD28 Stimulation: &gt; 10% bzw. MSFI: &gt; 2</li></ul> (Verschiebung der mittleren Fluoreszenzintensität im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle)	
<b>Zusätzliche Informationen</b>	<p>Zytotoxische CD8+ T-Zellen (CTL – cytotoxic T-lymphocytes) und Natürliche Killer (NK) Zellen eliminieren ihre Zielzellen durch polarisierte Freisetzung zytotoxischer Granula. Die Granula enthalten zytolytische Agenzien wie z.B. Perforin und Granzyme. Sie werden nach Target-Zell-Kontakt an die Zelloberfläche transportiert, wo nach Verschmelzung der Granula mit der Zellmembran die Freisetzung von Perforin und der Granzyme erfolgt.</p> <p>CD107a (LAMP-1) ist ein Membranprotein der zytolytischen Granula und kann nach Fusion der Granula mit der Zellmembran an der Zell-Oberfläche detektiert werden. Daher wird der Nachweis von CD107a auf der Zelloberfläche stimulierter Lymphozyten genutzt, um die Fähigkeit zytotoxischer Zellen zu untersuchen, ihre zytolytischen Granula freizusetzen.</p> <p>Diese Fähigkeit ist bei Patienten mit bestimmten Formen von hämophagozytischer Lymphohistiozytose (HLH, auch FLH: familiäre Lymphohistiozytose) gestört. Dieses</p>	

Krankheitsbild ist geprägt von einer unkontrollierten inflammatorischen Reaktion als immunologische Antwort auf eine meist virale Infektion. Durch Fehlen der zytotoxischen Funktion können virusinfizierte Zellen nicht effektiv eliminiert werden. Bei einem Ausfall der Zytotoxizität führt daher die persistierende Präsenz von Virusantigenen zu einer unkontrollierten Aktivierung der Immunreaktion ohne die Möglichkeit, die Infektion bleibend zu überwinden. Diese ungebremste Immunreaktion führt zu einer somatischen Systemreaktion mit hohem Fieber, Hepato-Splenomegalie, Zytopenie hohen Zytokinspiegeln im Blut und letztlich zum Multiorganversagen.

Abnorme Ergebnisse des CD107a Release-Assays wurden bislang bei folgenden Formen von HLH gefunden:

- Munc 13-4 Defekt (FLH 3)
- Syntaxin 11 Defekt (FLH4)
- Munc 18-2 Defekt (FLH 5)
- SH2D1A Mutation (SAP Defizienz, XLP 1 = X-linked Lymphoproliferatives Syndrom 1 – CD107a **erhöht**)
- Chediak-Higashi Syndrom (LYST Defizienz)
- Griscelli-Syndrom (RAB27A Defizienz)
- Hermansky Pudlack Syndrom II

Die Analyse der NK-Zellen erfolgt nach über Nacht Inkubation +/- Interleukin-2 zur Vorstimulation. Zur eigentlichen, mehrstündigen Stimulation werden am nächsten Tag K562 Zellen (Leukämie-Zell-Linie) verwendet, welche von den NK-Zellen als Target-Zellen erkannt werden, wodurch die zytotoxische Reaktion einschließlich der Freisetzung von Granula in Gang gesetzt wird. CTL werden für 2-5 Tage mit Phythämagglutinin vorstimuliert. Die Freisetzung von CD107a wird durch Restimulation mit magnetischen beads, die mit einer Kombination aus anti-CD3 (zur T-Zell Rezeptor Stimulation) und dem Costimulator anti-CD28 beladen sind, provoziert.