

Einfluss der Kryokonservierung auf die Immunantwort von Leukozyten

Lars Radke, Annika Lubitz, Christoph Giese, Marcus Frohme

Zusammenfassung

Die Messung von Zytokinen in Stimulationsexperimenten zur Bestimmung von Stärke und Umfang einer Immunreaktion werden in der Praxis häufig an kryokonserviertem Zellmaterial durchgeführt. Bisherige Untersuchungen zum Einfluss der Kryokonservierung auf die Zytokinexpression sind widersprüchlich. In den hier durchgeführten Experimenten wurden die Genexpression und/oder Sekretion der Zytokine IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-12, IL-13, GM-CSF, IFN- γ und TNF- α in frisch isolierten und kryokonservierten Immunzellen aus Blut (PBMC) eines gesunden Spenders bestimmt. Diese wurden mit den Immunsystem-aktivierenden Stoffen OKT-3 und Concanavalin A (Con A) stimuliert und für 4 bzw. 24 h kultiviert. Ein Vergleich der frisch-isolierten und kryokonservierten PBMC in Stimulationsexperimenten zeigt, (1) dass die Messung der Genexpression genauere Einblicke zu Beginn der einsetzenden Immunreaktion verschafft, als die Messung der ausgeschütteten Zytokine, (2) dass durch Einfrieren die Immunreaktion insbesondere zu diesem Zeitpunkt beeinflusst wird und (3) dass zu späteren Zeitpunkten die Konzentrationsbestimmung der Zytokine im Zellkulturüberstand das Mittel der Wahl ist.

Abstract

The measurement of cytokines in stimulation experiments with the aim to determine the strength and the complexity of an immune reaction is commonly carried out on cryopreserved cells. Previous studies, investigating the impact of cryopreservation on the cytokine expression, are inconsistent in their findings. Experiments conducted in this study determine the gene expression and/or secretion of IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-12, IL-13, GM-CSF, IFN- γ and TNF- α in freshly isolated and cryopreserved PBMC of a healthy donor. The cells were stimulated with the substances OKT-3 and Concanavalin A (Con A) and cultured for 4h and 24h. The comparison of freshly isolated and cryopreserved cells in stimulation experiments showed (1) that the measurement of the gene expression offers a more accurate insight into the immune-reaction at early timepoints than the measurement of the secreted cytokines; (2) that freezing of the cells affect the immune response at this early stage and (3) that at later points the measurement of secreted proteins is the method of choice.

1 Einführung

Die Untersuchung der Zytokinausschüttung ist Gegenstand von vielen Untersuchungen in der Medizin und klinischen Pharmakologie. Zytokine sind meist einfache Polypeptidketten oder Glykoproteine mit regulatorischer Wirkung, die von Leukozyten und einer Vielzahl anderer Körperzellen sekretiert werden. Zu ihnen zählen die Interleukine, die Interferone, Tumornekrosefaktoren, Chemokine und koloniestimulierende Faktoren. Die pleiotrope Wirkung der Zytokine umfasst eine Vielzahl von Effekten auf Zellen des Immunsystems, wie die Modulierung von Entzündungsreaktionen, des Zellwachstums und der Signalübertragung (Wilček 2003). Umfangreiche Zytokinprofile werden

erstellt, um beispielsweise die Menge an Entzündungsmarkern im Körper eines Patienten festzustellen oder die Natur von Autoimmunerkrankungen zu verstehen. Auch der Einfluss von chronischen Erkrankungen auf das Immunsystem oder die Wirkungsweise von neuentwickelten Impfstoffen (Lalor et al. 2010; García-Piñeres et al. 2007) kann mit derartigen Zytokinprofilen untersucht werden. Für solche Anwendungen werden die Immunzellen des Bluts, sogenannte PBMCs (Peripheral Blood Mononuclear Cells, engl. für mononukleäre Zellen des peripheren Bluts) von kranken oder gesunden Spendern extrahiert und mit bestimmten Wirkstoffen stimuliert (Silva et al. 2010; Fan et al. 1998). In diesem Zusammenhang ist die Kryokonservierung eine häufig genutzte Technik, um Probenmaterial für den späteren

Gebrauch in umfangreicheren Vergleichsstudien zu konservieren und zu lagern. Durch die Kryokonservierung können jedoch Eigenschaften der Zelle ungewollt beeinflusst werden. Da die Immunantwort aus einem Zusammenspiel verschiedener Zellarten entsteht, ist es äußerst wichtig, dass deren Verhältnis zueinander nicht beeinflusst wird. Dies konnte von Jeurink et al. (2008) und Allsopp et al. (1998) für T-Zellen, B-Zellen, NK-Zellen und Monozyten in PBMC gezeigt werden. Zwar wurde eine Verringerung der Aktivität von NK-Zellen nach dem Einfrieren festgestellt, jedoch konnte diese wiedererlangt werden, wenn die Zellen nach dem Auftauen für mehrere Stunden ruhen gelassen wurden (Fujiwara et al. 1986). Auch das Verhältnis von aktivierten CD4+ und CD8+ T-Zellen nach einer Stimulation zeigte keine Unterschiede durch Kryokonservierung, mit Ausnahme von Stimulation mit Con A, bei der eine zeitliche Verzögerung der Aktivierung festgestellt wurde (Jeurink et al. 2008; Sleasman et al. 1997). Die Proliferation von PBMC ist unverändert in ihrem zeitlichen Ablauf, aber in ihrer Kapazität leicht herabgesetzt (Jeurink et al. 2008).

Insbesondere die Viabilität wird durch Kryokonservierung beeinflusst, wobei nicht die Dauer der Kryokonservierung und die Art des Auftauens Einfluss auf die Zellviabilität haben (Kvarnström et al. 2004), sondern allein die Einfrieremethode. Insbesondere die Temperatur des Einfriermediums scheint die Überlebensrate stark zu beeinflussen (Kreher et al. 2003). In der Literatur finden sich Viabilitätsraten von bis zu 98 % (Venkataraman 1997) nach dem Auftauen, welche aber mit der relativ unsensitiven Trypanblaufärbung erhalten wurden. Bei der Nutzung von sensitiveren Viabilitätstests, wie zum Beispiel Annexin V und Propidium Iodid, welche auch frühe Phasen von Apoptose und Nekrose aufzeigen, sind direkt nach dem Auftauen nur noch 85 % der Zellen, bzw. 50 % nach Stimulation vital. Insbesondere bei Stimulation ist die Viabilität frischer Zellen deutlich höher (Jeurink et al. 2008). Um die gleiche Anzahl an aktiven Zellen zu verwenden, ist es daher essentiell, möglichst sensitive Viabilitätstests zu verwenden. Untersuchungen der Zytokinproduktion sind daher stark abhängig von der Methode und dem experimentellen Aufbau. Kreher et al. (2003) und Jeurink et al. (2008) zeigen keine Unterschiede zwischen der Stimulation frischer und kryokonservierter PBMC gesunder Spender bei der Sekretion von IL-2, IL-4, IL-5 und IFN- γ bzw. IL-4, IL-10, IL-12, IL-13 und TNF- α nach Kryokonservierung. Venkataraman (1997) hingegen

zeigt für verschiedene Zytokine gesunder Spender signifikante Unterschiede. Des Weiteren lässt sich ein besonders starker Einfluss der Kryokonservierung sowohl auf RNA also auch auf Proteinebene beobachten, wenn PBMC verschiedener Patientengruppen (Multiple Sklerose, Allergien und Schwangerschaft) verwendet werden (Kvarnström et al. 2004). Uneinheitliche oder widersprüchliche Studienergebnisse entstehen offenbar durch den Einsatz unterschiedlicher Zellen, Stimulanten und Untersuchungsmethoden.

Das Ziel dieser Arbeit war es, nach Stimulation Unterschiede in der Zytokinproduktion zwischen frisch-isolierten und kryokonservierten PBMC eines gesunden Spenders zu bestimmen. Hierzu wurde die Genexpression von vier Schlüsselzytokinen (Interleukin 2 (IL-2), IL 4, Interferon-gamma (IFN- γ) und Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- α)) untersucht. Letztere sind typische Vertreter für die Bestimmung von Entzündungsprozessen, wohingegen IL-2 die zelluläre und IL-4 die humorale Immunantwort abbildet. Zusätzlich zu diesen vier Zytokinen wurde die Sekretion von fünf weiteren Zytokinen (IL-5, IL-10, IL-12, IL-13 und Granulozyten Makrophagen – Kolonie-stimulierender Faktor (GM-CSF)) untersucht. Die Stimulation der PBMC erfolgte mit einem therapeutischen monoklonalen anti-CD3-Rezeptor-Antikörper (OKT-3) und Concanavalin A (ConA), einem Lectin, welches in der Lage ist, spezifisch an Kohlenhydrate auf der Oberfläche von Zellmembranen zu binden. Beide Substanzen werden als Standardstimulanten in vielen Untersuchungen eingesetzt und sind gut untersucht. Die Analyse der mRNA und der Zellkulturüberstände erfolgte nach einer Kultivierungszeit von 4 h bzw. 24 h, um die einsetzende und die fortschreitende Immunantwort bewerten zu können. Die Messung der Genexpression erfolgte mit RT-qPCR (reverse Transkription quantitative Polymerase Kettenreaktion) und wurde mit einem Lightcycler 480 qPCR System (Roche) durchgeführt. Die Messung der Zytokine im Zellkulturüberstand erfolgte mittels Bead-basierter Multiplextechnologie mit einem BioPlex-200 System (BioRad).

2 Material und Methoden

Zellen und Zellkulturüberstände aus Stimulationsexperimenten wurden von der ProBioGen AG (Berlin) bereitgestellt. PBMC eines gesunden Spenders wurden aus Vollblut durch Dichtegradientenzentrifugation

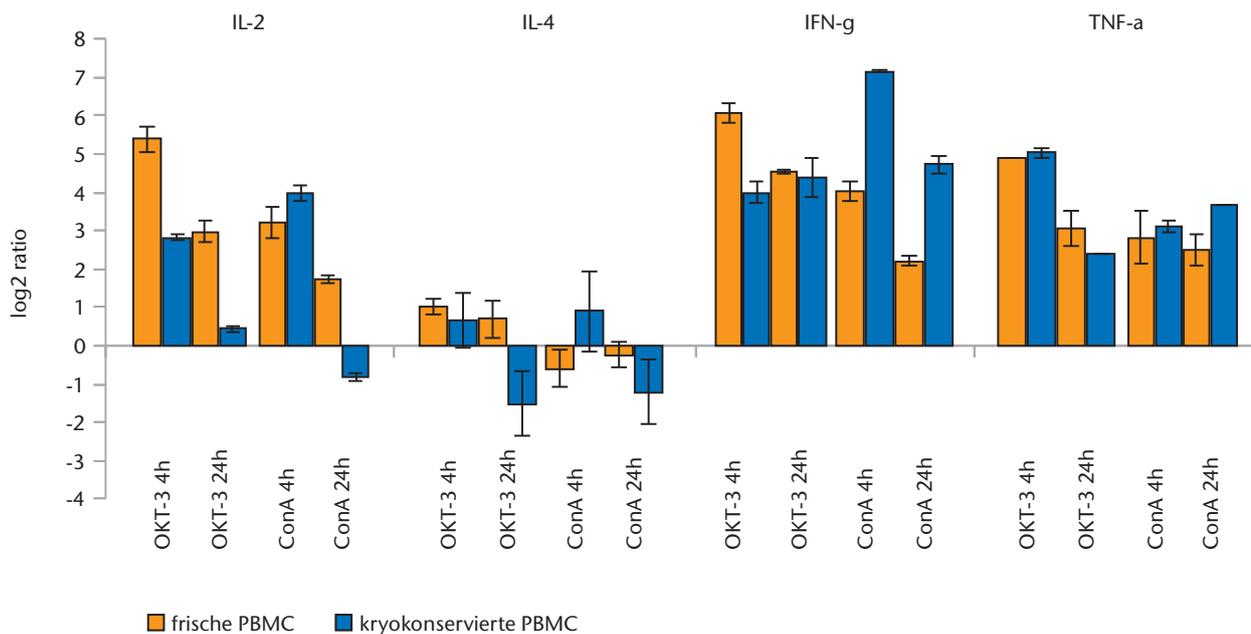


Abb. 1: Genexpressionsraten (bestimmt mit RT-qPCR) von IL-2, IL-4, IFN- γ und TNF- α in frisch isolierten und kryokonservierten Zellen nach 4 und 24 Stunden Kultivierung. Die PBMC wurden mit OKT-3 und Con A stimuliert. Die Genexpressionswerte sind als Logarithmen zur Basis 2 dargestellt (ein Faktor von 1 stellt eine Verdopplung der Genexpression dar, 7 bedeutet ein Anstieg um den Faktor 128 gegenüber dem Referenzgen PBGD).

extrahiert und in zwei Aliquots getrennt. Ein Aliquot wurde als frisches Material stimuliert und kultiviert, das zweite Aliquot wurde für die Kryokonservierung in Kältemedium (60 % RPMI (Roswell Park Memorial Institute Medium) 1640, 30 % FCS (Fetales Kälberserum) und 10 % DMSO (Dimethylsulfoxid)) resuspendiert und in vorgekühlten (4 °C), mit Isopropyl Alkohol (IPA) gefüllten, Kryocontainern platziert. Das Einfrieren erfolgte über Nacht in einem -80 °C Tiefkühlschrank. Danach wurden die Zellen in einer Stickstoff-Dampfphase eingelagert.

Kryokonservierte PBMC wurden aufgetaut und ruhten für einen Tag bei 37 °C und 5 % CO₂. Diese Ruhezeit wurde ebenfalls für die frischen Zellen eingehalten. Die Kultivierung und Stimulation erfolgte in 24well Platten in 1 ml RPMI mit 10 % FCS. Con A (Sigma) wurde in einer Konzentration von 2 μ g/ml und OKT-3 (Muromonab-CD3; Novartis Pharma) in einer Konzentration von 50 ng/ml eingesetzt. Die Ernte der Zellkulturüberstände und Zellen erfolgte nach 4 bzw. 24 h. Die RNA wurde aus den Zellen isoliert (RNeasy® Plus Mini Kit; Qiagen), auf ihre Qualität kontrolliert (2100 Bioanalyzer; Agilent) und revers transkribiert (Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit; Roche). Diese Methoden und die durchgeführte RT-qPCR sind an anderer Stelle ausführlich beschrieben (Radke et al. 2011).

Die Messung der Zytokine im Zellkulturüberstand erfolgte mit einem Suspension Array System (BioPlex-200, BioRad) mit einem kommerziell erhältlichen Assay (Bio-Plex Human Cytokine Th1/Th2 Panel, BioRad). Die Durchführung erfolgte nach dem Herstellerprotokoll. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit der Software BioPlex Manager 6.0.

3 Ergebnisse

Kryokonservierte und frische Zellen wurden mit Con A und OKT-3 stimuliert und für 4 bzw. 24 Stunden kultiviert. Die Genexpression von IL-2, IL-4, IFN- γ und TNF- α wurde mit Hilfe von RT-qPCR bestimmt, um Unterschiede in der Aktivierung des Immunsystems zu detektieren (Abb. 1). Nach der Stimulation mit OKT-3 zeigten die frischen Zellen höhere oder gleiche Expressionsraten wie kryokonservierte Zellen. Bei der Stimulation mit Con A zeigt sich ein umgekehrtes Verhalten: Mit Ausnahme von IL-2 und IL-4 nach 24-stündiger Kultivierung sind die Expressionswerte der kryokonservierten höher als die der frisch isolierten Zellen.

Die Messung der Zytokine im Zellkulturüberstand erfolgte mittels Bead-basiertem Immunofluoreszenzassay. Nach vierstündiger Kultivierung ließen sich nur die Zytokine IL-2, IL-10, GM-CSF, IFN- γ und TNF- α

nachweisen (Abb. 2). Konzentrationsunterschiede, die sich zu diesem Zeitpunkt zwischen kryokonservierten und frisch isolierten Zellen feststellen ließen, sind kongruent mit den unterschiedlichen Transkriptionsraten der im Genexpressionsexperiment untersuchten Zytokine.

Nach 24 h erweiterte sich das Spektrum an nachweisbaren Zytokinen um IL-5 und IL-13 für beide Stimulationen und zusätzlich um IL-4 und IL-12 bei Stimulation mit OKT-3. Außer für TNF- α und IL-12 lassen sich nahezu die gleichen Konzentrationen feststellen, unabhängig davon, ob die Zellen eingefroren wurden oder nicht. Um den Korrelationsgrad der Zytokinkonzentrationen im Zellkulturüberstand mit und ohne Kryokonservierung zu bestimmen, wurde das Bestimmtheitsmaß von linearen Regressionsgeraden berechnet. Dieses Maß steigt von der 4 h-Kultur zur 24 h-Kultur für die OKT-3

Behandlung von 0,88 auf 0,95 und für Messwerte der Con A-Stimulation von 0,51 auf 0,97. Die Werte nahe 1,0 entsprechen einer nahezu perfekten Korrelation. Dies bedeutet, dass für späte Messwerte, also nach andauernder Zytokinsekretion, der Einfluss einer zurückliegenden Konservierung an Bedeutung verliert.

4 Diskussion

Die hier durchgeführten Untersuchungen wurden im Rahmen des Projekts »Potenzierung von Impfstoffen durch gezieltes Design der Glykosylierung« (IPoGly) durchgeführt. Hintergrund dieses Projektes, welches an der TH Wildau in Zusammenarbeit mit der Beuth Hochschule und mehreren anderen Berliner Partnern (u. a. ProBioGen AG) durchgeführt wird, ist die Entwick-

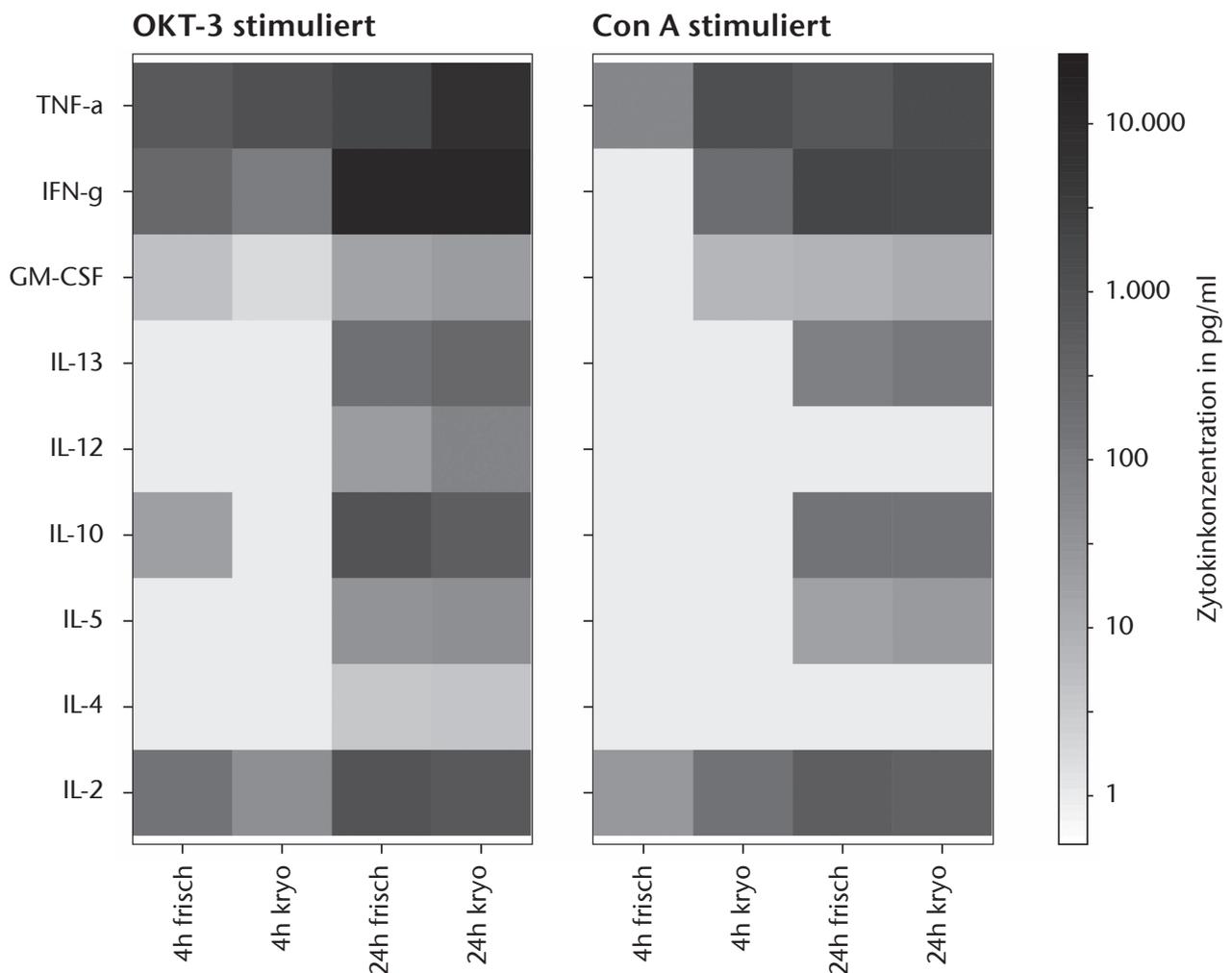


Abb. 2: Heatmap der Zytokinekonzentration im Zellkulturüberstand nach 4- und 24-stündiger Kultivierung von OKT-3 und Con A stimulierten PBMC. Die Daten wurden mittels Bead-basiertem Suspensionsarray System gemessen. Unterschiede zwischen kryokonservierten (kryo) und frischen (frisch) Zellen sind nach 24-stündiger Kultivierung vernachlässigbar.

lung einer Impfstoffentwicklungsplattform anhand des Respiratorischen Synzytial Virus (RSV). Dabei werden rekombinant hergestellte Impfstoffkandidaten anhand ihrer Fähigkeit, das Immunsystem zu stimulieren, bewertet. In diesem Zusammenhang wurde untersucht, welchen Effekt die Kryokonservierung auf die Bildung einer Immunantwort von in vitro stimulierten PBMC hat. Dabei konnten insbesondere für die beginnende Immunreaktion substanzspezifische Effekte auf der Ebene der Genexpression festgestellt werden. So zeigten frisch isolierte PBMC nach Stimulation mit OKT-3 eine höhere Transkription der untersuchten Gene, wohingegen Con A höhere Werte in den kryokonservierten Zellen erzeugte. Beide Substanzen aktivieren das Immunsystem auf unterschiedliche Weise. OKT-3 ist gegen den CD3-Komplex auf der Oberfläche von T-Lymphozyten gerichtet, welcher Bestandteil des T-Zell-Rezeptors ist und der intrazellulären Aktivierung dient. Als therapeutischer Antikörper wird er als Immunsuppressivum beispielsweise bei Organtransplantationen verwendet. Durch hohe Dosen oder längere Exposition kann jedoch auch eine Aktivierung des Immunsystems hervorgerufen werden (Parleviet et al. 1995). Con A ist ein Lectin (Kohlenhydrat-bindendes Molekül), welches als Mitogen wirkt und unspezifisch T-Zellen aktiviert. Obwohl beide Substanzen das Immunsystem über T-Zellen aktivieren, scheint die Kryokonservierung die Geschwindigkeit, mit welcher die Immunantwort formuliert wird, unterschiedlich zu beeinflussen.

Die Messung der Zytokine im Zellkulturüberstand zeigt für den frühen Zeitpunkt eine hohe Korrelation der Genexpression und der Menge an sekretierten Proteinen; im Verlauf bis zum 24 Stunden Zeitpunkt nimmt dieser Bezug ab. Gleichzeitig lassen sich zu diesem Zeitpunkt für die meisten untersuchten Zytokine nur noch sehr geringe Konzentrationsunterschiede zwischen kryokonservierten und frischen Zellen beobachten. Die größten Abweichungen finden sich bei IL-12 und TNF- α , welche beide von ursprünglich kryokonservierten Zellen etwa dreimal so stark sekretiert werden wie von frischen Zellen. Eine höhere TNF- α Produktion bei kryokonservierten PBMC wurde schon in anderen Studien in ähnlicher Größenordnung nachgewiesen (Venkaraman 1997).

Andere Studien, die den Einfluss von Kryokonservierung untersuchen, zeigen uneinheitliche und teilweise sogar widersprüchliche Ergebnisse. Diese Abweichungen entstehen offenbar durch Unterschiede beim Einfrierprozess, der Kultivierungsmethode,

den verwendeten Medien und Zellen, der Stimulation und den verwendeten Nachweismethoden. Weitere Schwankungen entstehen durch das verwendete Spendermaterial. Nicht in allen Studien werden der Zustand des Immunsystems untersucht oder Vorerkrankungen ausgeschlossen. Zudem können verdeckte chronische Erkrankungen die Immunantwort in vielfältiger Weise beeinflussen. So kann die Produktion einzelner oder mehrerer Zytokine stark herauf- oder herabgesetzt werden oder die Bildung der Immunantwort zeitlich stark beschleunigt oder verlangsamt werden.

Der Vergleich unserer Messdaten mit den Ergebnissen früherer Untersuchungen mit kryokonservierten PBMC und gleichem experimentellen Aufbau (Radke et al. 2009) zeigt eine hohe Übereinstimmung der ermittelten Proteinmesswerte. Die geringen Abweichungen lassen sich auf die Interassay-Variation und natürliche spenderbedingte Schwankungen zurückführen. Die hier beschriebene Methode zur Durchführung von Stimulationsexperimenten mit kryokonservierten PBMC weist somit eine hohe Reproduzierbarkeit und Stabilität auf.

In unserem experimentellen Ansatz kommt es zwar zu Beginn der Immunreaktion zu Unterschieden der Geschwindigkeit, mit der die Immunantwort einsetzt, nach 24 Stunden jedoch lassen sich im Zellkulturüberstand von kryokonservierten und frischen Zellen ungefähr gleiche Zytokinkonzentrationen nachweisen. Kryokonservierte PBMC eignen sich somit im vollen Maße für Stimulationsexperimente, ähnlich dem hier beschriebenen Ansatz. Die Messung der Genexpression ist gut nutzbar, um das Einsetzen der Immunreaktion zu beobachten sowie deren Ausmaß abzuschätzen (Radke et al. 2010). Für die Untersuchung der fortlaufenden Immunreaktion hingegen ist die Bestimmung der Zytokine im Zellkulturüberstand als Nachweismethode am besten geeignet.

Literatur

- Allsopp, C. E., Nicholls, S. J., Langhorne, J. (1998): A flow cytometric method to assess antigen-specific proliferative responses of different subpopulations of fresh and cryopreserved human peripheral blood mononuclear cells. *J. Immunol. Methods* 214, 175-186.
- Fan, J., Nishanian, P., Breen, E. C., McDonald M., Fahey, J. L. (1998): Cytokine gene expression in normal human lymphocytes in response to stimulation. *Clin Diagn Lab Immunol* 5, 335-40.
- Fowke, K. R., Behnke, J., Hanson, C., Shea, K., Cosentino, L.M. (2000): Apoptosis: a method for evaluating the cryopreservation of whole blood and peripheral blood mononuclear cells. *J. Immunol. Methods* 244, 139-144.

- Fujiwara, S., Akiyama, M., Yamakido, M., Seyama, T., Kobuke, K., Hakoda, M., Kyoizumi, S., Jones, S.L. (1986): Cryopreservation of human lymphocytes for assessment of lymphocyte subsets and natural killer cytotoxicity. *J. Immunol. Methods* 90, 265-273.
- García-Piñeres, A., Hildesheim, A., Dodd, L., Kemp, T. J., Williams, M., Harro, C., Lowy, D. R., Schiller, J. T., Pinto, L. A. (2007): Cytokine and chemokine profiles following vaccination with human papillomavirus type 16 L1 Virus-like particles. *Clin Vac Immunol (CVI)* 14, 984-9.
- Jeurink, P. V., Vissers, Y. M., Rappard, B., Savelkoul, H. F. J. (2008): T cell responses in fresh and cryopreserved peripheral blood mononuclear cells: Kinetics of cell viability, cellular subsets, proliferation, and cytokine production. *Cryobiology* 57, 91-103.
- Kreher, C. R., Dittrich, M. T., Guerkov, R., Boehm, B.O., Tary-Lehmann, M. (2003): CD4+ and CD8+ cells in cryopreserved human PBMC maintain full functionality in cytokine ELISPOT assays. *J. Immunol. Methods* 278, 79-93.
- Kvarnström, M., Jenmalm, M., Ekerfelt, C. (2004): Effect of cryopreservation on expression of Th1 and Th2 cytokines in blood mononuclear cells from patients with different cytokine profiles, analysed with three common assays: an overall decrease of interleukin-4. *Cryobiology* 49, 157-168.
- Lalor, M. K., Smith, S. G., Floyd, S., Gorak-Stolinska, P., Weir, R. E., Blitz, R., Branson, K., Fine, P. E., Dockrell, H. M. (2010): Complex cytokine profiles induced by BCG vaccination in UK infants. *Vaccine* 28, 1635-41.
- Parlevliet, K. J., Bemelman, F. J., Yong, S. L. (1995): Toxicity of OKT3 increases with dosage: a controlled study in renal transplant recipients. *Transplant Int* 8, 141-6.
- Radke, L., López Hemmerling, D. A., Lubitz, A., Giese, C., Wildenauer, F.-X., Frohme, M. (2009): Etablierung verschiedener Bead-basierter Multiplexmethoden mit einem Suspensions-Array-System für molekular diagnostische Zwecke. *Wissenschaftliche Beiträge der TFH Wildau, 2009|2010*, 6-12.
- Radke, L., López Hemmerling, D. A., Lubitz, A., Giese, C., Frohme, M. (2010): Prediction of cytokine release using gene expression profile analysis. *Chimica Oggi/Chemistry Today*, 28 (Oktober), 2-4.
- Radke, L., López Hemmerling, D. A., Lubitz, A., Giese, C., Frohme, M. (2011): Induced cytokine response of human PMBC-cultures: Correlation of gene expression and secretion profiling and the effect of cryopreservation. *Cellular Immunology*, (im Druck).
- Silva, M. L., Martins, M. Â., Espírito-Santo, L. R., Ribeiro, J. G. L., Homma, A., Geessien Kroon, E., Teixeira-Carvalho, A., Elói-Santos, S. M., Martins-Filho, O. A. (2010): Major sources of pro- and anti-inflammatory cytokines in the complex network of innate and adaptive immunity in adults volunteers after 17DD yellow fever first-time vaccination. *Vaccine* 29, 1-10.
- Sleasman, J. W., Leon, B. H., Aleixo, L. F., Rojas, M., Goodenow, M. M. (1997): Immunomagnetic selection of purified monocyte and lymphocyte populations from peripheral blood mononuclear cells following cryopreservation. *Clin Diagn Lab Immunol* 4, 653-658.
- Venkataraman, M. (1997): Effects of cryopreservation of immune responses. XI. Heightened secretion of tumor necrosis factor-alpha by frozen human peripheral blood mononuclear cells. *Cryobiology* 34, 276-283.
- Wilček, J. (2003): Chapter 1 Introduction. In: A. W. Thomson, M. T. Lotze (Eds.), *The Cytokine Handbook Volume 1 Fourth Edition*. Academic Press, San Diego, 40-56.

Autoren

Lars Radke, MSc. (korrespondierender Autor)
Labor für Molekularbiologie und Funktionelle Genomik
Technische Hochschule Wildau [FH]
lradke@th-wildau.de

Dr. Christoph Giese
Director Cell and Tissue Services and Quality Control
ProBioGen AG, Berlin
Goethestraße 54, 13086 Berlin
T +49 30 924006-0

Dipl.-Ing. Annika Lubitz
Cell And Tissue Services
ProBioGen AG, Berlin
Goethestraße 54, 13086 Berlin
T +49 30 924006-0

Prof. Dr. Marcus Frohme
Labor für Molekularbiologie und Funktionelle Genomik
Technische Hochschule Wildau [FH]
T +49 3375 508-249
marcus.frohme@th-wildau.de