IMMUNOLÓGIAI ÉS BIOTECHNOLÓGIAI INTÉZET

10. Praktikum: Kurz- und Langzeit Zellkulturen, funktionelle Tests

Grundlagen der Immunologie

Universität Pécs, Klinisches Zentrum
Institut für Immunologie und Biotechnologie

Pécs, 2026.

Hauptphasen medizinischer Forschung



In vitro
Experiment

Einfach zu **Standardisieren** und Reproduzieren

Mechanismen in lebenden Organismen sind basierend auf diese Daten nur schwer schätzbar



In vivo
Tierexperiment

Krankheiten können in komplexen Organismen **modelliert** und Medikamente getestet werden

Results cannot be directly extrapolated to humans



Klinische Studie

Bietet die **relevantesten** medizinischen Daten

Schwer durchzuführen (ordentliche Proben bekommen, Ethische Probleme, etc.)

Einführung in Zell- und Gewebskultivierung [1.]

- Warum ist es notwendig?
  - Falls möglich: reduziert die Zahl der Tierexperimente
  - Experimentumgebung ist leicht kontrollierbar. (z.B. Zellzahl, Medium, Temperatur, Konzentration der untersuchten Substanz, Inkubationszeit, usw.)
- Klassifikation:



Zellkultur

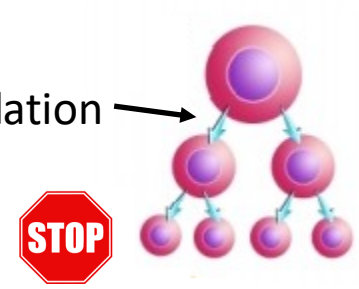
vs.



Gewebe oder Organkultur

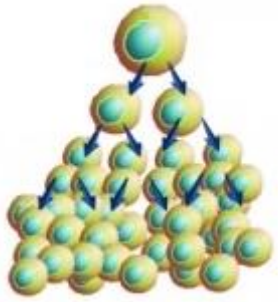
Stimulation

Begrenzte Zellteilung



Kurzweilige Zellkultur (z.B. normale Zellen aus einer Biopsie)

vs.



Unbegrenzte Zellteilung

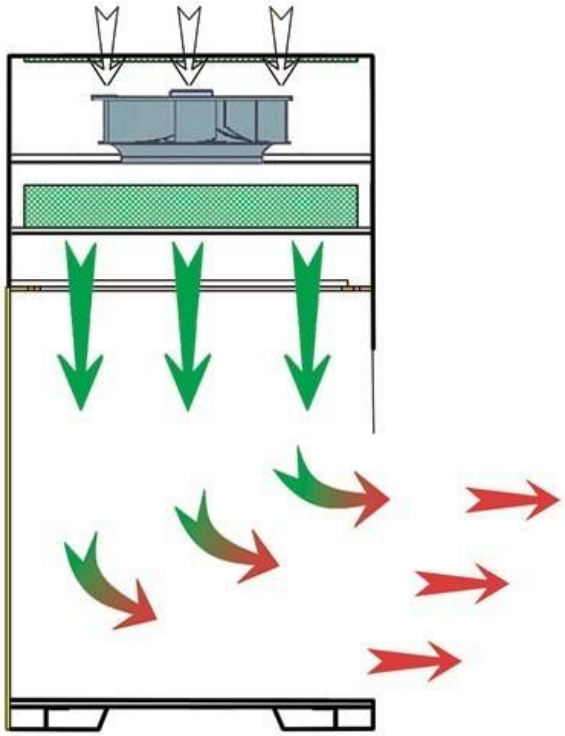
Langzeit Zellkultur (z.B. kanzeröse Zelllinie)

Zellkultivierung

- Muss unter sterilen Bedingungen durgeführt werden! → Kontaminierung (vor allem Mikroorganismen) macht das Experiment unkontrollierbar.
  - Zellmanipulation unter der sterilen Haube
  - Sterile Werkzeuge und Ausrüstung (z.B. Pippettenspitzen, Petrischalen, usw.)
  - Antibiotika im Zellkulturmedium
- Zellen werden im **Zellkultivierungsmedium** gehalten, die alle benötigten **Nährstoffe** enthalten (Kohlenhydrate, Aminosäuren, Nukleinsäuren, Vitamine, Hormone, Wachstumsfaktoren, etc.) und ein **optimalen pH** haben.
- **Inkubatoren** werden für Kurzzeitlagerung genutzt und bieten konstante:
  - Temperatur (≈ 37 °C)
  - Luftfeuchtigkeit (≈ 90 %)
  - CO2 Gehalt (≈ 5-6 %)
- Langzeitlagerung (Jahre, Jahrzehnte) der Zellen ist in **Flüssigstickstoff** möglich. Anwendungen:
  - Erhalt der Fertilität in Krebspatienten die Chemotherapie bekommen.[2.]
  - Lagerung hämatopoetischer Stammzellen aus der Nabelschnur (aufgrund von Kontroversen keine Routine[3, 4.])

Zellkultiviering: Sterile Haube

Sicherheitswerkbanken bieten eine sterile Umgebung durch einen konstanten, monodirektionalen, gefilterten Luftstrom.





Im fall der oben gezeigten schematischen Haube durchtritt Luft erst einen **HEPA Filter** (High Efficiency Particulate Air). Gefilterte, sterile Luft strömt dann von oben nach unten und verlässt die Haube durch die Öffnung. Das genaue Design ist variable und ist vom Hersteller abhängig.

Häufig genutzt Kulturmedien



RPMI
(Roswell Park Memorial Institut)

Hauptsächlich zur Kultivierung von **Lymphoiden** und **Hybridom Zellen**.



DMEM
(Dulbecco's Modified Eagle's Medium)

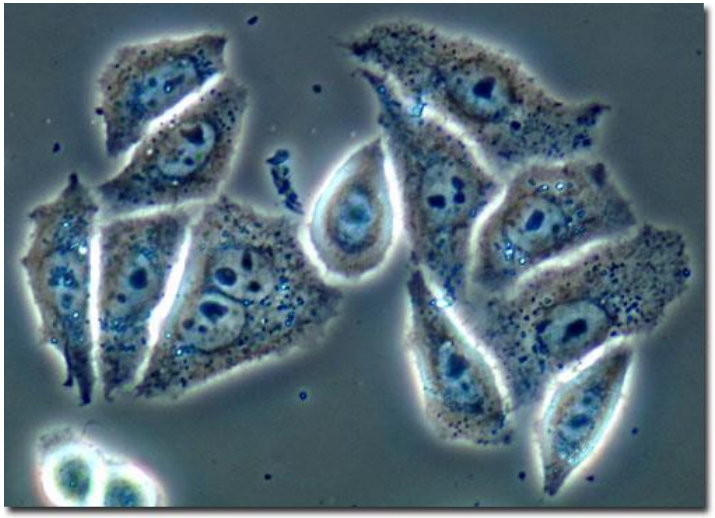
Ein häufiger genutztes Medium dass zur Kultivierung **verschiedener Zelltypen** geeignet ist. (Fibroblasten, Muskelzellen, Gliazellen, Nervenzellen, etc.)

Sie enthalten normalerweise Phenol rot **Indikator**. → Gebrauchte Medien die saure Abfallprodukte enthalten verfärben sich gelb, während Medien mit alkalischem pH lila sind.

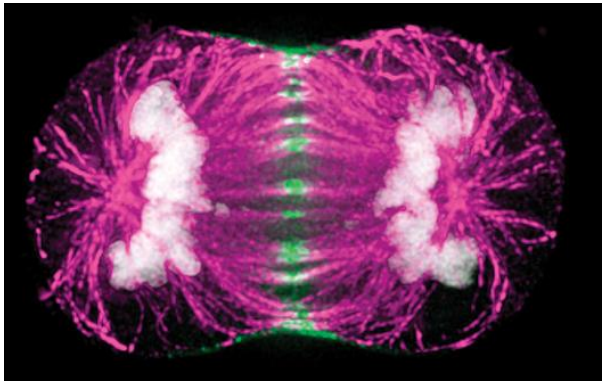
Zelllinien 1.

1. HeLA Zelllinie

- Die **erste** kanzeröse Zelllinie die in 1951 etabliert wurde.[5.]
- Ursprung: Isoliert aus einem Zervixkarzinom (Zervixadenokarzinom) der 31 jährigen **He**nrietta **La**cks die kurz darauf im selben Jahr verstarb.
- Die Zelllinie wurde ohne ihre Erlaubnis etabliert, was zu ethischen Problemen führte als das gesamte Genom der HeLa Zellen 2013 veröffentlicht wurde.[6.]
- Noch immer eine der **am meisten genutzten** Zellinien in der Forschung.



HeLA Zellen



Teilende HeLA Zelle

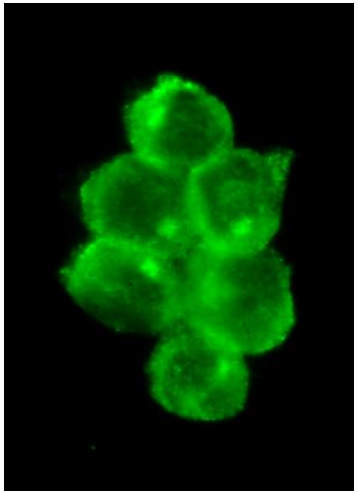


Henrietta Lacks
(1920-1951)

Zelllinien 2.

2. Jurkat Zellen

- Kanzeröse T Zelllinie aus dem peripherischen Blut eines 14 jährigen Patienten (JM) mit acuter lymphoblastischer Leukämier (ALL) in den 70ern isoliert .[7.]
- Wird zur untersuchung von Zellsignalen in T Zellen, erforschung der auf T Zellen basierenden Leukämien und der Mechanismen der HIV Infektion genutzt.



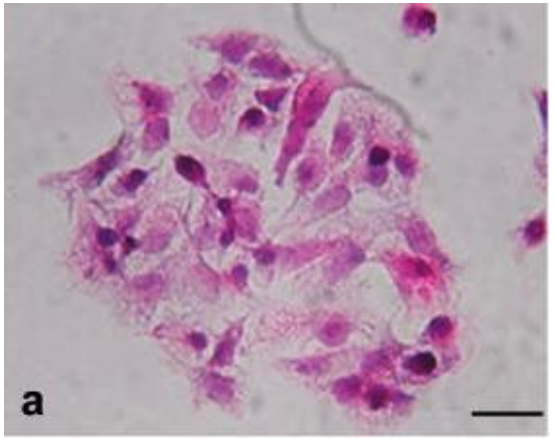
Eine Gruppe Jurkat Zellen

3. Raji Zellen

- Kanzeröse B Zellline die von einem 11 jährigen Patienten mit einem Burkitt Lymphom 1963 in Nigeria isoliert wurde.[8.]
- Es ist EBV positiv, Der Virus hat sich in das Genom integriert. [9.]
- Häufig als Wirt für Transfektion genutzt.

4. HepG2 Zellen

- Aus einem Leberkarzinom (Hepatozelluläres Karzinom) eines 15 Jahre alten Patienten isoliert.[10.]



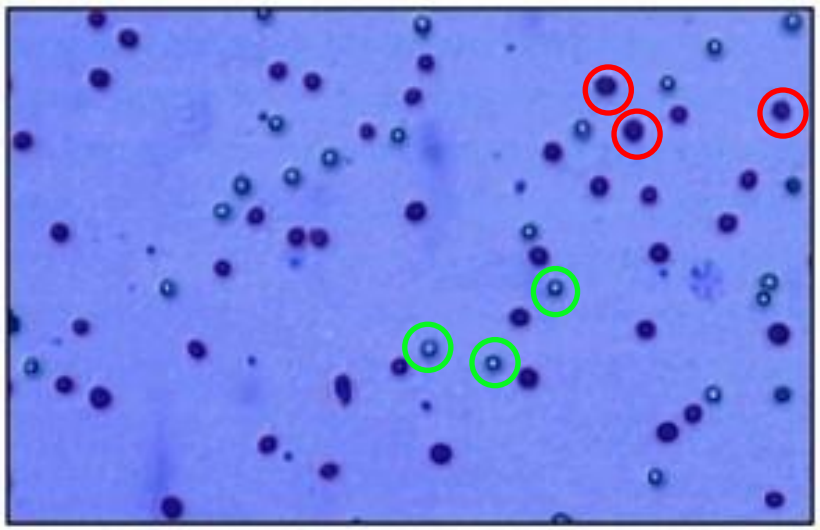
HepG2 cells

5. Sp2 Zellen

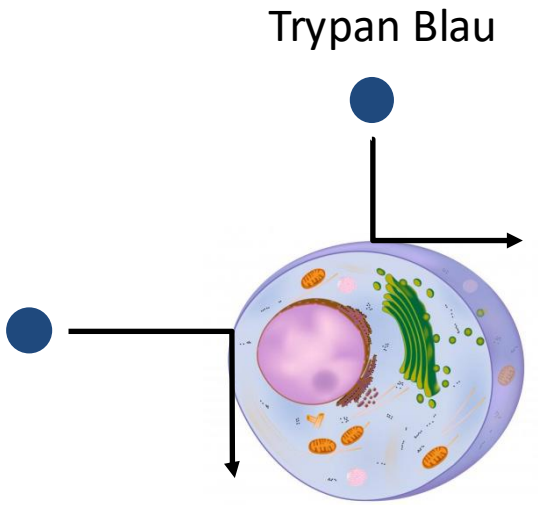
- Nicht-sekretorische Maus-Myelom Zelllinie die zum erstellen von Hybridomen genutzt wird.[11.] → siehe 3. Praktikum

Bestimmung der Zelllebensfähigkeit

- Normalerweise mit **Färbemittel Ausschluss Tests** wie:
  - **Trypan Blau**
  - 7-Aminoactinomycin D
  - Propidium-Iodid
- Lebende Zellen neigen dazu Xenobiotika durch active Mechanismen (z.B. Efflux) loszuwerden.



Lebende Zellen **Tote Zellen**

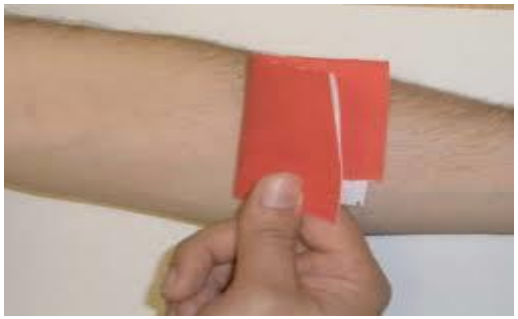


Lebende Zelle

Funktionelle Tests der Phagozyten

- **Isolation**: Zellen adhärieren normalerweise an Glas oder Plastikoberflächen.
- **Migration**: Testen der spontanen oder gesteuerten (Chemotaxis) Zellmigration in vitro oder in vivo. (z.B. Skin Window Test - Hautfenstertest)
- **Phagozytose** :
  - Nicht-opsonisiert
  - Opsonisiert (z.B. mediiert durch Fc Rezeptoren oder Komplementrezeptoren)
- **Oxidativer burst** und **phagozytotische Enzyme**:
  - Nitroblau Tetrazolium (NBT) Test, Myeloperoxidase (MPO) Test, alkalische Phosphatase Test, Lysozym Test, usw.
- **Testen der Zytokin Produktion**:
  - ELISA, ELISPOT
  - CBA (Cytometric Bead Array): Eine Multiplex durchflusszytometrische Methode die auf die Nutzung von Mikroperlen basiert

Skin window test[12.]



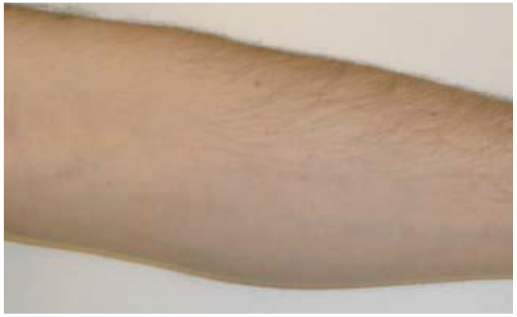
1. Die **oberste Schicht der Haut wird auf** der volaren Oberfläche des Arms **entfernt**. (Ziel: Kapillaren ohne Blutung visualisieren)



Hautfenster am Arm

2. Ein **Filterpapier** wird auf die Läsion gelegt. Abhängig vom Experiment kann es **Chemokine** enthalten (z.B. IL-8)
3. Die Zellen die zur Läsion migrieren **verlassen die Zirkulation** und gehen in das Filterpapier.
4. Schlussendlich wird das Filterpapier entfernt und die **Zelluläre Zusammensetzung** untersucht.

Anwendung: **In vivo Untersuchung der Zellmigration**, z.B. Vergleich der Zellmigration in gesunden Freiwilligen und Patienten mit autoimmunen Störungen, usw.



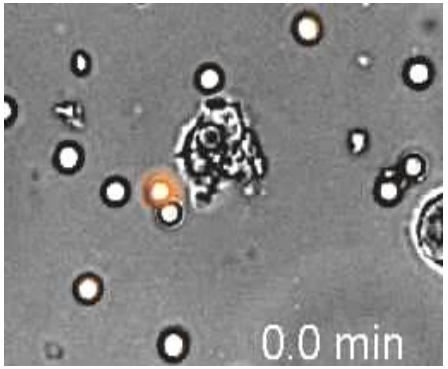
Die Läsion heilt innerhalb einiger Tage ohne Narbenbildung.

Phagozytose Test

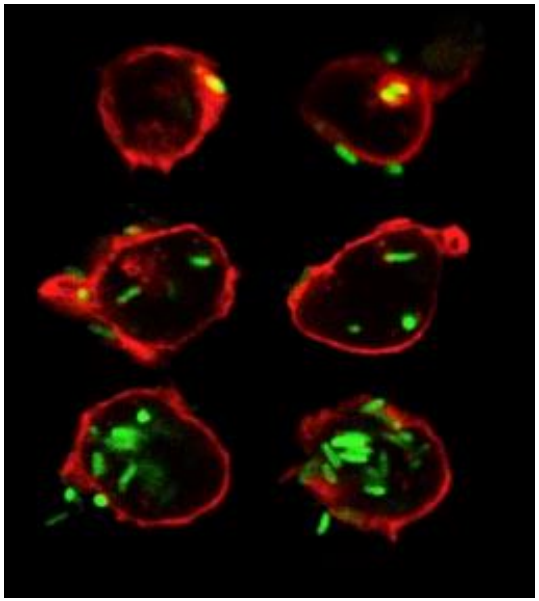
Methode:

• **Markierte Partikel** (z.B. Bakterien) werden mit Phagozyten inkubiert.

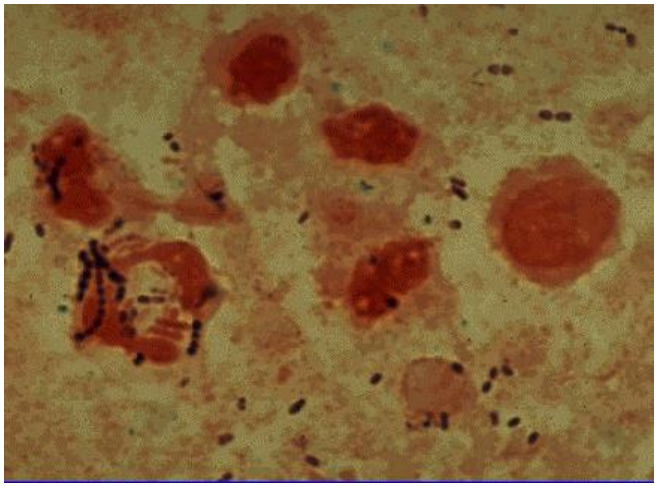
• Phagozytose wird dann unter einem Mikroskop oder mit Durchflusszytometrie untersucht (letzteres→5. Praktikum)



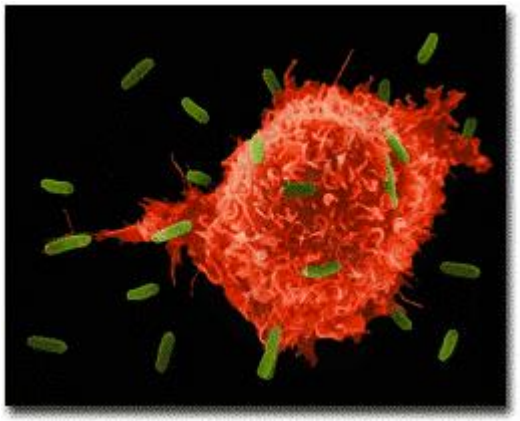
Video: Ein neutrophiler Granulozyt nimmt mehrere Konidien auf.



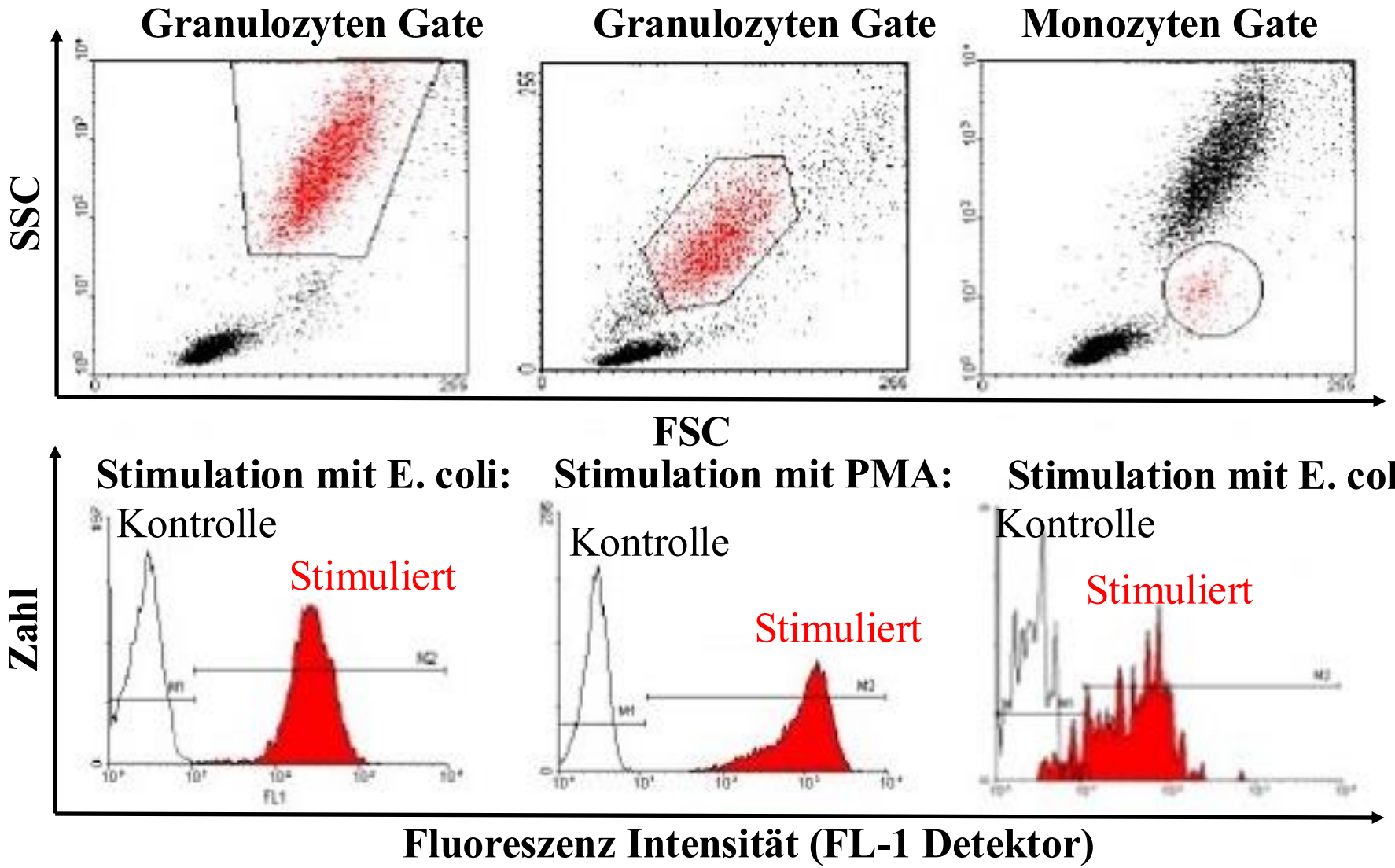
Phagozytose mit Fluoreszenzmikroskopie



Phagozytose mit Immunhistochemie

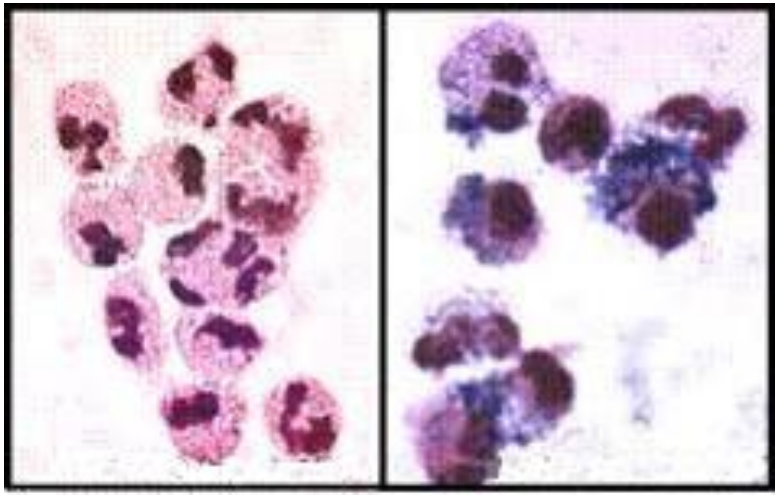


„Phagoburst" Test – messen des oxidativen burst der Leukozyten

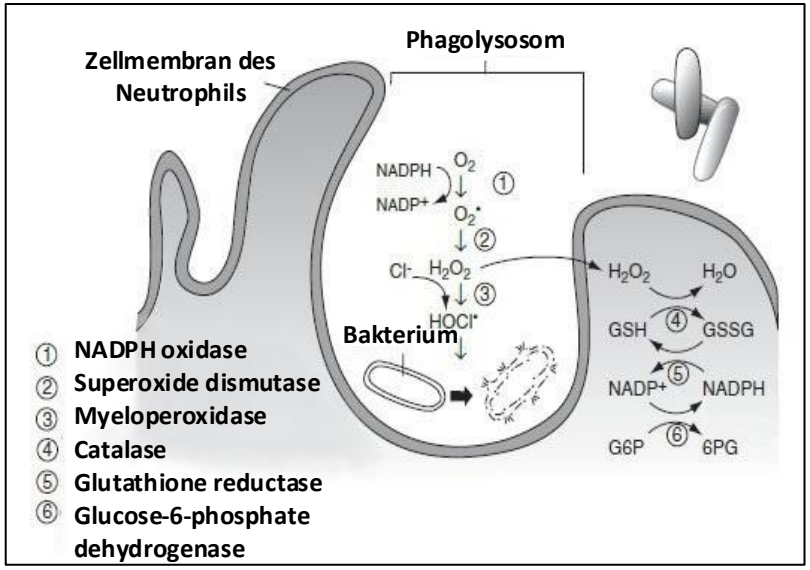


Dihydrorhodamine 123 ist das Fluorochrom (Emittiert Licht nach oxidation)

NBT Test



CGD Patient Gesunde Kontrolle



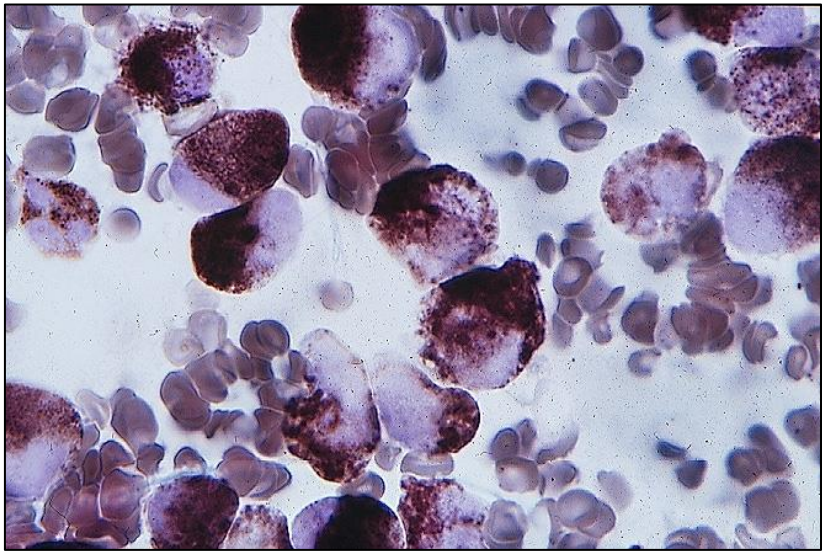
Prinzip: Reaktive Sauerstoff Spezies (ROS) reduzieren das Färbemittle das **blau wird**.[13.]

Chronische Granulomatose Krankheit (CGD)[14.]:

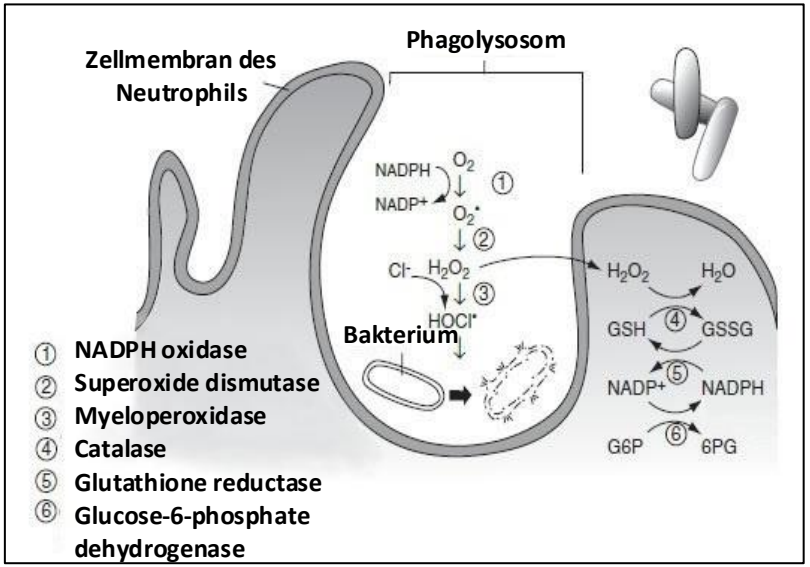
- Eine **genetische Krankheit**, meist X-chromosomal rezessiv.
- Angeborene Immunzellen können keine ROS produzieren. → Sie können Pathogene nicht effektiv töten. → **Primäre Immundefizienz.**
- **Widerkehrende bakterielle und mykotische Infektionen** mit Granulombildung in der Kindheit.

Myeloperoxidase Färbung

- Myeloperoxidase, ein charakteristisches Enzym der myeloischen Zellen (vor allem Neutrophile), nimmt an der Bildung der ROS teil.
- Detektion intrazellulärer Myeloperoxidase ist zur Bestätitgung des **myeloischen Ursprungs bestimmter Leukämien** wichtig.[15, 16.]



Detektion der Myeloperoxidase in akuter promyelozytischer Leukämie (AML-M3 oder APL)



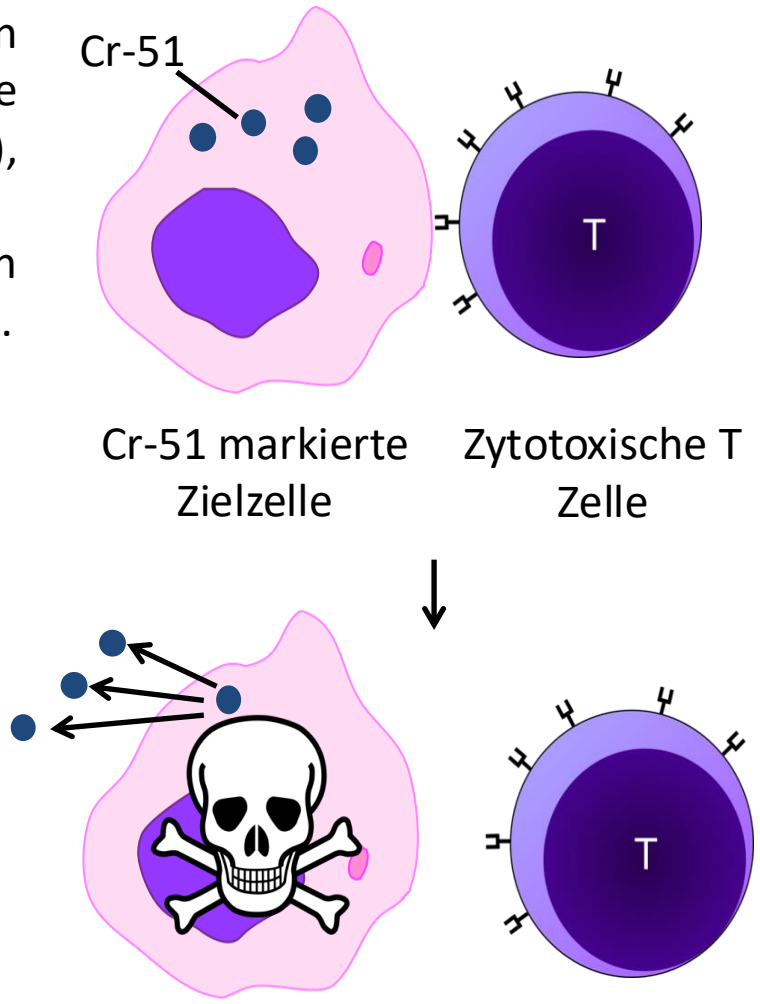
Funktionelle Tests der Lymphozyten

- **Polyklonale Aktivierung der Lymphozyten**:
  - Mit Pflanzenlektinen, z.B. Phytohämagglutinin (PHA)
  - Mit bakteriellen Zellwandkomponenten, z.B. Lipopolysaccharide (LPS)
- **Testen zytotoxischer Aktivität (T and NK cells)**:
  - Cr-51 Ausscheidungs-Assay mit Isotop-markierten Zellen
  - Messen des Anteils getöteter Zellen mit Durchflusszytometrie (e.g. Annexin V oder Propidium Iodid Färbung[17.])
- **Funktionelle Tests der B Zellen**:
  - Detektion der Immunglobulin Produktion (Immunzytochemie, ELISA)
  - Untersuchung genetischer Rekombination der Immunglobulingene mit PCR
  - Plaque formendes Zell Assay (PFC) → Testet Immuntoxizität
  - Passiver kutaner Anaphylaxie Test
- **Gemischte Lymphozyten Kultur**:
  - Zum Ausschluss immunologischer Inkompatibilität vor einer Transplantation
- **Testen der Zytokinproduktion**:
  - ELISA, ELISPOT
  - CBA (Cytometric Bead Array)

Chrome-51 Ausscheidungs Assay

In vitro Methode zur Messung der **Zelltötungskapazitäten** der zytotoxischen T Zellen (T, NK)[18.] und **ADCC**[19.] (Antikörper-abhängige Zell-mediierte Zytotoxizität, siehe Vorlesungen), z.B.:
Untersuchung Zytotoxischer Zellen von Krebspatienten in Anwesenheit kanzeröser Zellen.

1. Tc Zellen werden mit Cr-51-markierten Zielzellen inkubiert
2. Zielzell wird getötet, Chrom wird freigesetzt
3. Zentrifugierung, Zellen und Zellfragmente bildent ein Pellet am Boden des Reagenzglases.
4. Der Chromgehalt des Überstands wird gemessen



Cr-51 markierte Zielzelle

Zytotoxische T Zelle

Allergen-spezifisch Hauttest

IgE-vermittelte sofortige Reaktion



Lesen: 30 min

DTH:



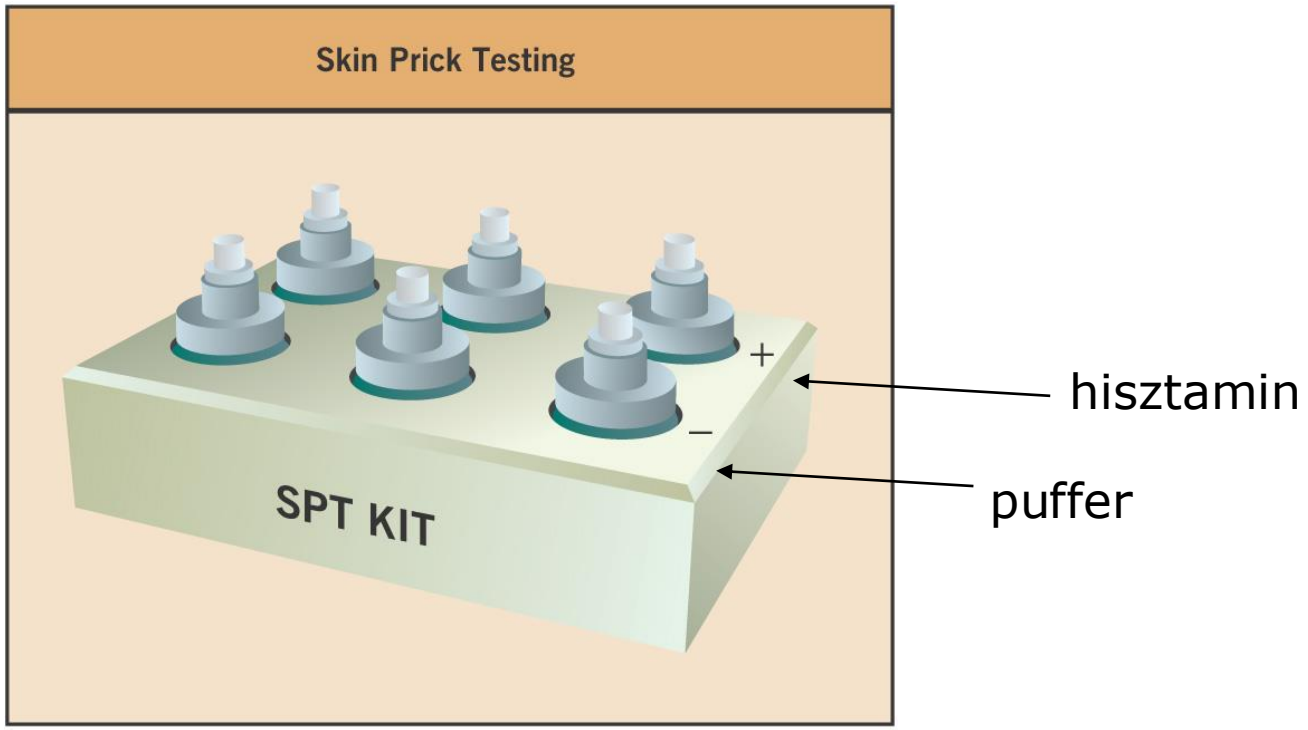
Lesen: 48h

Kontakt Allergie Hauttest

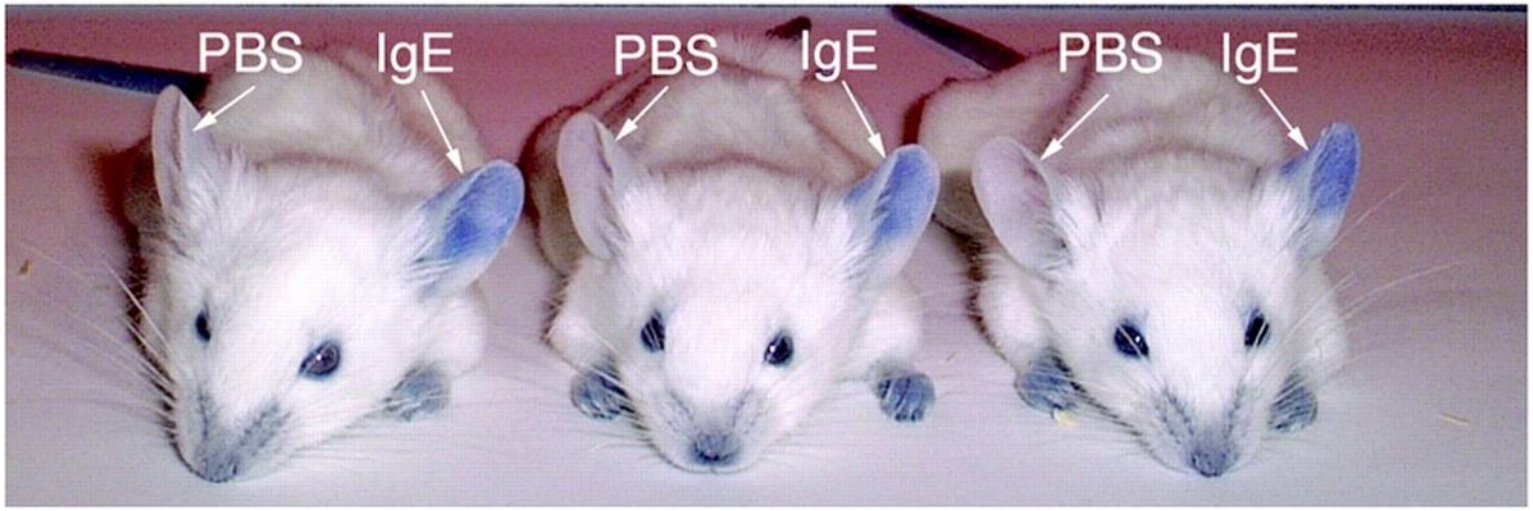


Skin prick test (SPT)= in vivo Allergen Hauttest

- Mehr sensitive aber weniger spezifisch als Allergen-specifische IgE Messung
- UK Allergen Gruppen: Hund, Katze, Hauststaubmilbe, Grass

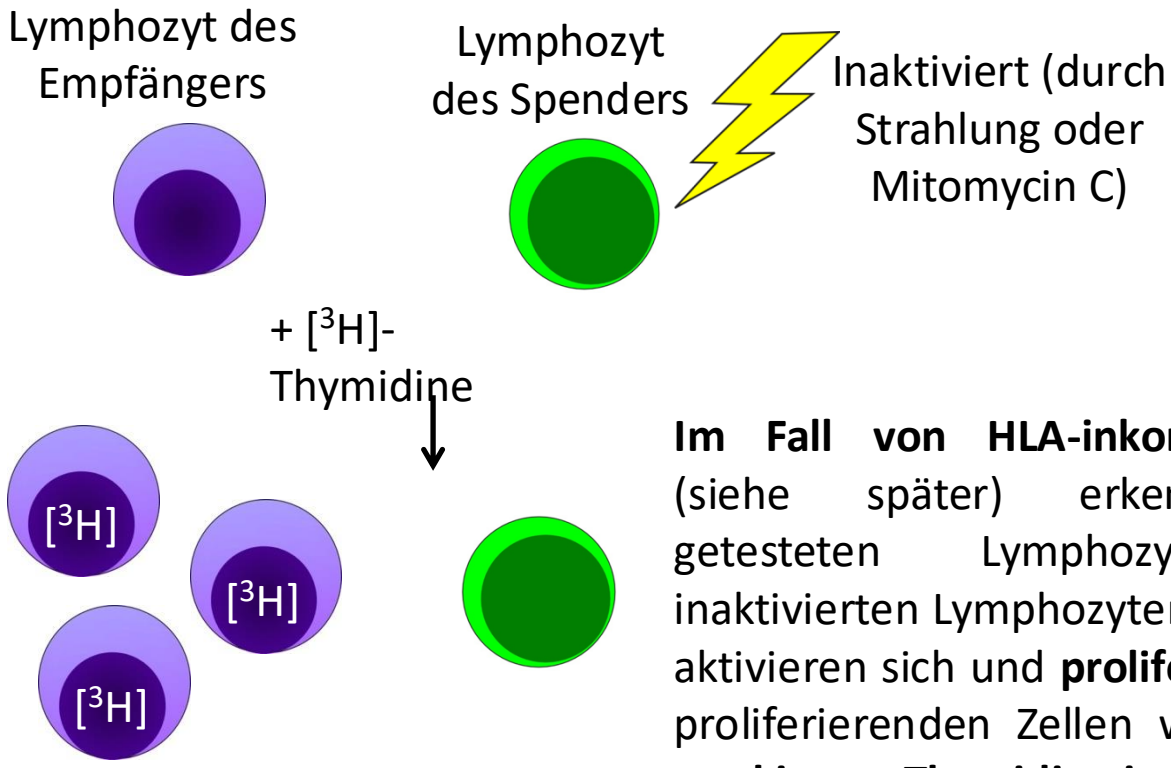


Passiver kutaner Anaphylaxie Test (PCA)



Antikörper (normal IgE) werden intradermal in Labortiere injiziert. (z.B. Serum des Patienten) Nach etwa 24-48 Stunden wird eine **Antigenmixtur** mit Evans **blau Färbung intravenös** verabreicht. Falls eine **Antigen-Antikörper Reaktion** stattfindet sammelt sich Farbe am Ort der intradermalen Injektion aufgrund der **lokalen Steigerung der vaskulären Permeabilität.** [20.]

Gemischte Lymphozyten Kultur (MLC)



Im Fall von HLA-inkompatibilität (siehe später) erkennen die getesteten Lymphozyten die inaktivierten Lymphozyten als fremd, aktivieren sich und **proliferieren**. Die proliferierenden Zellen werden das **markierte Thymidin in ihre DNA integrieren.**

Anwendungen:
Überprüfung **immunologischer Inkompatibilität** des Spenders und des Empfängers vor Transplantationen.[21, 22.]

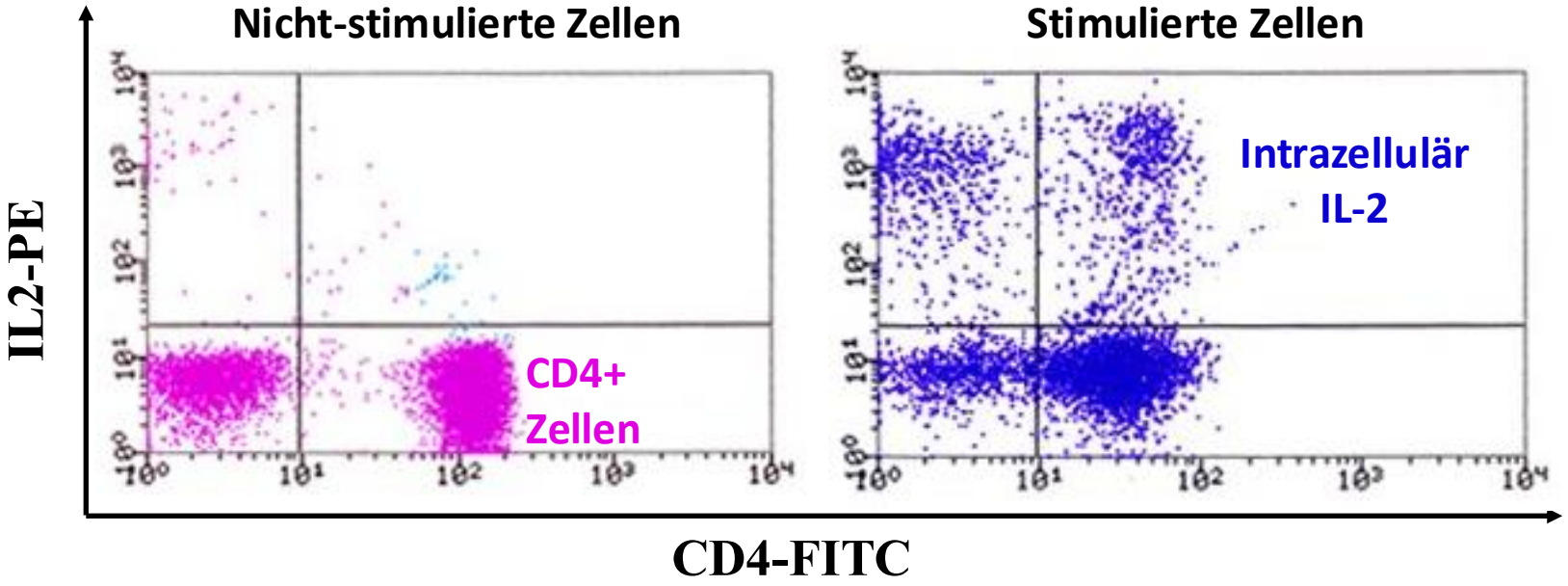
Methoden zur Messung von Zytokinspiegeln

- **Messung intrazellulärer Zytokine**→ Durchflusszytometrie
- Zytokin **ELISA**
- **ELISPOT** → Messung der Zytokinproduktion der Zellen
- **Multiplex Zytokin Array**
- **CBA**: zytometrisches bead array → Durchflusszytometrie

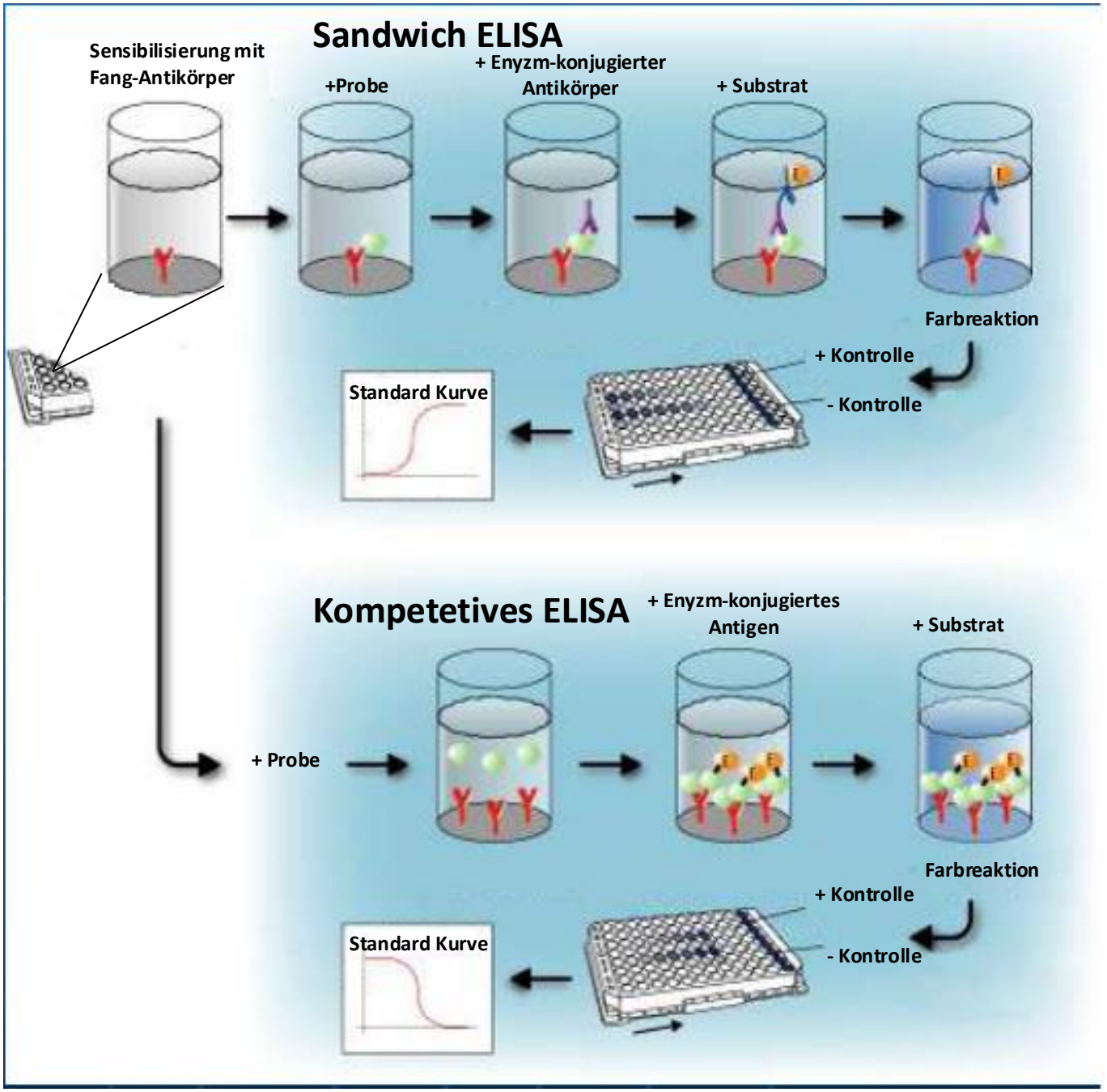


Human TNFα ELISA kit von Thermo Fisher Scientific®

Messung intrazellulärer Zytokine



1. Stimulation mit PMA/Ionomycin in Anwesenheit von Brefeldin für 4-24h bei 37 °C
2. Oberflächenmarkierung: CD3/CD4
3. Intrazelluläre Markierung: IL-2, IL-10, TGFβ

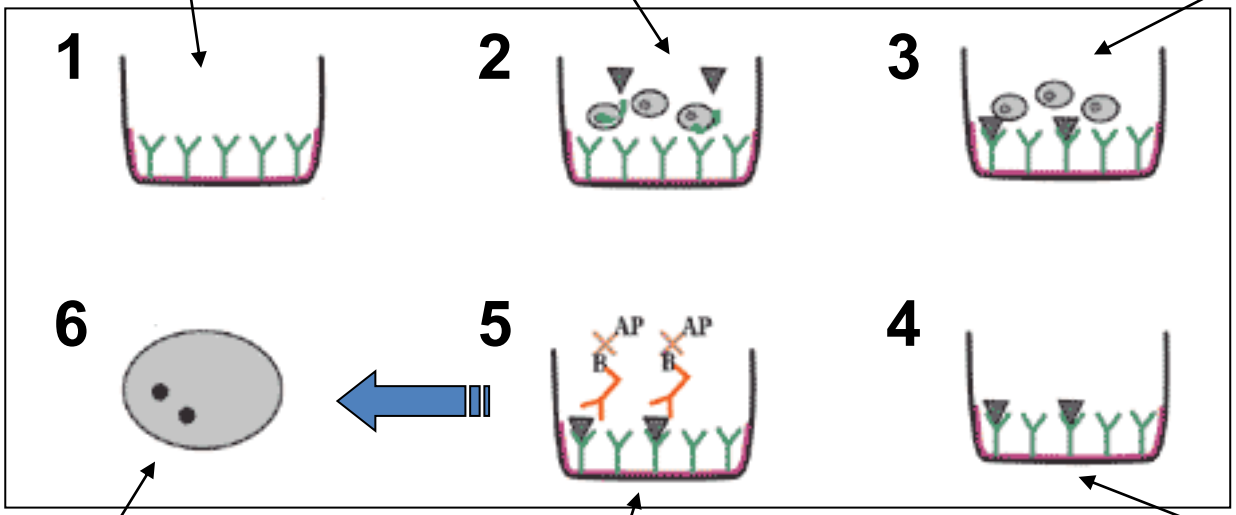

Sandwich ELISA
Sensibilisierung mit Fang-Antikörper
+Probe
+ Enyzm-konjugierter Antikörper
+ Substrat
Farbreaktion
+ Kontrolle
- Kontrolle
Standard Kurve
Kompetetives ELISA
+ Enyzm-konjugiertes Antigen
+ Substrat
+ Probe
Farbreaktion
+ Kontrolle
- Kontrolle
Standard Kurve

ELISPOT

Anti-mensch IFNγ Antikörper am Boden des Schachts

IFNγ produzierende Zellen

IFNγ Moleküle werden von Antikörpern gefangen

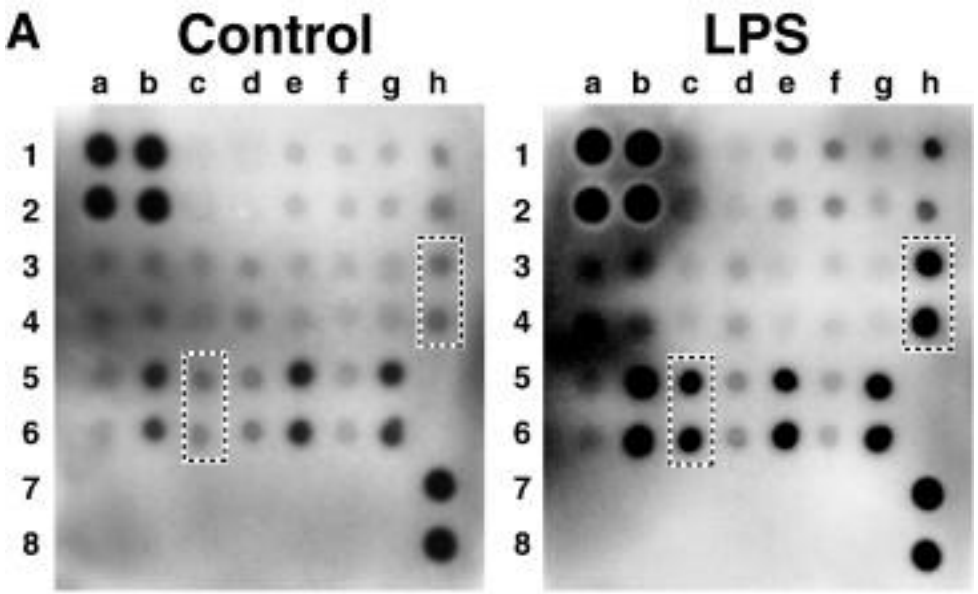


Chromogen hat ein unlösliches Endprodukt und bildet “Spots”

AP / HRPO konjugierte anti-IFNγ Antikörper werden hinzugefügt

Zellen und nicht gebundene Moleküle werden durch waschen entfernt.

Multiplex Zytokine Array



Ähnelt ELISA:
Fang-Antikörper sind an eine Membran gebunden.
Nutzt **Chemilumineszente** Detektion
Vorteil: DETEKTIERT MEHRERE ZYTOKINE GLEICHZEITIG

Es kann mehrere Zytokine in der Probe (Zelllysat, Überstand, Serum, usw.) **semiquantitative** detektieren.

B

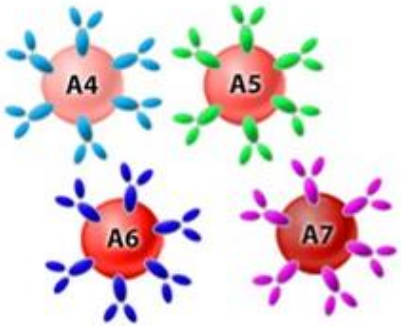
	a	b	c	d	e	f	g	h
1	Pos	Pos	Neg	Neg	CINC-2	CINC-3	CNTF	Fraktalkine
2	Pos	Pos	Neg	Neg	CINC-2	CINC-3	CNTF	Fraktalkine
3	CM-CSF	INF-γ	IL-1α	IL-1β	IL-4	IL-6	IL-10	LIX
4	CM-CSF	INF-γ	IL-1α	IL-1β	IL-4	IL-6	IL-10	LIX
5	Leptin	MCP-1	MIP-3α	B-NGF	TIMP-1	TNF-α	VEGF	Blank
6	Leptin	MCP-1	MIP-3α	B-NGF	TIMP-1	TNF-α	VEGF	Blank
7	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Pos
8	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Pos

MIP-3 – CCL20
LIX- CXCL-5

CBA (Cytometric Bead Array[23.])

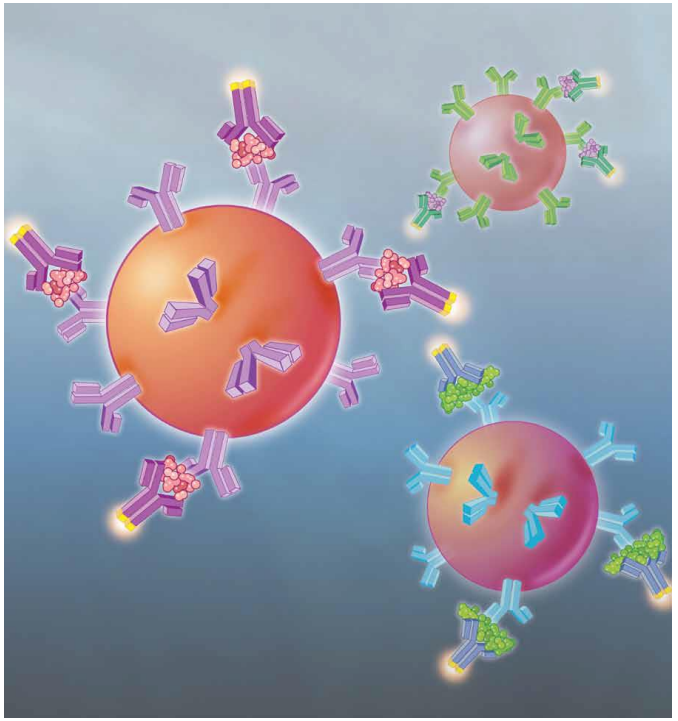
- Ist eine **Durchflusszytometrische** Methode → siehe 5. Praktikum
- Prinzip: Moleküle (z.B. DNA, Proteine inkl. Immunglobuline) können spezifisch an die Oberfläche von **Mikroperlen** angebracht werden die aufgrund verschiedener Parameter, wie Größe oder Fluoreszenz, auseinandergehalten warden können.
- Vorteile: **Mehrere verschieden Molekültypen** können gleichzeitig **in einer Probe** gemessen werden ("Multiplex Messung") und es ist **quantitativ**.

Perlenmischung:



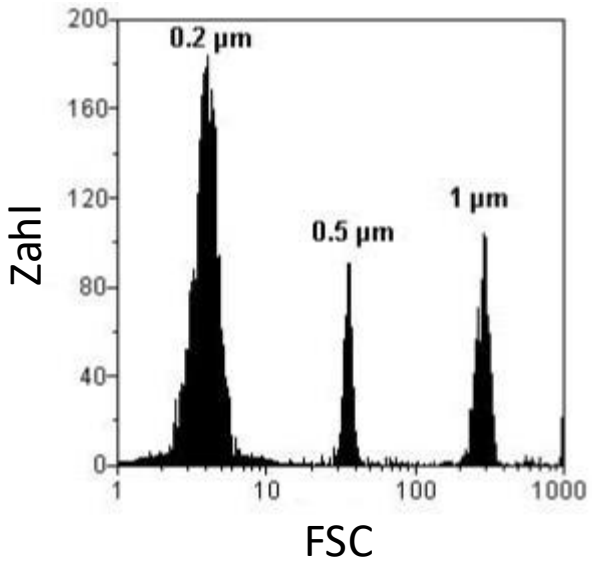


Untersuchung der Perle auf Größe
oder Fluoreszenz
(Frage: Hat es ein Antigen gebunden?)

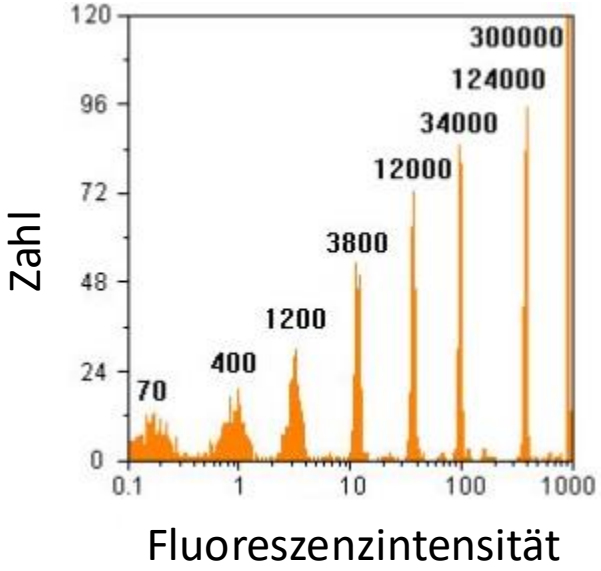


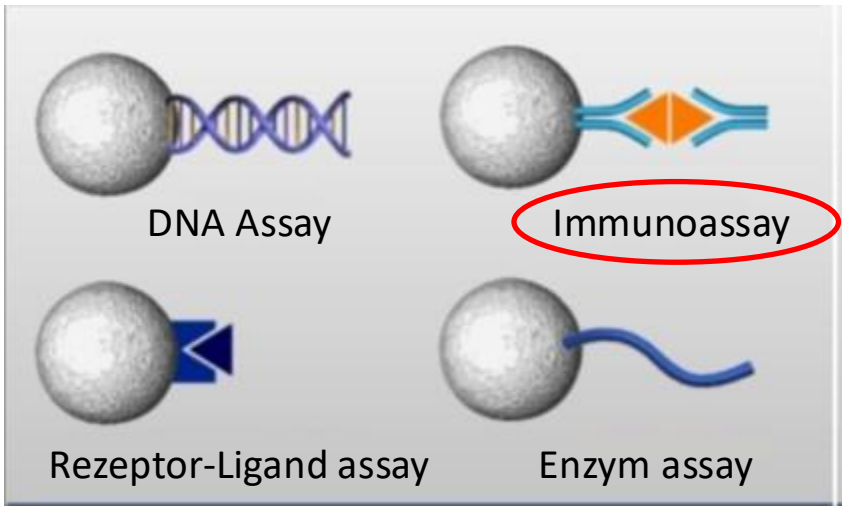
Auseinanderhalten von Mikroperlen

Anhäufung aufgrund von Größe:



Anhäufung aufgrund von Fluoreszenz:

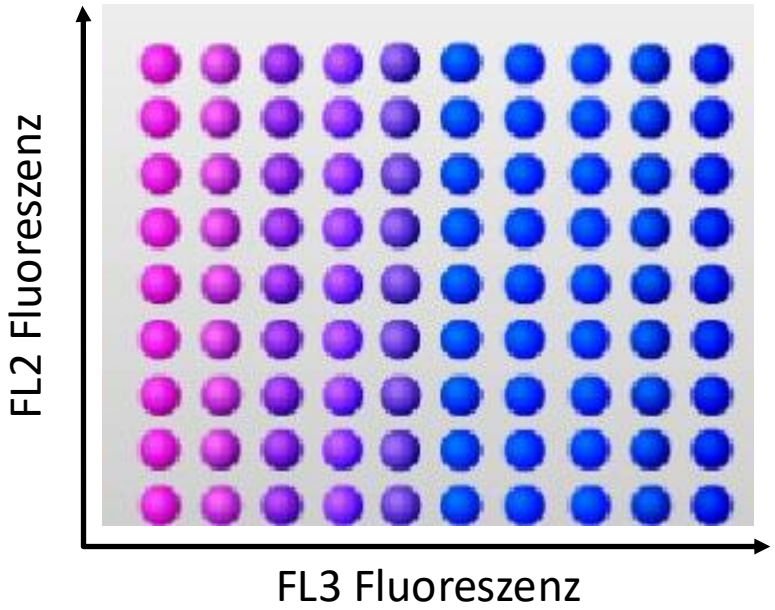




Es wird meistens als Mittel zur Messung verschiedener Zytokine in einer Probe genutzt. [23, 24]

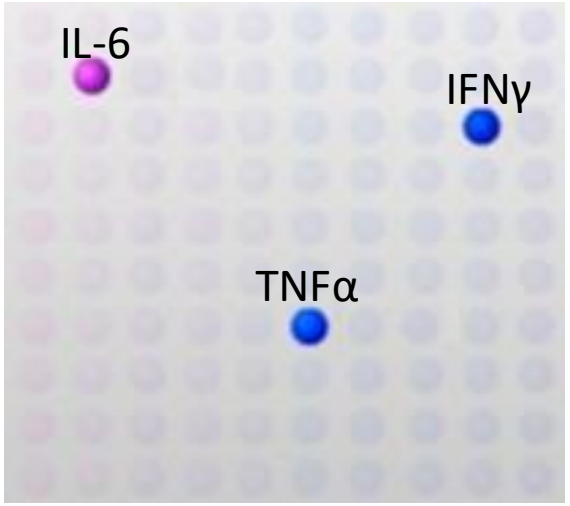
Luminex xMAP Technologie[25.]

Anhäufung von Perlen auf basis der Fluoreszenz



Auswahl der relevanten Perlen

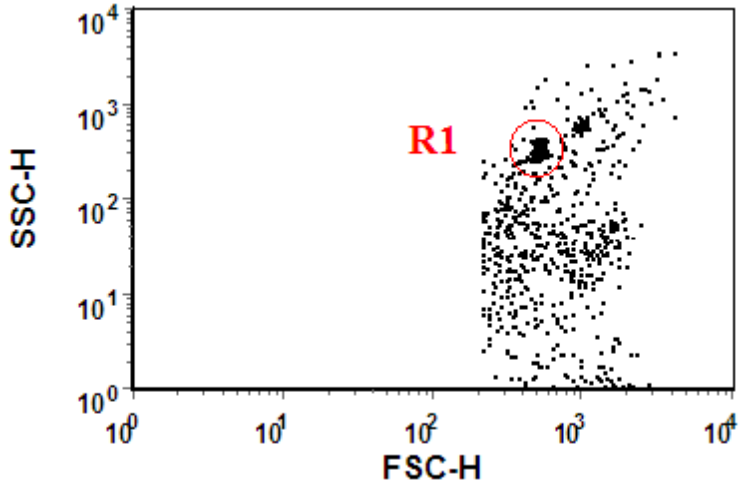
Further analysis of selected beads



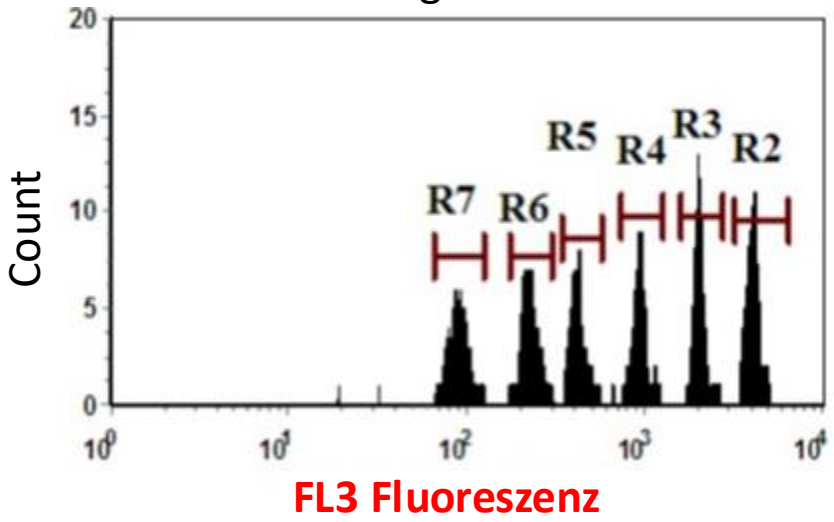
Prinzip: Jede Perle enthält eine Kombination von 2 Färbemitteln, aber das Verhältnis variiert in jedem Perlentyp. Z.B. Die Perlen die anti-IFNγ-Antikörper auf ihrer Oberfläche tragen haben mehr Färbemittel die ein Signal in FL3 geben als die Perlen mit anti-IL-6 Antikörpern. Theoretisch können mehr als 100 verschiedene Perlentypen in einer Probe gleichzeitig untersucht werden.

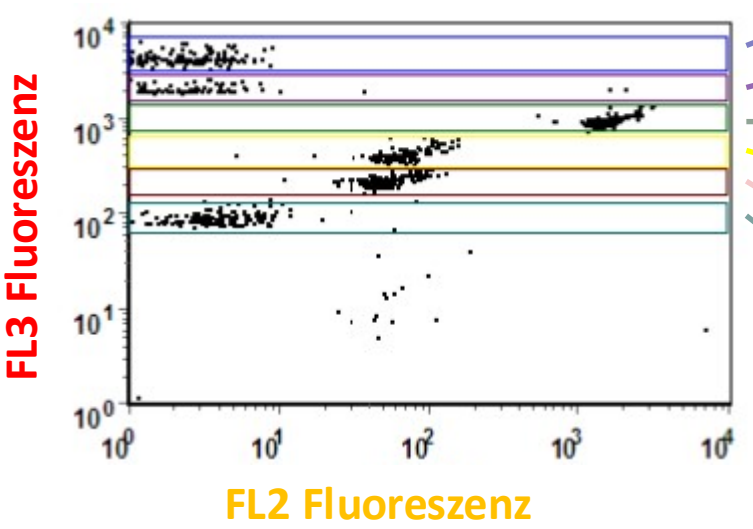
CBA Analyse (Zytokinmessung)

Gating der Perlen:



Anhäufung der Perlen:





R2 = IL-8 → Negativ

R3 = IL-1β → Negativ

R4 = IL-6 → **Stark Positiv**

R5 = IL-10 → **Positiv**

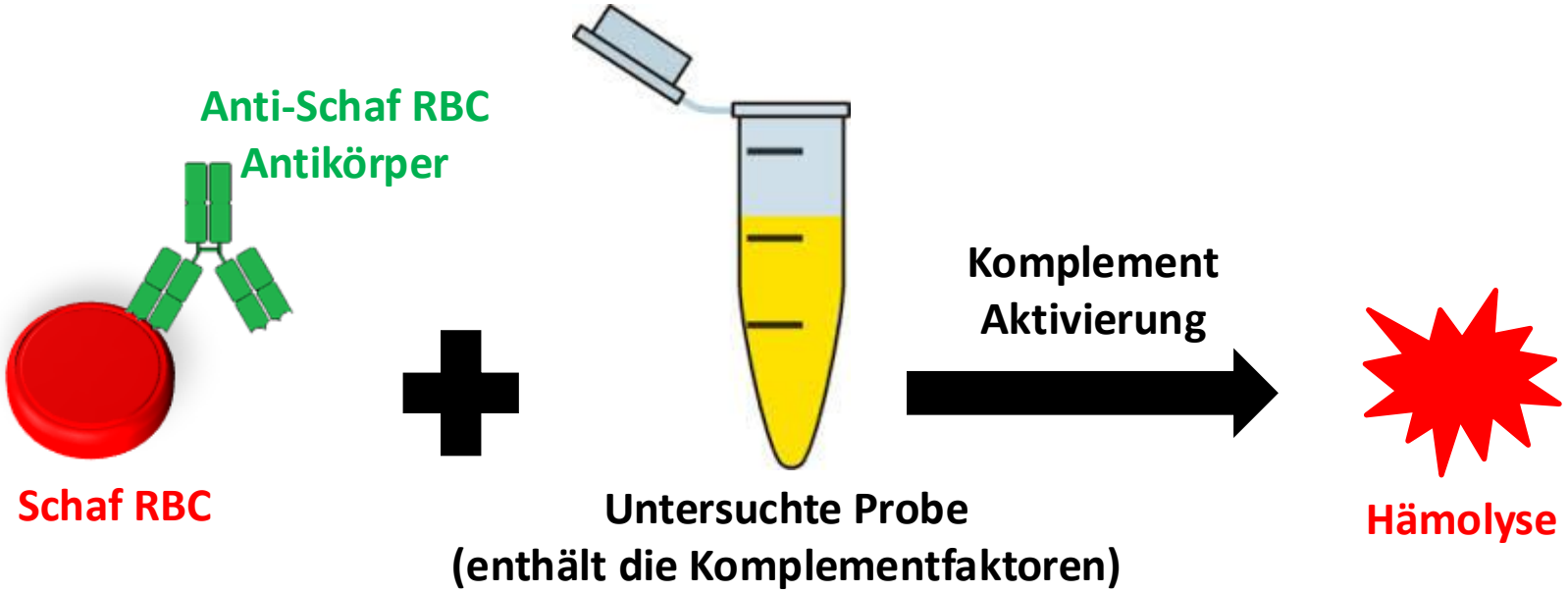
R6 = TNFα → **Positiv**

R7 = IL-12p40 → Negativ

Quantitative Messung:
Höhe der Poitivität kann auch bestimmt werden.

Funktionelle Tests des Komplementsystems

- Wann wird es durchgeführt:
  - Wiederkehrende Infektionen, mögliche Defizienz des Komplementsystems
  - **Autoimmunkrankheiten**
- Allgemeiner Test: basiert auf **Hämolyse** → CH50 oder CH100[26,27]



CH50 → Verdünnung der Probe die 50% Hämolyse der RBCs verursacht
CH100 → Verdünnung der Probe die Hämolyse aller RBCs verursacht

QuantiFERON®

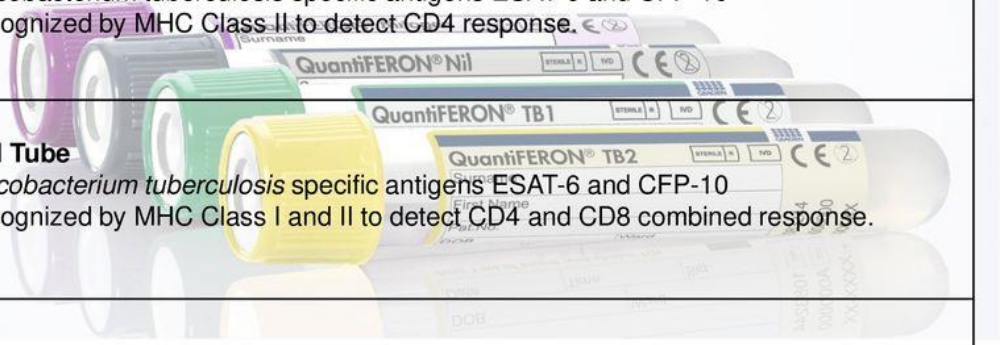
Blood Test for the Detection of
Latent Tuberculosis Infection



Sampling tubes of QuantiFERON TB Gold Plus

NIL Tube
- Negative control
- Allows adjustment for background noise.

TB1 ANTIGEN Tube
- Includes *Mycobacterium tuberculosis* specific antigens ESAT-6 and CFP-10
- Peptides recognized by MHC Class II to detect CD4 response.



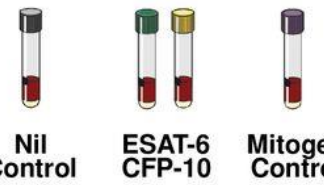
TB2 ANTIGEN Tube
- Includes *Mycobacterium tuberculosis* specific antigens ESAT-6 and CFP-10
- Peptides recognized by MHC Class I and II to detect CD4 and CD8 combined response.

Mitogen Tube
- Positive control
- Includes PHA and allows to check the functionality of the immune system
- Objectives:
  - To identify individuals with weakened immune system
  - To validate specimen handling conditions

Internal Training Use Only - January 2017

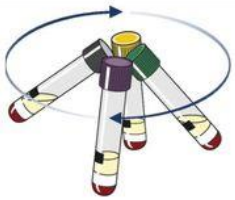
QuantiFERON-TB Gold Plus Protocol

Step 1: Whole Blood incubation



Nil Control **ESAT-6 CFP-10** **Mitogen Control**

1) 1mL of whole blood (x4) and incubation at +37ºC for 16-24 h.

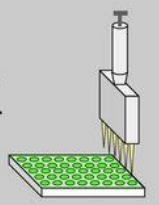


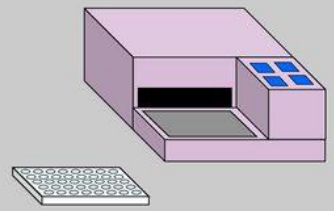
2) 15 minutes Centrifugation

IFN-γ is stable at 2-8° C for at least 4 weeks

Step 2: INF-γ ELISA testing

3) Add plasma and conjugate. Incubation 2H at room temperature





4) Wash then add Substrate. OD reading after 30 min.



5) Calculation and results printing

Active and Latent Tuberculosis Infection

TB-related morbidity and mortality

The TB pandemic – global emergency (1)

Active TB disease in 2013

- 9 million people developed TB disease
- 1.5 million people died

Latent TB infection (LTBI) in 2013

- 2 billion infected with *M. tuberculosis*
- 10% chance of developing active, contagious TB disease in their lifetimes

Screening and treatment (2)

2014 WHO guidelines, part of Broad strategy to "End TB" by 2035:

- Identify and treat LTBI for upper-middle and high income countries with TB incidence <100/100k population
- Screen and treat for LTBI in most at-risk populations for progression to active TB
- Reduce TB deaths by 95%; cut active TB cases by 90%

As active TB rates decrease, LTBI diagnosis & preventive treatment grows in importance

1. WHO. Global tuberculosis report 2014. **http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/137094/1/9789241564809_eng.pdf?ua=1**, Dec 1, 2014. 2. WHO. Guidelines on the management of latent tuberculosis infection. 2014 **http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/136471/1/9789241548908_eng.pdf?ua=1,** Dec 1, 2014.

From Latent TB infection to Active TB: Risk Factors

Risk factors to develop active TB form Latent TB infection	
Risk Factors	**Estimation of relative risk***
AIDS	110 - 170
Well controlled HIV infection	50 - 110
Solid Organ Transplantation	20 - 74
Chronic Hemodialysis	10 - 25
Head and neck cancer	16
Recent tuberculosis infection (<2 years)	15
Systemic prolonged corticosteroids therapy	4.9
Anti-TNF α treatment	1.5 - 4
Diabetes	2 - 3.6
Malnutrition (body mass index < 20 kg/m^2)	2 - 3
Passive smoking	2 - 3

** Compared to a population without any risk factor*
***HIV**: Human Immunodeficiency Virus*
***TNF**: Tumor Necrosis Factor*

Leroy H. et al in La revue du praticien vol. 62, avril 2012 p 484, adapted from Landry J, Menzies D. *Preventive chemotherapy. Where has it got us? Where to go next?* Int J Tuberc Lung Dis 2008;12:1352-64.

Quellen 1.

1. ThermoFischer Scientific: **Introduction to Cell Culture** (https://www.thermofisher.com/hu/en/home/references/gibco-cell-culture-basics/introduction-to-cell-culture.html)
2. Jensen JR[1], Morbeck DE, Coddington CC 3rd: **Fertility preservation.** *Mayo Clin Proc.* 2011 Jan;86(1):45-9. doi: 10.4065/mcp.2010.0564.
3. Gluckman E[1]: **Family-directed umbilical cord blood banking.** *Haematologica.* 2011 Nov;96(11):1700-7. doi: 10.3324/haematol.2011.047050. Epub 2011 Jul 12.
4. Roura S[1], et al.: **The role and potential of umbilical cord blood in an era of new therapies: a review.** *Stem Cell Res Ther.* 2015 Jul 2;6:123. doi: 10.1186/s13287-015-0113-2.
5. Lucey BP[1], Nelson-Rees WA, Hutchins GM: **Henrietta Lacks, HeLa cells, and cell culture contamination.** *Arch Pathol Lab Med.* 2009 Sep;133(9):1463-7. doi: 10.1043/1543-2165-133.9.1463.
6. Hudson KL[1], Collins FS: **Biospecimen policy: Family matters.** *Nature.* 2013 Aug 8;500(7461):141-2. doi: 10.1038/500141a.
7. Schneider U, Schwenk HU, Bornkamm G: **Characterization of EBV-genome negative "null" and "T" cell lines derived from children with acute lymphoblastic leukemia and leukemic transformed non-Hodgkin lymphoma.** *Int J Cancer.* 1977 May 15;19(5):621-6.
8. Drexler HG[1], Minowada J: **History and classification of human leukemia-lymphoma cell lines.** *Leuk Lymphoma.* 1998 Oct;31(3-4):305-16.
9. Anvret M, Karlsson A, Bjursell G: **Evidence for integrated EBV genomes in Raji cellular DNA.** *Nucleic Acids Res.* 1984 Jan 25;12(2):1149-61.
10. Aden DP, et al.: **Controlled synthesis of HBsAg in a differentiated human liver carcinoma-derived cell line.** *Nature.* 1979 Dec 6;282(5739):615-6.

Quellen 2.

11. Melixetian MB[1], et al.: **Mouse myeloma cell line Sp2/0 multidrug-resistant variant as parental cell line for hybridoma construction.** *Hybrid Hybridomics.* 2003 Oct;22(5):321-7.
12. Marks DJ[1], et al.: **Modified skin window technique for the extended characterisation of acute inflammation in humans.** *Inflamm Res.* 2007 Apr;56(4):168-74.
13. Freeman R, King B: **Technique for the performance of the nitro-blue tetrazolium (NBT) test.** *J Clin Pathol.* 1972 Oct;25(10):912-4.
14. Song E[1], et al.: **Chronic granulomatous disease: a review of the infectious and inflammatory complications.** *Clin Mol Allergy.* 2011 May 31;9(1):10. doi: 10.1186/1476-7961-9-10.
15. Gluzman DF[1], et al.: **Immunocytochemical markers in acute leukaemias diagnosis.** *Exp Oncol.* 2010 Sep;32(3):195-9.
16. van den Ancker W[1], et al.: **A threshold of 10% for myeloperoxidase by flow cytometry is valid to classify acute leukemia of ambiguous and myeloid origin.** *Cytometry B Clin Cytom.* 2013 Mar;84(2):114-8. doi: 10.1002/cyto.b.21072. Epub 2013 Jan 16.
17. Zaritskaya L[1], et al.: **New flow cytometric assays for monitoring cell-mediated cytotoxicity.** *Expert Rev Vaccines.* 2010 Jun;9(6):601-16. doi: 10.1586/erv.10.49.
18. Brunner KT, et al.: **Quantitative assay of the lytic action of immune lymphoid cells on 51-Cr-labelled allogeneic target cells in vitro; inhibition by isoantibody and by drugs.** *Immunology.* 1968 Feb;14(2):181-96.
19. Nelson DL[1], Kurman CC, Serbousek DE: **51Cr release assay of antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC).** *Curr Protoc Immunol.* 2001 May;Chapter 7:Unit 7.27. doi: 10.1002/0471142735.im0727s08.
20. Poulsen OM, Hau J: **Murine passive cutaneous anaphylaxis test (PCA) for the 'all or none' determination of allergenicity of bovine whey proteins and peptides.** *Clin Allergy.* 1987 Jan;17(1):75-83.

Quellen 3.

21. Cerilli J, et al.: **The significance of mixed lymphocyte culture in related renal transplantation.** *Surgery.* 1980 Nov;88(5):631-5.
22. Mickelson EM[1], et al.: **Evaluation of the mixed lymphocyte culture (MLC) assay as a method for selecting unrelated donors for marrow transplantation.** *Tissue Antigens.* 1996 Jan;47(1):27-36.
23. Moncunill G[1], Campo JJ, Dobaño C: **Quantification of multiple cytokines and chemokines using cytometric bead arrays.** *Methods Mol Biol.* 2014;1172:65-86. doi: 10.1007/978-1-4939-0928-5_6.
24. Prabhakar U[1], et al.: **Multiplexed cytokine sandwich immunoassays: clinical applications.** *Methods Mol Med.* 2005;114:223-32.
25. Zhang Y[1], Birru R, Di YP: **Analysis of clinical and biological samples using microsphere-based multiplexing Luminex system.** *Methods Mol Biol.* 2014;1105:43-57. doi: 10.1007/978-1-62703-739-6_4.
26. Costabile M.: **Measuring the 50% haemolytic complement (CH50) activity of serum.** *J Vis Exp.* 2010 Mar 29;(37). pii: 1923. doi: 10.3791/1923.
27. Mollnes TE, et al.: **Complement analysis in the 21st century.** *Mol Immunol.* 2007 Sep;44(16):3838-49.