

Diplomarbeit

**mRNA-Impfstoffe in
Hämatologischen Erkrankungen –
Stand der Entwicklung und Ausblick**

eingereicht von

Yasmin Blumberger, MA

zur Erlangung des akademischen Grades

**Doktorin der gesamten Heilkunde
(Dr.ⁱⁿ med. univ.)**

an der

Medizinischen Universität Graz

ausgeführt am

**Universitätsklinikum für Innere Medizin
an der
Klinischen Abteilung für Onkologie**

unter der Anleitung von

**Dr. Georg Richtig
Prof. Mag. Dr. Martin Pichler**

Graz, 24.04.2024

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, andere als die angegebenen Quellen nicht verwendet habe und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Graz, am 24.04.2024

Yasmin Blumberger, MA eh.

Danksagung

In erster Linie möchte ich herzlich meiner Familie danken, meiner Mutter und meinen beiden Schwestern. Sie waren trotz der Entfernung immer da und haben mich, jeder auf ihre eigene Art, unterstützt. Aber auch meiner lieben und sehr starken Großmutter möchte ich hier danken, die mich mit ihrer Sicht auf das Leben immer wieder fasziniert.

Ein außerordentlich großer Dank an dieser Stelle geht natürlich an Dr. Georg Richtig, der die Zielgen-Suche und die Erstellung der Graphiken übernahm und damit, aber auch durch seine gewissenhafte Betreuung, diese Arbeit erst möglich gemacht und einen maßgeblichen Teil beigetragen hat.

Auch Prof. Mag. Dr. Martin Pichler möchte ich meinen Dank aussprechen, der seine Zeit investiert, um diese Arbeit zu überprüfen und zu beurteilen.

Am Schluss möchte ich noch meine Freunde erwähnen, mit denen ich viele schöne und bereichernde Stunden erleben durfte und hoffentlich auch weiterhin erleben darf.

Zusammenfassung

Nach wie vor stellt Krebs die medizinische Forschung vor eine große Herausforderung. Das Auftreten von Malignomen nimmt seit Jahrzehnten zu und es wird kontinuierlich nach weiteren Therapieansätzen gesucht. Über 30 Jahre ist es mittlerweile her, dass die Idee der mRNA-Impfung geboren wurde und auch die ersten erfolgreichen Versuche zur Durchführbarkeit dieser Methode liegen schon lange zurück. Trotz zahlreicher vielversprechender Studien schaffte diese Therapieform erst im Kampf gegen die COVID19-Pandemie ihren Durchbruch.

Die mRNA-Impfung bietet im Kampf gegen den Krebs ein hervorragendes Werkzeug für die Realisierbarkeit einer Multi-Target-Therapie, da die Vorlage jedes beliebigen Proteins herstellbar und kombinierbar ist. Diese Therapieform hat sich erfolgreicher als eine Monotherapie bezüglich Tumoreradikation und Resistenzausbildung gezeigt, jedoch sollte die Zielgensuche sorgfältig ausgewählt werden. Das Gen sollte optimalerweise im Tumorgewebe hoch exprimiert werden, im physiologischen Gewebe jedoch kaum bis gar nicht, um die Angriffsfläche zum größten Teil auf die neoplastischen Zellen richten zu können und die Nebenwirkungen möglichst gering zu halten.

Das Ziel dieser Arbeit war die Identifikation von potenziellen Zielgenen für eine Therapie im Bereich der Hämatookologie. Hierfür wurden Informationen zu der physiologischen Funktion und Expression der ausgewählten proteincodierenden Gene gesammelt und es wurde sich ein Überblick verschafft, inwieweit eine Expression in Tumoren festgestellt werden konnte und welche Rolle sie hier übernehmen.

Abstract

Cancer continues to pose a major challenge for medical research. The incidence of malignancies has been increasing for decades and the search for further therapeutic approaches has been meticulous. It has now been more than 30 years since the idea of mRNA vaccination was born and the first successful attempts to test the feasibility of this method also date back a long time. Despite numerous promising studies, this form of therapy only achieved its breakthrough in the fight against the COVID-19 pandemic. Since then, it has received full attention.

In the fight against cancer, mRNA vaccination offers an excellent tool for the feasibility of a multi-target therapy, as the template of any protein can be produced and combined. This form of therapy has been shown to be more successful than monotherapy in terms of tumor eradication and resistance development, but the target gene search should be carefully selected. Ideally, the gene should be highly expressed in tumor tissue, but hardly or not at all in physiological tissue, in order to be able to direct most of the target area to the neoplastic cells and keep side effects to a minimum.

The aim of this thesis was to identify potential target genes for a therapy in the field of hematooncology. For this purpose, information on the physiological function and expression of the selected protein-coding genes were collected and an overview was obtained of the extent to which expression in tumors could be determined and what role they play here.

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|-------------|
| DANKSAGUNG | III |
| ZUSAMMENFASSUNG | IV |
| ABSTRACT | V |
| ABKÜRZUNGEN | VIII |
| ABBILDUNGSVERZEICHNIS | XI |
| TABELLENVERZEICHNIS | XII |
| 1 EINLEITUNG | 1 |
| 2 DIE GENETISCHE INFORMATION | 4 |
| 2.1 DAS GRUNDGERÜST DER DNA UND DER RNA | 4 |
| 2.2 DIE DNA | 5 |
| 2.3 DIE RNA | 6 |
| 2.3.1 <i>Direkt proteinrelevante RNAs</i> | 7 |
| 2.3.2 <i>Kleine RNAs – sRNAs</i> | 7 |
| 2.3.3 <i>Regulatorische RNAs</i> | 8 |
| 3 DIE PROTEINBIOSYNTHESE | 9 |
| 3.1 TRANSKRIPTION | 9 |
| 3.1.1 <i>Polymerase II – Transkription</i> | 9 |
| 3.1.2 <i>prä-mRNA- Prozessierung</i> | 11 |
| 3.2 TRANSLATION | 13 |
| 3.2.1 <i>Initiation</i> | 13 |
| 3.2.2 <i>Elongation</i> | 14 |
| 3.2.3 <i>Termination</i> | 15 |
| 3.2.4 <i>Posttranslationale Modifikationen (PTM) und Transport</i> | 16 |
| 4 REGULATION DER GENEXPRESSION | 18 |
| 4.1 REGULATION DURCH DNA-METHYLIERUNG | 18 |
| 4.2 REGULATION AUF TRANSKRIPTIONSEBENE | 19 |
| 4.2.1 <i>Wichtige Strukturelemente von RTFs</i> | 20 |
| 4.3 POSTTRANSKRIPTIONELLE REGULIERUNG | 21 |
| 4.3.1 <i>Alternatives Spleißen</i> | 21 |
| 4.3.2 <i>Halbwertszeit der mRNA</i> | 22 |
| 4.4 REGULATION AUF TRANSLATIONSEBENE | 24 |
| 4.4.1 <i>Auf Ebene der Cap-Struktur</i> | 24 |
| 4.4.2 <i>Länge und Sekundärstruktur der 5'-UTR</i> | 25 |
| 4.4.3 <i>Stromaufwärtsliegende ORFs</i> | 26 |
| 4.4.4 <i>Das Umfeld des Startcodons</i> | 26 |
| 4.4.5 <i>3'-UTR</i> | 27 |
| 5 DIE MRNA-IMPFFSTOFFE | 28 |
| 5.1 HERSTELLUNG DER MRNA | 28 |
| 5.1.1 <i>Reinigung des Impfstoffs</i> | 29 |
| 5.2 IMMUNREAKTION IM RAHMEN DER MRNA-IMPfung | 30 |
| 5.2.1 <i>Die Kreuzpräsentation</i> | 31 |
| 5.2.2 <i>Die immunverstärkende Komponente</i> | 32 |
| 5.3 VERBESSERUNG UND ANPASSUNGEN HINSICHTLICH TRANSLATIONSEFFIZIENZ UND IMMUNOGENITÄT | 32 |
| 5.3.1 <i>Veränderung der 5'-Cap-Struktur</i> | 33 |
| 5.3.2 <i>Modifikationen an den Nicht-translatierenden Regionen</i> | 35 |
| 5.3.3 <i>Triplett-Änderung durch den Austausch einzelner Basen im offenen Leserahmen</i> ... | 36 |
| 5.3.4 <i>Poly(A)-Schwanz</i> | 36 |
| 5.3.5 <i>Hinzufügen von Adjuvantien</i> | 37 |
| 5.4 TRÄGERSUBSTANZEN | 37 |
| 5.4.1 <i>Lipid-Nanopartikel (LNPs)</i> | 37 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 5.5 | APPLIKATIONSFORMEN..... | 38 |
| 5.5.1 | <i>Injektion oder transkutane Applikation nackter mRNA</i> | 39 |
| 5.5.2 | <i>Der mRNA-Krebsimpfstoff</i> | 40 |
| 6 | MATERIALIEN UND METHODEN..... | 43 |
| 6.1 | BIOINFORMATISCHE ABFRAGE | 43 |
| 6.2 | LITERATURRECHERCHE..... | 44 |
| 7 | ERGEBNISSE | 45 |
| 7.1 | GENZUSAMMENFASSUNG | 52 |
| 7.1.1 | <i>NCR2</i> | 52 |
| 7.1.2 | <i>LGALS14</i> | 55 |
| 7.1.3 | <i>LIM2</i> | 57 |
| 7.1.4 | <i>CABP5</i> | 59 |
| 7.1.5 | <i>OR51G2</i> | 61 |
| 7.1.6 | <i>CCR8</i> | 62 |
| 7.1.7 | <i>CCR3</i> | 65 |
| 7.1.8 | <i>C17orf99</i> | 68 |
| 7.1.9 | <i>TREML4</i> | 70 |
| 7.1.10 | <i>CD300LD</i> | 72 |
| 7.1.11 | <i>TARM1</i> | 74 |
| 7.1.12 | <i>OR51B2</i> | 76 |
| 7.1.13 | <i>Gene ohne Expressionsdaten – GLYATL1B, H3C7, H3C8, H2AC14</i> | 78 |
| 8 | DISKUSSION | 80 |
| 9 | LITERATURVERZEICHNIS | 87 |

Abkürzungen

ALCL – Anaplastisches großzelliges Lymphom
ALK – Anaplastische Lymphomkinase
ALL – Akute Lymphatische Leukämie
AML – Akute Myeloische Leukämie
AMP – Adenosinmonophosphat
APC – antigen-presenting cells – Antigen-präsentierende Zelle
ARCA – anti-reverse capp-analoga
ARE – Adenin-Uracil reiches Element
ATLL – Adulte T-Zell-Leukämie/Lymphom
ATP – Adenosintriphosphat
ATPase – Adenosindiphosphatase
bZip – basische Leucin-Zipper
CABP – Calcium-binding Protein
CaM – Calmodulin
CAR – Chimäre Antigenrezeptor
CCL – Chemokin Ligand
CCR – Chemokine Receptor
CD – cluster of differentiation
CDK – cyclin dependent kinase
cDNA – komplementäre DNA
circRNA – zirkuläre RNA
CLL – Chronische Lymphatische Leukämie
CRE – cAMP response element
CREB – cAMP response element-binding protein
CSV – comma-separated values
CTCL – Kutanes Z-Zell-Lymphom
CTD – C-terminale Domäne
CTLA – Cytotoxic T Lymphocyte Antigen
DAP – DNAX-Activation Protein
DC – dendritic cell – Dendritische Zelle
DCP – Decapping-Protein
DLBCL – Diffuses Großzelliges B-Zell-Lymphom
DNA – Desoxyribonukleinsäure
DOPE – 1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamin
DOTAP – 1,2-Dioleoyl-3-trimethylammoniumpropan
dsRNA – double-stranded RNA
eDLBCL – Extranodales Diffuses Großzelliges B-Zell-Lymphom
eIF – eukaryotische Initiationsfaktor
ER – Endoplasmatisches Retikulum
eRF – eucaryotic release factor
ERK – Extracellular signal-Regulated Kinase
FcR γ - Fc Receptor gamma
FLT – Fms-like tyrosine kinase
FoxP3⁺ - Forkhead-Box-Protein P3-positiv
FPLC – fast protein liquid chromatography
GDP – Guanosindiphosphat
GI – Gastrointestinal-
GLYATL – Glycine-N-Acyltransferase Like
GTE_x – Genotype-Tissue Expression
GTF – genereller Transkriptionsfaktor
GTP – Guanosintriphosphat
HCC – Hepatozelluläres Karzinom
hDcp2 – human decapping enzyme 2
HL – Hodgkin-Lymphom
HLA – Humanes Leukozytenantigen
HPLC – high performance liquid chromatography
HTLV – Humanes T-Zell-Leukämie-Virus
IEL – Intestinal (intra-)Epithelial Lymphocyte

IFN – Interferon
 IgA – Immunglobulin A
 IL – Interleukin
 ILC – Innate Lymphoid Cell
 IP3 – Inositol-Triphosphat
 IRES – internal ribosome entry site
 ITAM – Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif
 ITIM – Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitor Motif
 IUFT – Intrauteriner Fruchttod
 IUGR – Intrauterine Growth Restriction
 IVT – in-vitro-transcription – In-vitro-Transkription
 KM – Knochenmark
 KO – Knockout
 LDL – low density lipoprotein
 LDLR – low density lipoprotein receptor
 LGALS – Lectin-Galactoside-Binding Soluble
 LIM – Lens Intrinsic Membrane Protein
 lncRNA – long non-coding RNA
 LNP – Lipid-Nanopartikel
 LPX – Lipoplex
 MALT-Lymphom – Mukosa Associated Lymphoid Tissue Lymphoma
 MAPK – Mitogen-Activated Protein Kinase
 MCP – Monocyte Chemotactic Protein
 MDA – melanoma differentiation-associated
 MDSC – myeloid-derived suppressor cell
 Met-tRNA – Methionyl-tRNA
 MF – Mycosis Fungoides
 MHC – major histocompatibility complex
 miRNA – micro-RNA
 MM – Multiples Myelom
 MMM – Marginal Metallophilic Macrophages
 mORF – main open reading frame
 MP – Membranprotein
 mRNA – Boten- (messenger-)RNA
 mTOR – mammalian target of rapamycin
 NCR – Natural Cytotoxicity Receptor
 ncRNA – nicht-proteincodierende RNA
 ncRNA – non-coding RNA
 NF- κ B – Nuclear Factor, Kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells
 NGD – no-go mRNA decay – No-go-mRNA-Abbau
 NHL – Non-Hodgkin-Lymphom
 NK – Natürliche Killerzelle
 NKG – Natural Killer Group
 NMD – nonsense-mediated mRNA decay – Nonsense-vermittelter mRNA-Abbau
 NSD – non-stop mRNA decay – Non-Stopp-mRNA-Abbau
 OAS – Oligoadenylatsynthase
 OR – Olfactory Receptor
 ORF – open reading frame
 OSCAR – Osteoklast-Assoziierter Rezeptor
 OVA – Ovalbumin
 PABP – Poly(A)-bindendes Protein
 PCNA – Proliferating-Cell-Nuclear-Antigen
 PCR – polymerase chain reaction – Polymerase-Kettenreaktion
 PD – Programmed Cell Death
 PERK – protein kinase RNA-like ER-kinase (ER – Endoplasmatisches Retikulum)
 PI3K – Phosphoinositid-3-Kinase
 PIC – Präinitiationskomplexes
 PKR – protein kinase RNA-activated Receptor
 prä-mRNA – Vorläufer-mRNA
 PRR – pattern recognition receptors

PTC – premature termination codon – Stoppcodon
PTM – posttranslationale Modifikation
RANTES – Regulated on Activation Normal T-cell Expressed and Secreted
RF – Release Factor
RHS – Retikulohistiozytäres System = RES – Retikuloendotheliales System
RIG – Retinoic-acid-inducible gene
RLR – Retinoic-acid-inducible gene-like receptor
RNA – Ribonukleinsäure
ROS – Reactive Oxygen Species
rRNA – ribosomale RNA
RTF – regulatorische Transkriptionsfaktor
SAM – S-Adenosyl-Methionin
SAM – self-amplifying mRNA
scRNA – small cytoplasmic RNA
SIDS – Sudden Infant Death Syndrom
SLE – Systemischer Lupus Erythematodes
snoRNA – small nucleolar RNA
snRNA – small nuclear RNA
SRP – signal recognition particle
SS – Sézary Syndrom
ssRNA – single-stranded RNA
STAT – Single Transducer and Activator of Transcription
SZT – Stammzelltransplantation
TAA – tumor associated antigen
TAB - transporter associated with antigen processing
TARM – T-cell interacting Activating Receptor on Myeloid cells
TBP – TATA-Box bindendes Protein
TF – Transkriptionsfaktor
TGF – transforming growth factor
TH – T-Helfer-Zelle
TIS – translation initiation site
TLR – Toll-like receptor
TNF – tumor necrosis factor
TNFRSF – tumor necrosis factor receptor superfamily member
TPM – transcripts per kilobase million
TREM1 – Trigger-Receptor Expressed on Myeloid cells
tRNA – Transfer-RNA
TRP – Transient Receptor Potential
TSS – Transkriptionsstartstelle
uORF – upstream open reading frame
UPR – unfolded protein response
UTR – untranslated region
VCE – Vaccinia Virus Capping Enzyme
ZNS – zentrales Nervensystem

Abbildungsverzeichnis

| | |
|--|----|
| Abbildung 1: Bausteine von Nukleinsäuren | 4 |
| Abbildung 2: Nukleotide in der RNA | 5 |
| Abbildung 3: Die DNA-Doppelhelix | 6 |
| Abbildung 4: Drei RNA-Gruppen | 7 |
| Abbildung 5: Struktur des offenen Präinitiationskomplexes (PIC) und Initiation der Transkription | 11 |
| Abbildung 6: Verschiedene Varianten des Spleißprozesses | 12 |
| Abbildung 7: Der Initiationskomplex | 14 |
| Abbildung 8: Die entstehende Kette hängt an der Aminoacyl-Bindungsstelle | 15 |
| Abbildung 9: Termination der Proteinsynthese | 15 |
| Abbildung 10: Die CpG-Insel | 19 |
| Abbildung 11: Räumliche Positionierung proximaler und distaler regulatorischer Elemente zum Promotor | 20 |
| Abbildung 12: Abbauwege der mRNA | 23 |
| Abbildung 13: mRNA in-vitro-Transkription und angeborene Immunreaktion | 31 |
| Abbildung 14: Die Struktur der synthetischen Kappe | 33 |
| Abbildung 15: Mittlere Gesamtexpressionsverteilung aller Gene pro Gewebetyp | 45 |
| Abbildung 16: Anzahl der überexprimierten Gene pro Gewebe | 50 |
| Abbildung 17: Gewebeverteilung der überexprimierten proteincodierenden Gene | 51 |
| Abbildung 18: Expressionsprofil des NCR2-Gens | 54 |
| Abbildung 19: Expressionsprofil des LGALS14-Gen | 56 |
| Abbildung 20: Expressionsprofil des LIM2-Gens | 59 |
| Abbildung 21: Expressionsprofil des CABP5-Gens | 61 |
| Abbildung 22: Expressionsprofil des OR51G2-Gens | 62 |
| Abbildung 23: Expressionsprofil des CCR8-Gens | 65 |
| Abbildung 24: Expressionsprofil des CCR3-Gens | 68 |
| Abbildung 25: Expressionsprofil des C17orf99-Gens | 70 |
| Abbildung 26: Expressionsprofil des TREML4-Gens | 72 |
| Abbildung 27: Expressionsprofil des CD300LD-Gens | 74 |
| Abbildung 28: Expressionsprofil des TARM1-Gens | 76 |
| Abbildung 29: Expressionsprofil des OR51B2-Gens | 78 |

Tabellenverzeichnis

| | |
|---|----|
| Tabelle 1. ENSEMBL Kategorisierung der unterschiedlichen Gen-Loci | 46 |
| Tabelle 2. Anzahl der exkludierten Gentypen..... | 48 |
| Tabelle 3. Übersicht aller gefundenen Gene..... | 49 |
| Tabelle 4: Überblick – NCR2 | 53 |
| Tabelle 5: Überblick – LGALS14 | 56 |
| Tabelle 6: Überblick – LIM2 | 58 |
| Tabelle 7: Überblick – CABP5 | 60 |
| Tabelle 8: Überblick – OR51G2 | 62 |
| Tabelle 9: Überblick – CCR8 | 63 |
| Tabelle 10: Überblick – CCR3 | 66 |
| Tabelle 11: Überblick – C17orf99 | 69 |
| Tabelle 12: Überblick – TREML4 | 71 |
| Tabelle 13: Überblick – CD300LD | 73 |
| Tabelle 14: Überblick – TARM1 | 75 |
| Tabelle 15: Überblick – OR51B2 | 76 |

1 Einleitung

Seit der COVID19-Pandemie sind die mRNA-Impfstoffe in ein breites öffentliches Interesse gerutscht, dabei wird schon jahrelang an dieser Methode für den Gebrauch im onkologischen Bereich geforscht. Die ersten Erfolge zur Durchführbarkeit der mRNA-Impfung liegen mittlerweile fast 30 Jahre zurück (1). Die Internationale Agentur für Krebsforschung (IARC – International Agency for Research on Cancer) berichtete von einem signifikanten Anstieg der weltweiten Krebserkrankungen auf der Grundlage von verfügbaren Daten von 2022 und rechnet mit einer weiteren Zunahme über die nächsten Jahre hinweg (2). Ebenso ist das Auftreten von hämatologischen Malignomen in den letzten Jahrzehnten angestiegen (3). Nach wie vor stellt die Krebstherapie die medizinische Forschung vor eine große Herausforderung und bringt sie an ihre Grenzen. Doch was macht die Therapie des Krebses, vor allem im Bereich der Hämatonkologie, eigentlich so schwer?

Maligne Proliferationen bestehen aus Zellen, welche losgelöst von den Kontrollmechanismen des Körpers autonom wachsen und sich ungebremst vermehren können, wobei sie andererseits aber trotzdem in der Lage sind, mit physiologisch funktionierenden Zellen in ihrer Umgebung zu interagieren, um aus ihnen weitere Vorteile ziehen zu können. Auf diese Weise bauen sie eine Art ‚Schutzwall‘ um sich auf, welcher sie zugleich mit verschiedenen Stoffen versorgen und gleichzeitig gegen die Umgebung abschirmen kann (4). Diese sogenannte Tumormikroumgebung setzt sich aus verschiedenen Zelltypen wie Stromazellen, Fibroblasten, Immunzellen und Endothelzellen zusammen (5). Die Ursache dieser Zellveränderungen basiert größtenteils auf einem instabilen Genom, welches für Mutationen aber auch chromosomale Umlagerungen anfällig ist, weshalb Fähigkeiten erworben werden, mit denen die entarteten Zellen die physiologischen Schutz- und Abwehrmechanismen umgehen können (6). Neuere Untersuchungen zeigen, dass vor allem Leukämien und Lymphome epigenetische Veränderungen durch ein abnormes Methylierungsmuster oder eine abnorme Histondeacetylase-Expression aufweisen (3). All diese Instabilitäten verleihen den neoplastischen Zellverbänden eine sehr große Heterogenität an molekularen Merkmalen. Zu dieser Komplexität hinzu kommt die histologische Variation bzw.

die unterschiedliche Zell- und Gewebebiologie (7), infolgedessen ist die individuelle Therapie äußerst schwierig (3).

Hämatonkologische Erkrankungen gehören zu den am häufigsten vorkommenden Krebserkrankungen überhaupt. Zu ihnen zählen vor allem die Leukämien, die Lymphome und das Multiple Myelom, mit häufigen Rezidiven und Erreichung eines therapierefraktären Zustandes (3,8). Sie entstehen durch klonale Proliferationen eines Zelltypus, welche durch ungenügende Differenzierung meist nicht mehr funktionstüchtig sind, im Blut, im Knochenmark und im Lymphsystem (9). Infolge können sie alle Organe mitbefallen, weshalb ihre klinische Manifestation sehr unterschiedlich ausfällt. Zu den häufigsten Symptomen zählen die Lymphadenopathie, eine gestörte/ingeschränkte Blutbildung, B-Symptomatik sowie die Splenomegalie (8).

In vergangener Zeit hat sich im Bereich der Hämatonkologie bezüglich ihrer Therapiemöglichkeiten einiges getan (10). Abgesehen von Chemotherapien und Bestrahlungen, welche zwischen gesunder und kranker Zelle nicht differenzieren können und daher mit starken Nebenwirkungen und mit einem hohen Risiko zur Entwicklung späterer Neoplasien verbunden sind, aber auch den Stammzelltransplantationen (SZT), stehen mittlerweile weitere Therapien zur Verfügung (8,11). Die neuen Therapien verfolgen das Ziel, durch einen spezifischen Ansatz an molekularen Schlüsselstrukturen, nicht den gesamten Organismus, sowie das Immunsystem, welches im Kampf gegen den Krebs eine wichtige Funktion übernehmen kann, anzugreifen, sondern vielmehr die körpereigene Antitumoraktivität zu stimulieren (12).

Zu den jüngeren Therapien gehören beispielsweise die Monoklonalen Antikörper (mABs). Diese sorgen entweder für die Vernichtung einer ganzen Zelle durch Bindung an ein spezifisches Antigen oder blockieren bestimmte Überträgersignale, welche proliferativ oder wachstumsfördernde Eigenschaften zeigen (12). Vor allem die Checkpoint-Inhibitoren wie Cytotoxic T Lymphocyte Antigen 4 (CTLA-4), Programmed Cell Death 1 (PD-1) und seine Liganden PD-L1 und -L2, welche von Tumor-infiltrierenden Lymphozyten aber auch von einigen Tumorzellen selbst exprimiert werden, waren ein großer Durchbruch in der Krebstherapie, da durch diese ein Überschreiten der Zellzykluskontrollpunkte verhindert werden konnte (12). Auch der chimäre Antigenrezeptor (CAR), ein speziell aus verschiedenen Anteilen angefertigter Antigenrezeptor, der an eine auserwählte Zielstruktur auf

der Oberfläche von Tumorzellen binden kann und in T-Zellen integriert wird (13), und die Adoptive T-Zell-Therapie sind vielversprechend, jedoch auch recht aufwendig in ihrer Herstellung und unflexibel gegenüber kleiner Abänderungen (12).

Die mRNA-Krebsimpfung bietet hier eine einzigartige Möglichkeit. Sie vereint die zielgerichtete Therapie mit einer gleichzeitigen Flexibilität bezüglich gewisser Modifizierungen und kann weiters kostengünstig in großen Mengen hergestellt werden (14). Diese Impfung liefert den Immunzellen eine Antigen-Vorlage und wirkt durch eine rezeptorvermittelte Ausschüttung von Typ-I-Interferon und anderen proinflammatorischen Zytokinen immunstimulierend über einen selbstlimitierenden Zeitraum (15). Eine beträchtliche Menge an klinischen Studien vor allem in Nordamerika, Europa und Ostasien werden zu dieser Therapieform bereits geführt (16). Obwohl die derzeitigen Ergebnisse von einigen präklinischen Studien und mehreren Pilotstudien sehr vielversprechend sind, ist jedoch die Wirksamkeit stark von der individuellen Immunantwort abhängig (16).

Aufgrund dieser Vorteile dient diese Arbeit der Identifizierung von neuen potenziellen Zielstrukturen für mRNA-Impfstoffe in der Therapie von hämatologischen Malignomen. Hierfür wurden der komplette Datensatz von gewebsspezifischen Genen von der öffentlich zugänglichen Datenbank Genotype-Tissue Expression (GTEx) Portal heruntergeladen. Die Analyse erfolgte mittels R, sowie mittels BiomaRt. Die mittlere Gesamtexpressionsverteilung aller Gene pro Gewebetyp wurde ermittelt, während die Gene mit sehr hohen Expressionsraten in unerwünschten Regionen exkludiert wurden. Anschließend wurden der Datensatz auf die Gene reduziert, die eine hohe singuläre Genexpression aufwiesen und nur mehr proteincodierende Gene übrig blieben.

Im Anschluss wurde PubMed nach Publikationen zu jedem einzelnen Gen durchforstet und dessen physiologische Funktion, dessen Rolle in Neoplasien und dessen Expression in Tumorgewebe und gesunden körpereigenen Gewebe zusammengefasst und kurz beschrieben. Die Beurteilung, ob ein Gen überhaupt als Zielstruktur in Frage kommen kann und welche der Gene sich als vorteilhafter hinsichtlich Nebenwirkung erweisen könnten, wird anhand der gesammelten Informationen eigenständig beurteilt.

2 Die genetische Information

Unser gesamtes Erbgut, welches eine Länge von ca. zwei Metern ausmacht, befindet sich gut verstaut und gebunden an Proteine in einem zehn Mikrometerraum: dem Zellkern (17). Es liegt in gewisser Weise als codierte Information vor, da die Anordnung der Basen Aufschluss über die erwünschte Aminosäure gibt, die in ein Protein eingebaut werden soll. Da diese Basen in einer bestimmten Reihenfolge abgelesen werden müssen - damit sie die fehlerfreie Information überbringen können - bedarf es einer festen Anordnung (18).

2.1 Das Grundgerüst der DNA und der RNA

Sowohl die Desoxyribonukleinsäure (DNA) als auch die Ribonukleinsäure (RNA) sind aufgebaut aus einer Aneinanderreihung von Nukleotiden, die aus drei Bausteinen, einer Base, einem Zucker und einem Phosphatrest, bestehen (19).

(Abbildung 1)

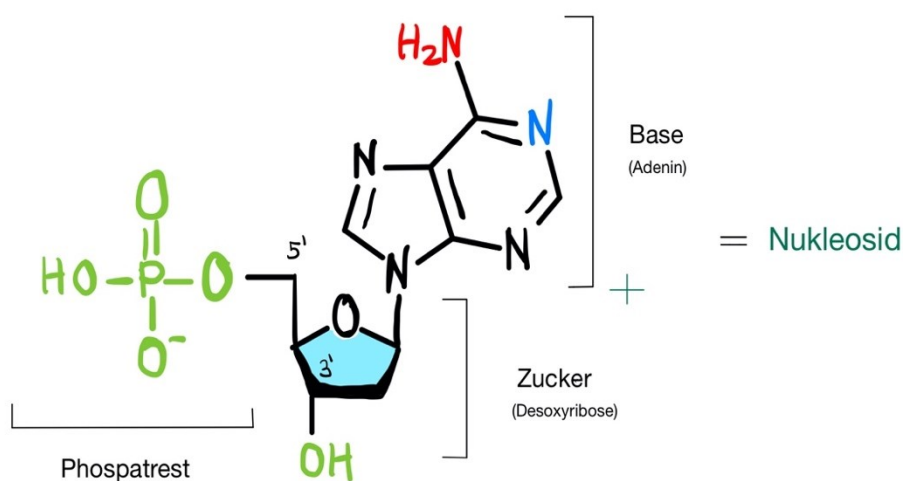


Abbildung 1: Bausteine von Nukleinsäuren.

Desoxyadenosinmonophosphat bestehend aus einem Nukleosid (Zucker und Base) und einem Phosphatrest (17).

Am C1-Atom der Ribose ist stets die Base über eine N-glykosidische Verbindung angehängt, während die Verknüpfungen der Nukleotide mit den Phosphatresten über die Hydroxygruppen am 5'- und am 3'-Atom, stattfinden. Hier bilden sich energiereiche Esterbindungen aus. An den endständigen Nukleotiden sind

hingegen weder die Hydroxygruppe des Zuckermoleküls am 3'- noch das Phosphat am 5'-Ende verestert, weshalb der Strang eine Richtung aufweist (17,19). (Abbildung 2)

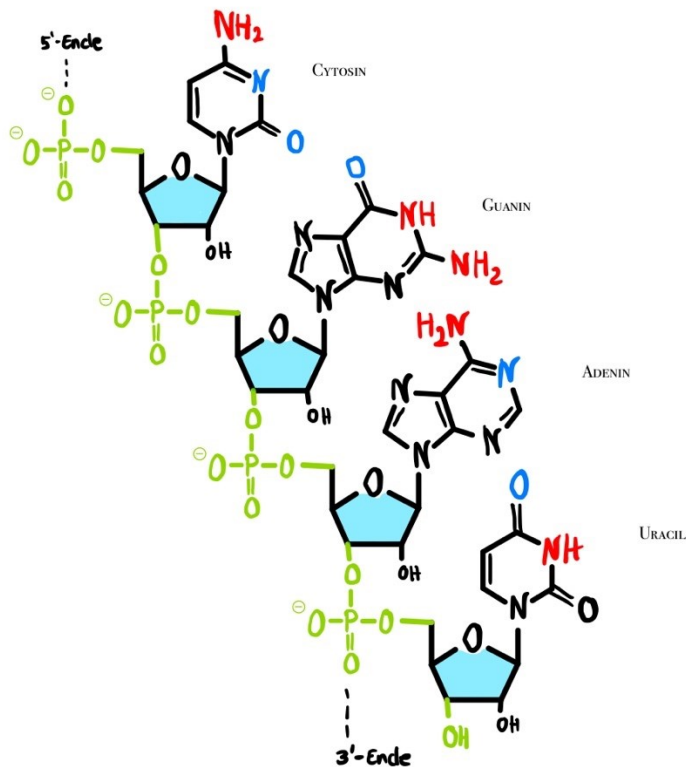


Abbildung 2: Nukleotide in der RNA. Ein Nukleotid besteht aus einem C5-Zucker, der Ribose, einer Phosphatgruppe und einer der vier Basen Adenin, Guanin, Cytosin und Uracil (17).

2.2 Die DNA

Die DNA trägt ihre Information in der Anordnung der Basen, von denen ihr vier zur Verfügung stehen: die Pyrimidinbasen, Thymin und Cytosin, und zum anderen die Purinbasen, Adenin und Guanin (17,18). Außerdem besitzt sie als Zucker eine Desoxyribose, die am C2-Atom anstelle einer weiteren Hydroxygruppe, wie bei der Ribose, nur ein Wasserstoffatom trägt und daher in reduzierter Form vorliegt. Dieser Unterschied verleiht dem Molekül eine größere Stabilität, welche biologisch Sinn macht, da in der DNA die gesamte genetische Information gespeichert bleiben muss (17).

Darüber hinaus bildet die DNA eine stabile Struktur aus: die Doppelhelix. Sie sorgt dafür, dass die Basen geschützt und weniger exponiert vorliegen als bei der RNA.

Dabei legen sich jeweils zwei Nukleotidstränge antiparallel aneinander, wodurch sich ein intermolekularer Doppelstrang bildet. Diese Anlagerung entsteht durch die sich ausbildenden Wasserstoffbrücken zwischen den komplementären Basen, jeweils zwei zwischen Adenin und Thymin und drei zwischen Guanin und Cytosin. (Abbildung 3A) Es kommt aufgrund von intermolekularen Kräften (Wasserstoffbrücken, Stacking) zu einer Verdrillung der beiden Stränge und daher zur Ausbildung einer Doppelhelix, ähnlich einer Wendeltreppe (19). (Abbildung 3B)

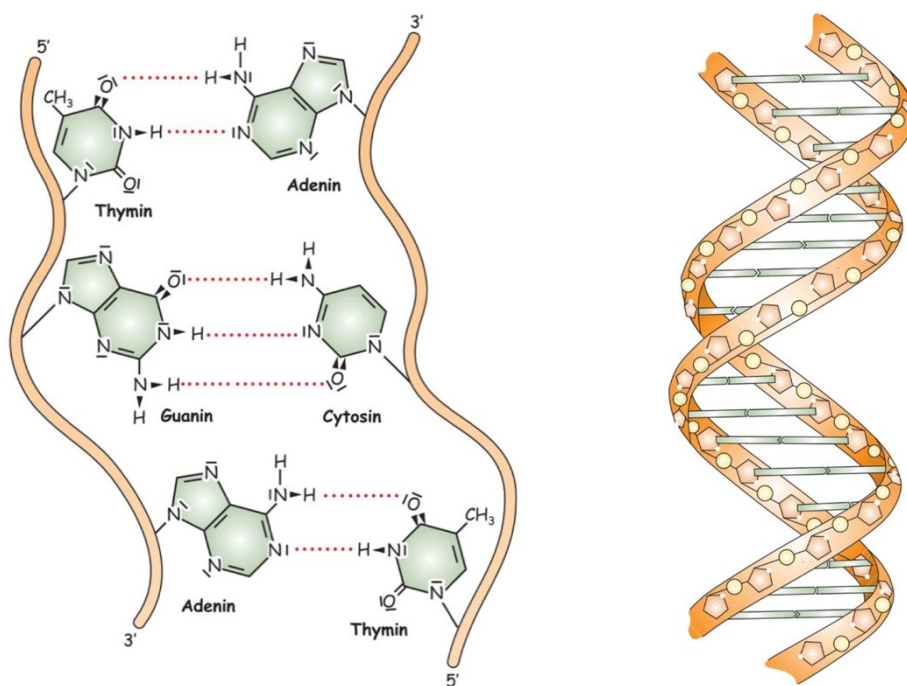


Abbildung 3: Die DNA-Doppelhelix

A) Die Basenpaarung in der DNA-Doppelhelix: In der DNA lagern sich die Basen paarweise im Innern einer Doppelhelix zusammen, was aus sterischen Gründen eine sehr regelmäßige Struktur ergibt (18).

B) Die DNA-Doppelhelix: Jedes DNA-Molekül besteht aus zwei DNA-Strängen, die sich zu einer Doppelhelix verdrillt umeinanderwinden (18).

2.3 Die RNA

Die RNAs werden durch Transkription über verschiedene Polymerasen im Zellkern synthetisiert und bestehen aus den gleichen Bausteinen wie die DNA. Sie liegen hauptsächlich als Einzelstrang vor, können jedoch auch doppelsträngige, allerdings vorwiegend intramolekulare, Strukturen ausbilden. Außerdem gibt es

zwei weitere Unterschiede: Der verwendete Zucker ist die Ribose, der eine weitere Hydroxygruppe am C2-Atom trägt, und die Base Uracil bildet die komplementäre Base zum Adenin, anstelle des Thymins (17–19).

Man unterscheidet grob zwischen der einzigen proteincodierenden RNA, der mRNA, und den nicht-proteincodierenden RNAs (ncRNAs) mit den bekanntesten Vertretern, der Transfer-RNA (tRNA) und der ribosomale RNA (rRNA), welche als Schlüsselemente in der Proteinbiosynthese fungieren (17,18). Übersichtshalber lassen sich alle RNAs, wie in *Abbildung 4* gezeigt, in drei große Gruppen teilen:

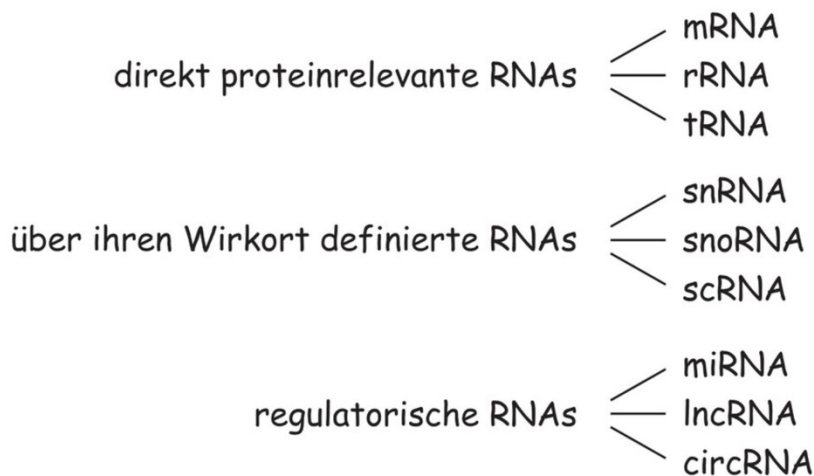


Abbildung 4: Drei RNA-Gruppen (18).

mRNA: Boten-RNA, **rRNA:** ribosomale RNA, **tRNA:** Transfer-RNA, **snRNA:** kleine nukleare RNA, **snoRNA:** kleine nukleoläre RNA, **scRNA:** kleine zytoplasmatische RNA, **miRNA:** Mikro-RNA, **lncRNA:** lange nicht codierende RNA, **circRNA:** zirkuläre RNA.

2.3.1 Direkt proteinrelevante RNAs

Zu den direkt proteinrelevanten RNAs, also den RNAs, die eine Schlüsselfunktion in der Proteinbiosynthese übernehmen, gehören die proteincodierende mRNA, die das Rezept des Proteins enthält, die tRNA, welche die Aminosäuren transportiert, und die rRNA, die den Syntheseort darstellt (18).

2.3.2 Kleine RNAs – sRNAs

Die kleinen RNAs lassen sich nach ihrem jeweiligen Funktionsort einteilen. Zwei von ihnen befinden sich im Zellkern, die kleine nukleare RNA (snRNA – small nuclear RNA), die beim Herausschneiden der Introns (beim Spleißen) involviert sind, und die kleinen nukleolären RNAs (snoRNA – small nucleolar RNA), die im

Nukleolus an dem Aufbau der ribosomalen Untereinheiten beteiligt sind. Die kleine zytoplasmatische RNA (scRNA – small cytoplasmic RNA), die im Zytoplasma lokalisiert ist, ist mitverantwortlich für das Dirigieren der Proteine, die den sekretorischen Weg einschlagen. Sie ist daher ein Teil des Signalerkennungspartikels (SRP) und für den Proteinabbau in den Proteasomen mitverantwortlich (18).

2.3.3 Regulatorische RNAs

Die regulatorischen RNAs bilden mittlerweile eine riesige Gruppe, die aufgrund zunehmender Forschung immer mannigfaltiger wird. In Anbetracht der großen Vielfalt und der beträchtlichen Anzahl an Funktionen werden in diesem Kapitel nur kurz die Mikro-RNAs (miRNAs), die eine Rolle in der Regulation der Genexpression spielen und die Translation einbremsen können, die langen nicht codierenden RNAs (lncRNA) mit sehr vielen verschiedenen Aufgaben, und die zirkulären RNAs (circRNA), von denen man annimmt, dass sie die miRNAs beeinflussen, erwähnt (18).

3 Die Proteinbiosynthese

Um den Mechanismus der mRNA-Impfung verstehen zu können, ist es notwendig einen näheren Blick auf die Proteinbiosynthese zu werfen. Dieser Prozess beginnt mit der Transkription (das Umschreiben) der DNA in die Vorläufer-mRNA (prä-mRNA), die sich einigen Modifikationen unterziehen muss, damit aus ihr schließlich die reife mRNA entsteht, die den Zellkern verlassen kann und an den Ribosomen zum Protein translatiert wird (17–19).

3.1 Transkription

Die Transkription ist der erste Schritt auf dem Weg zur Entstehung eines Proteins, aber auch zur Herstellung anderer Nukleinsäuren, wie rRNA, tRNA und anderer kleiner RNAs. Sie alle werden mithilfe von drei verschiedenen Polymerasen in eukaryotischen Zellen anhand einer sich auf einem DNA-Strang befindenden Vorlage synthetisiert (17–19). Jede der Polymerasen ist im Zellkern lokalisiert und erkennt ihren eigenen sogenannten Promotor, die Start-Sequenz für ein bestimmtes Gen, und arbeitet daher sehr spezifisch (17). Die Polymerase I ist zuständig für die Synthese von drei Bausteinen der Ribosomen, die 28S-, die 18S- und die 5,8S-rRNA, die Polymerase III hingegen für die Bildung der 5S-rRNA, die tRNA und andere snoRNAs. Die Polymerase II synthetisiert snRNAs, Inc-RNAs, micro-RNAs und alle prä-mRNAs, die Vorläufermoleküle der mRNA, welche aufgrund der Thematik dieser Arbeit im Vordergrund steht (17).

3.1.1 Polymerase II – Transkription

Die Einführungsphase, die **Initiation**, beginnt mit der Bildung des Präinitiationskomplexes (PIC) am Promotorelement des Matrizenstranges, welcher den Startpunkt eines proteincodierenden Gens markiert und im Basenpaarbereich -26 und -34 vor der Transkriptionsstartstelle (TSS) +1 positioniert ist (17,18). Ein Hilfsprotein, das TATA-Box bindende Protein (TBP), ermöglicht durch ein Beugen der DNA die Anlagerung anderer Transkriptionsfaktoren (TF), wie TFIID, TFIIA und TFIIB, an den Promotor (20), in diesem Fall an die sogenannte TATA-Box. Außerdem wird die Polymerase II, welche von TFIIF gebunden ist, herangetragen, woraufhin TFIIE und TFIIH folgen. Der Zusammenbau des PIC ist nun

fertiggestellt (17,21). (*Abbildung 5*) Infolgedessen katalysiert TFIIH zwei Reaktionen, zum einen die durch die Adenosintriphosphatase (ATPase) und die Helikase ausgelöste Entwindung des doppelsträngigen DNA-Segments und somit die partielle Freilegung des jeweiligen Gens, zum anderen durch eine Phosphorylierung am Heptamer-Repeat der C-terminalen Domäne (CTD) der Polymerase II eine Anbindung dieser am Startnukleotid +1. Durch die Verknüpfung der beiden ersten Ribonukleosidtriphosphate kann sich die Polymerase II vom Promotorkomplex lösen und mit der Transkription beginnen (17).

In der **Elongations**phase spaltet die Polymerase II die Doppelhelix in Laufrichtung auf, während Helikasen und Topoisomerasen Bruchstellen in der DNA verhindern, und wandert entlang des Matrizenstranges in 3'-5'-Richtung. Sie fügt durch Polymerisation in 5'-3'-Richtung unter Pyrophosphatabspaltung und unter Ausbildung eines RNA-DNA-Hybrids, welches aus ca. 8 Basenpaaren besteht und für den Kontakt zum Matrizenstrang sorgt, die komplementären Ribonukleotide an das 3'-OH-Ende des entstehenden prä-mRNA-Stranges (17,19). Diese Polymerisation wird über das DNA-Stoppcodon (TAG, TAA, TGA) hinaus fortgesetzt, bis am 3'-RNA-Ende die Polyadenylierungssequenz erscheint. Dieses Signal leitet die **Terminations**phase ein. Es kommt zur Polyadenylierung, das Anfügen des Poly(A)-Schwanzes und zur Ablösung der RNA von der DNA (17).

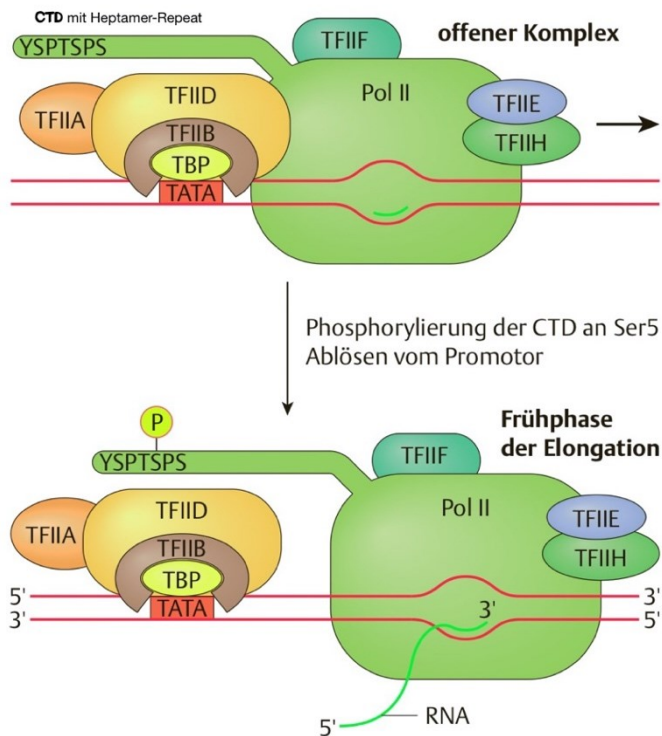


Abbildung 5: Struktur des offenen Präinitiationskomplexes (PIC) und Initiierung der Transkription. Oben: offener Transkriptionskomplex mit lokaler Aufschmelzung der DNA-Doppelhelix an der Transkriptionsstartstelle. Unten: Phosphorylierung der CTD der Pol II an Ser5 (grüner Phosphatrest) durch TFIIH erlaubt die Ablösung der Pol II vom Promotor. TBP, TFIIA, TFIIB und TFIID bleiben zurück. Die erste Ribonukleotidverknüpfungen der endstehenden prä-mRNA werden synthetisiert (17).

3.1.2 prä-mRNA- Prozessierung

Wie bereits zuvor erwähnt ist das transkribierte Produkt die Rohform der mRNA, welches erst durch gewisse Modifikationen zur Reifung gelangt. Diese Veränderungen entstehen entweder noch im selben Zeitfenster wie die Polymerisation selbst oder direkt im Anschluss (17–19).

Am 5'-Ende wird die mRNA mit einer 7-Methylguanosinkappe (m^7G), der 5'-Cap, versehen, welche der mRNA mehr Stabilität verleiht und am Spleiß-Vorgang beteiligt ist. Des Weiteren spielt sie eine Rolle bei der Translationsinitiation, auf die im späteren Kapitel näher eingegangen wird (17,19).

Am 3'-Ende hingegen kommt es, ausgelöst durch das Auftreten des Polyadenylierungssignals auf der prä-mRNA, zur Bildung des Poly(A)-Schwanzes durch mehrerer aufeinanderfolgender Adeninreste. Auch diese Anpassung sorgt für eine erhöhte Stabilität und ist beteiligt am

nukleozytoplasmatischen Transport der reifen mRNA (17,19). Durch die letzte Prozessierung, das Spleißen, werden die Introns, die nicht-codierenden Anteile der mRNA, durch Spleißosomen, bestehend aus snRNAs mit katalytischer Funktion und Proteinen, die die Exon-Intron-schnittstellenanzeigenden Konsensus-Sequenzen erkennen, aus der RNA herausgeschnitten und die Exons, die die Information für das Protein enthalten, wieder zusammengesetzt (17,19). Da aus einem Gen jedoch verschiedene Produkte entstehen können, existieren sogenannte fakultative Exons und Introns, die wahlweise aus dem Ribonukleotidstrang entfernt werden können, das sogenannte cis-Spleißen, und somit das alternative Spleißen erlauben. (Abbildung 6a) Darüber hinaus ermöglicht das trans-Spleißen durch das Einfügen von Exonduplikaten oder durch das Zusammenfügen von Exons aus verschiedenen Genen weitere Optionen zur Herstellung verschiedener Proteine (17). (Abbildung 6b,c,d)

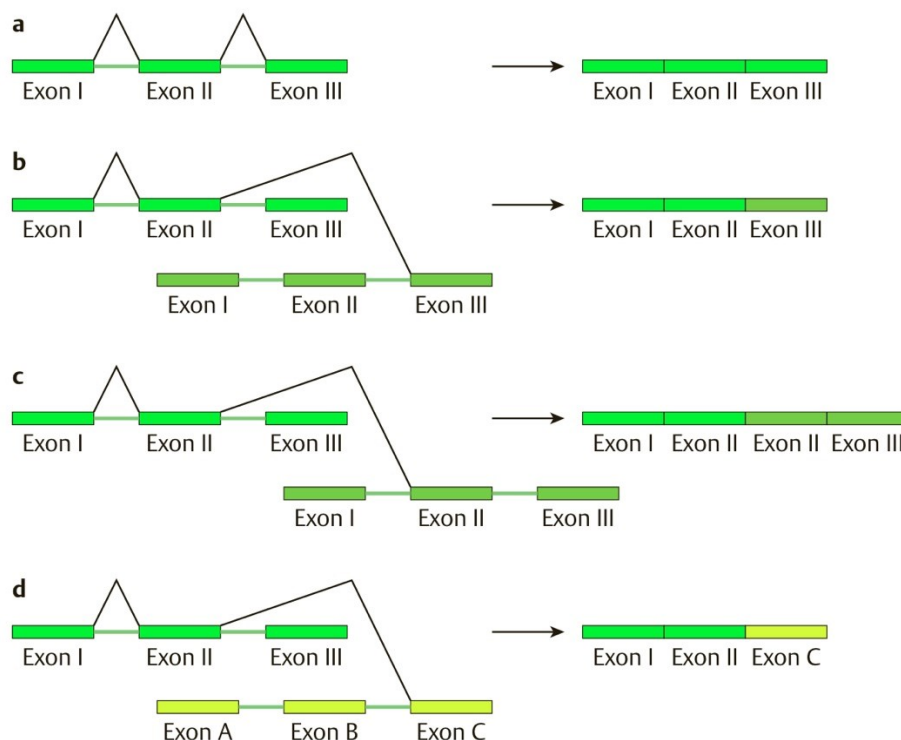


Abbildung 6: Verschiedene Varianten des Spleißprozesses. a) cis-Spleißen bezeichnet das Entfernen von Introns innerhalb einer prä-mRNA, **b) trans-Spleißen** zwischen zwei prä-mRNAs desselben Gens, **c) trans-Spleißen** zwischen zwei prä-mRNAs desselben Gens mit der Duplikation eines Exons, **d) trans-Spleißen** zwischen zwei prä-mRNAs verschiedener Gene (17)

3.2 Translation

Sobald aus der prä-mRNA die reife mRNA entstanden ist, wird sie durch die Kernporen aus dem Zellkern durch ein aktives Transportsystem hinausgeschleust. Je nach Funktion des zukünftigen Proteins kann die mRNA dann auf zwei verschiedene Wege weitergeschickt werden. Ist sie mit einer Signalsequenz, einem N-terminalen Signalpeptid, ausgestattet, wird sie kurz nach dem Translationsstart von einem Signalerkennungspartikel (SRP) erkannt, gebunden und daraufhin über ein Translokon direkt in das Endoplasmatische Retikulum (ER) hinein translatiert. Ist die mRNA nicht durch ein SRP gekennzeichnet, wird aus ihr an freien Ribosomen direkt im Zytoplasma ein Protein hergestellt (17,18).

Auch die Translation lässt sich in die Initiation, Elongation und Termination teilen (17–19).

3.2.1 Initiation

Um die Translation in Gang zu setzen, bedarf es der Bildung eines Initiationskomplexes, welcher sich aus verschiedenen Komponenten zusammensetzt. Es wird zunächst die kleine ribosomale Untereinheit (40S), welche zu diesem Zeitpunkt noch für die 60S-Untereinheit blockiert ist, mit einem dreiteiligen Komplex, bestehend aus der methionintragenden Initiator-tRNA, einem eukaryotischen Initiationsfaktor (eIF) und einem energiereichen Guanosintriphosphat (GTP), welches die Anlagerung der großen ribosomalen Untereinheit ermöglicht, versehen (17,18). Die gewünschte mRNA, gebunden über ihre 5'-Cap-Struktur an einen weiteren eIF, wird herangetragen und verbindet sich mit dem entstehenden Komplex, welcher nun an dem Nukleotidstrang entlangleitend das komplementäre Basentriplett AUG der im Peptidylbereich (P-Bereich) der 40S-Untereinheit lokalisierten Initiator-tRNA auffindet und infolgedessen die Bindung der 60S-Untereinheit veranlasst (17). (*Abbildung 7*)

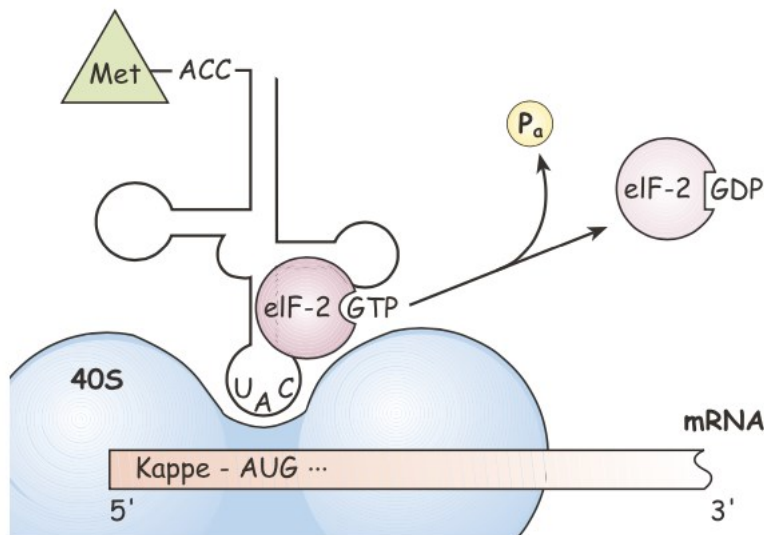


Abbildung 7: Der Initiationskomplex.

Starter-tRNA mit Methionin, eukaryotische Initiationsfaktor 2 (eIF2) durch Guanosintriphosphat (GTP) aktiviert, 40S ribosomale Untereinheit) sucht die mRNA nach dem Startcodon AUG ab. Sobald dieses aufgefunden ist, spaltet sich eIF2 samt dem hydrolysierten Guanosindiphosphat (GDP) ab (18).

3.2.2 Elongation

Die ribosomalen Untereinheiten haben sich zu einem funktionstüchtigen 80S-Ribosom zusammengebaut, welches das Basentriplett (das Codon) im Aminoacylbereich (A-Bereich) abliest und die Aminoacyl-tRNA mit dem passenden Anticodon und der entsprechenden Aminosäure am Akzeptorarm findet (17–19). Die Energie aus dem Guanosintriphosphat (GTP) des Initiationskomplexes wird freigesetzt und die neueingetroffene Aminosäure aus dem A-Bereich bildet über ihre Aminogruppe eine Säureamidbindung mit der Hydroxygruppe der Aminosäure aus dem P-Bereich und es bildet sich ein Dipeptid (17). (Abbildung 8) Der aus diesen Schritten bestehende Ablauf kann sich nun fortsetzen, da der A-Bereich für die neue Aminoacyl-tRNA freigemacht wird, indem die entleerte tRNA in den Ausgangsbereich, in den Exit-Bereich, und die tRNA mit der entstehenden Peptidkette in den P-Bereich rutscht, da sich das Ribosom um ein Basentriplett in 3'-Richtung verschiebt (17–19).

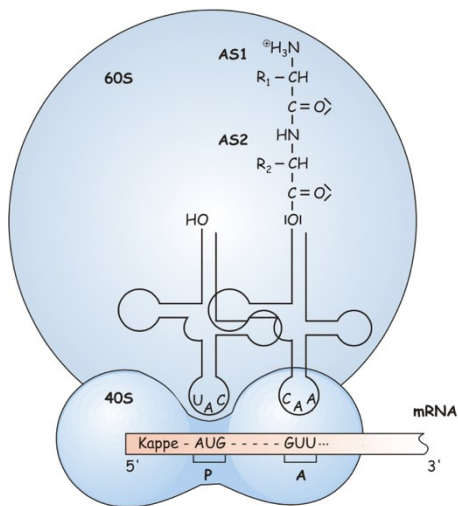


Abbildung 8: Die entstehende Kette hängt an der Aminoacyl-Bindungsstelle. Die Amino-Gruppe der Aminoacyl-tRNA greift die Esterbindung zwischen der Starter-tRNA und dem Methionin an. Entstehung einer neuen Peptidbindung, die entstehende Kette hängt nun an der Aminoacyl-Bindungsstelle (18)

3.2.3 Termination

Sobald auf der mRNA eines der Stoppcodons (UAA, UGA, UAG) in dem A-Bereich erscheint wird es von einem Freisetzungsfaktor (eRF – eucaryotic release factor) gebunden und es kommt zur hydrolytischen Spaltung der Esterbindung zwischen der tRNA und dem Peptid. Das Protein wird freigesetzt und das Ribosom zerfällt wieder in seine Untereinheiten (17). (Abbildung 9)

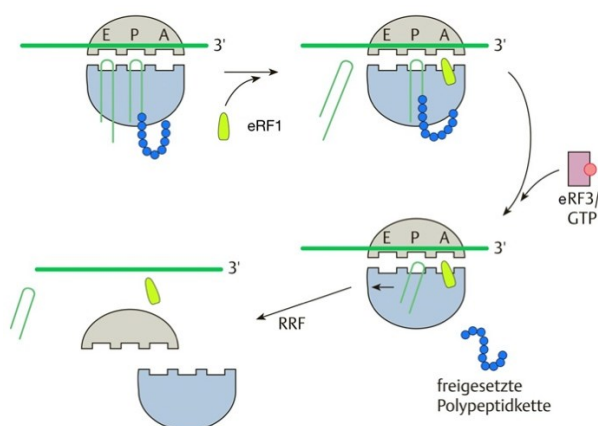


Abbildung 9: Termination der Proteinsynthese. Zum Stoppcodon gibt es kein passendes Anticodon auf einer tRNA. Durch die Terminationsfaktoren – Release Faktor – RF1, RF2 und RF3 wird das Protein durch die Loslösung der Peptidkette von der Peptidyl-tRNA freigesetzt (17).

3.2.4 Posttranslationale Modifikationen (PTM) und Transport

Wie bereits zuvor erwähnt, ermöglicht das Alternative Spleißen im Zellkern bereits die Entstehung einer Vielzahl möglicher Proteinvarianten aus einem codierenden Genabschnitt. Diese Variabilität wiederum kann durch Veränderungen im Anschluss der Translation noch immens erweitert werden (22). Proteine werden in ihrer Funktion zum einen strukturell durch Spaltungen, wie es beispielsweise bei Vorläuferhormonen der Fall ist, zum anderen durch variable Verzweigungen mithilfe von Isopeptidbindungen, vorwiegend zwischen Lysinresten, aber auch zwischen Glutamin- und Asparaginsäuren, verändert. Außerdem kann ein Protein durch die Verknüpfung mit Zuckerresten, die Glykosylierung, das Anhängen von lipophilen Anteilen wie Fettsäuren, und die Substitution verschiedener funktioneller Gruppen, schließlich funktionstüchtig gemacht werden und an seinen Zielort gelangen (17,19,22).

Sekretorische Proteine, die in die Peripherie geschickt werden, aber auch Transmembranproteine, welche mit einer Signalpeptidsequenz versehen sind, nehmen ihren Weg über das raue ER, wo sie direkt in das Lumen translatiert werden. Hier werden sie mit einem Zuckerrest über eine N-glykosidische Bindung am Asparaginrest versehen (19). Das Kohlenhydratgerüst kann an diesem Ort noch weiter verändert werden, bis es schließlich in den Golgi-Apparat gelangt und eventuell auch hier noch einmal glykolysiert (O-Glykolysierung) wird (19). Ebenso können sich im ER-Lumen Disulfidbrückenbindungen zwischen Cysteinresten ausbilden, die eine wichtige Rolle in der Faltung der Proteine spielen (17,19).

Durch gezielte Phosphorylierung und Dephosphorylierung kann zwischen zwei Funktionalitäten eines Proteins hin- und hergeschaltet werden, wodurch wiederum eine Vielzahl an biologischen Abläufen kontrolliert werden (19). Die Adenosintriphosphat (ATP)-abhängige Ubiquitinierung, das Anhängen eines Ubiquitins an Lysinreste, ist eine weitere Modifikation, mittels welcher diverse Prozesse wie Zelldifferenzierung, -wachstum und -proliferation gesteuert werden. Hierbei fungiert das Ubiquitin meist nicht als direktes Signal für eine bestimmte Funktion, sondern dient vielmehr als Vorläufer für die Addition oder das Entfernen anderer reversibler PTMs (22). Neben diesen Prozessierungen gibt es noch einige andere Möglichkeiten, wie unter anderem die Sulfatierung, Acylierung, Hydroxylierung und Adenylierung, das Anhängen von Adenosinmonophosphat (AMP), welche je nach Aufgabe der Proteine verschiedene Eigenschaften

verleihen (19). Zum Schluss sei noch die Methylierung und Acetylierung erwähnt, von denen man weiß, dass sie eine Rolle bei der Histon-Modifikation spielen und somit die Genexpression durch An- oder Abschalten eines Gens regulieren, wobei der genaue Mechanismus noch unklar ist (19).

4 Regulation der Genexpression

In unserem Körper gibt es mehr als 200 verschiedene Zelltypen, die genaugenommen dieselbe Grundstruktur besitzen, jedoch ganz unterschiedliche Zellverbände bilden und dementsprechend andere Aufgaben erfüllen müssen. Sie weisen schon sehr bald in ihrer Entwicklung ein spezifisches Genexpressionsschema auf, welches darüber bestimmt, wann, wieviel und welche Proteine hergestellt werden. Einige Gene werden grundsätzlich in allen Zellen gebraucht, die sogenannten konstitutiven Gene, auch Haushaltsgene, welche konstant gebildet werden. Induktive Gene hingegen, die in speziellen Situationen oder unter bestimmten Umständen benötigt werden und daher gezielt kontrolliert gehören, werden durch bestimmte Proteine und DNA-Sequenzen, die selbst wiederum von verschiedenen externen Faktoren beeinflusst werden, gezielt ein- oder ausgeschaltet (18). Diese Antwort auf Situationen wie zum Beispiel bestimmte Zellentwicklungsstadien, den Einfluss von Botenstoffen, wie Hormone, oder aber auch gewebespezifische Anforderungen kann auf unterschiedlichen Ebenen der Proteinentstehung stattfinden und erlaubt eine differenzierte Genexpression (18,19). Die Regulation der Entstehung eines Proteins auf früher Ebene ist effizienter und energiesparender als ein spätes Eingreifen, da auf diese Weise der Zelle einige kräfteraubende Schritte erspart bleiben können und eine Akkumulation von Abfallprodukten verhindert wird, die später entsorgt werden müssen (17–19).

4.1 Regulation durch DNA-Methylierung

Im gesamten Erbgut kommen Bereiche vor, die durch die DNA-Methyltransferasen mithilfe von S-Adenosyl-Methionin (SAM) methyliert werden können. Sie bestehen aus einem Cytosin-Guanin-Nukleotid-Paar, dessen Nachbarpaar die gleichen Aminosäuren spiegelverkehrt trägt und sich deshalb die Cytosin-Nukleotide schräg gegenüber liegen. Diese Bereiche werden CpG-Inseln genannt (*Abbildung 10*). Sie werden aufgrund ihrer Basenanordnung im Grunde destabilisiert, wodurch die Transkriptionsaktivität erhöht ist, jedoch kann durch eine Methylierung des Cytosins eine Verringerung der Expression des betroffenen Gens erreicht werden

(17). Dieses Methylierungsmuster ist größtenteils vererbt, kann sich allerdings unter bestimmten Einflüssen auch verändern (De-novo-Methylierung) (18,19).

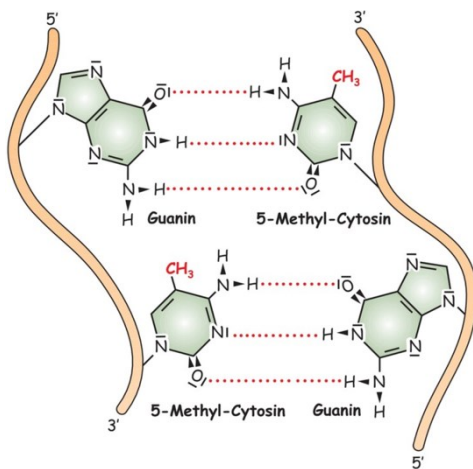


Abbildung 10: Die CpG-Insel.

Dinukleotid von einem Cytosin-Nukleotid, auf das ein Guanin-Nukleotide folgt. Ein Cytosin befindet sich dann schräg gegenüber, welches in dieser Konstruktion methyliert (CH₃) werden kann (18).

4.2 Regulation auf Transkriptionsebene

Auf dieser Ebene sind die regulatorischen Transkriptionsfaktoren (RTFs) von besonderer Bedeutung, welche zum einen an sogenannte Response-Elemente, die auf der DNA proximal des Promotors lokalisiert sind, oder zum anderen an cis-Elemente, die distal des Promotors liegen und sowohl Enhancer- als auch Silencer-Wirkung besitzen können, binden und somit über Cofaktoren die Transkriptionsrate sehr schnell auf intra- oder extrazelluläre Veränderungen hin beeinflussen können. Die cis-Elemente können durch die RTFs über Kontakt mit promotornahen generellen Transkriptionsfaktoren (GTFs) eine Art Schleifenbildung (Abbildung 11) herstellen und sind somit in der Lage, mit dem Promotor und der Polymerase in Verbindung zu treten und dadurch die Genproduktion zu verstärken (Enhancer), zu verringern oder vollkommen zu unterbinden (Silencer) (17,19).

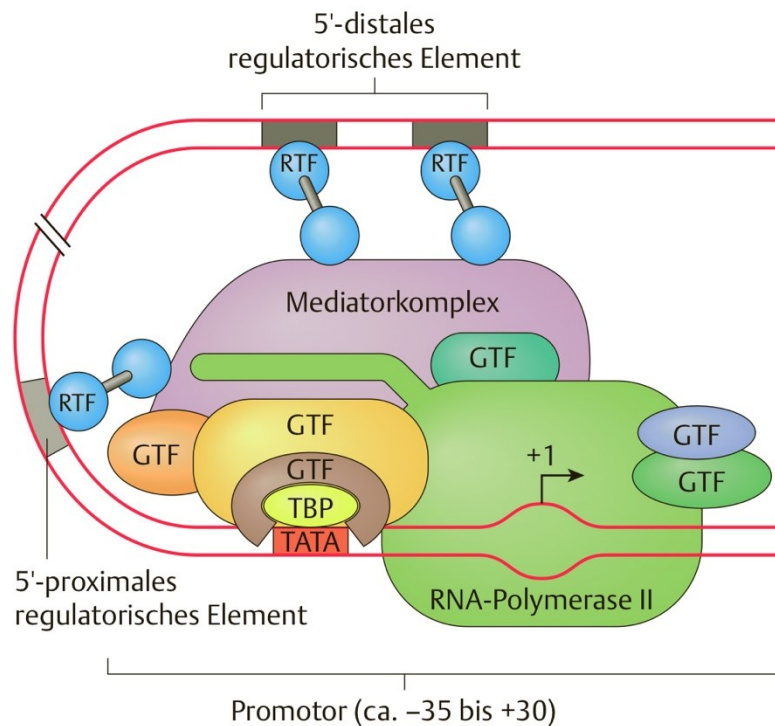


Abbildung 11: Räumliche Positionierung proximaler und distaler regulatorischer Elemente zum Promotor. Zwischen den enhancergebundenen Proteinen – den regulatorischen Transkriptionsfaktoren (RTFs) – und promotorgebundenen Proteinen – den generellen Transkriptionsfaktoren (GTFs) – finden Wechselwirkungen statt. Dadurch wird eine räumliche Struktur gebildet, die entfernten gelegenen, d.h. distalen regulatorischen Elementen eine direkte Einwirkung auf den Promotor ermöglicht (17).

Die RTFs tragen jeweils ein spezielles Strukturelement, mit dem sie auf bestimmte Reize hin an spezifische DNA-Sequenzen binden können (17,19).

4.2.1 Wichtige Strukturelemente von RTFs

Mittlerweile ist eine ganze Bandbreite von verschiedenen Strukturelementen bekannt, weshalb hier nur wenige, wichtige Motive erwähnt werden.

Das Zinkfinger-element, welches in unterschiedlichen Formen, wie beispielsweise ein Zink-Ion gehalten von zwei Cystein- und zwei Histidinseitenketten (Cys2His2-Zinkfinger) oder von vier Cysteinen (Cys4-Zinkfinger, vorkommt, ist Teil des Glykoproteins Sp1 (specificity protein 1) mit drei Zinkfingern in seiner carboxyterminalen Bindungsdomäne, mit dem es an GC-Boxen (5'-GGGCGGG-3') auf der DNA binden kann. Die Phosphorylierung des Sp1 stimuliert die Bildung des Präinitiationskomplexes (PIC) und damit den Beginn der Transkription über

die Polymerase II. Es kommt in höherer oder minderer Konzentration in allen eukaryotischen Zellen vor (17).

Der basische Leucin-Zipper (bZip-Domäne) bindet mit seinen zwei Armen an die DNA und ist Teil der CREB-Proteine (cAMP response element-binding protein), welche an die CRE-Sequenz (cAMP response element) binden und die Bildung der dazugehörigen Gene, unter anderem in den Neuronen des zentralen Nervensystems (ZNS) und in den T-Lymphozyten, durch einen Anstieg der cAMP-Konzentration stimulieren (17).

Auch die homöotischen Proteine, deren Information in den HOX-Genen gespeichert ist, sind wichtig in der embryonalen Entwicklung für die Differenzierung der Zellen und können spezifisch DNA-Abschnitte erkennen. Vertreter dieses Motivs sind die sogenannten Octamer-bindenden Transkriptionsfaktoren (Oct-Faktoren), welche in Stammzellen exprimiert werden, und bei ausdifferenzierten Zellen herunterreguliert werden (17,23).

4.3 Posttranskriptionelle Regulierung

Die Stabilität der mRNA und die Translationseffizienz spielen eine wesentliche Rolle bei der posttranskriptionellen Weiterentwicklung der mRNA. Durch die im Anschluss der Transkription durchgeführten Modifikationen werden die Stabilität, die Halbwertszeit und die Translationsrate der mRNA beeinflusst und fungieren daher als Genregulatoren. Zu diesen posttranskriptionellen Modifikationen gehören die Bildung einer 5'-Cap-Struktur und eines Poly(A)-Schwanzes sowie das Spleißen mit ihren Variationsmöglichkeiten, was zusätzlich die Translationseffizienz beeinflusst (17–19,24).

4.3.1 Alternatives Spleißen

Exons und Introns können fakultativ verwendet werden, weshalb die Introns nicht zwangsweise herausgeschnitten und die Exons nicht unbedingt enthalten bleiben müssen. So können beispielsweise gewisse Exons übersprungen oder sogar deren Reihenfolge verändert werden. Aufgrund dieser Verarbeitungsvarianten entstehen mehrere Kombinationsmöglichkeiten für die reife mRNA und es können aus einem Gen verschiedene Produkte mit unterschiedlichen Eigenschaften entstehen (17–19). Natürlich sind diese Variationen nicht dem Zufall überlassen,

sondern werden durch regulatorische Elemente genauestens kontrolliert und beeinflusst.

4.3.2 Halbwertszeit der mRNA

In welchen Mengen und wie lange mRNAs zur Verfügung stehen, sind zentrale Bestandteile für die Regulierung der Genexpression. Die Stabilität einer mRNA und damit ihre Überlebenszeit wird schon anhand kleiner Veränderungen stark beeinflusst. Eine wichtige Rolle spielen hier vor allem der Poly(A)-Schwanz, dessen Verlust mit dem Abbau der 5'-Cap-Struktur zusammenhängt und der nicht codierende Bereich am 3'-Ende (3' UTR – untranslated region), aber auch Sequenzen innerhalb des offenen Leserahmens (ORF – Open Reading Frame) haben einen Einfluss (17,19).

Grundsätzlich wirken die 5'-Cap und der Poly(A)-Schwanz als Stabilisierungselemente und schützen die mRNA gegen Abbauenzyme. Ist der Poly(A)-Schwanz zu kurz oder wird durch den exonukleolytische Abbau durch das Exosom in 3'-5'-Richtung entfernt, kommt es zu einem Verlust des Poly(A)-bindenden Proteins (PABP), das am 5'-Ende mit eIF4G interagiert und den Initiationskomplex stärkt. Dieser Wegfall bewirkt seine Destabilisierung, woraufhin Decapping-Proteine (DCP1 und DCP2) Zugriff haben und auch die 5'-Cap entfernt wird. (*Abbildung 12*) Infolgedessen kann die 5'-3'-Exonuklease ansetzen und wiederum mit ihrem Abbau beginnen, sodass die mRNA schließlich von beiden Seiten abgebaut wird (17,18).

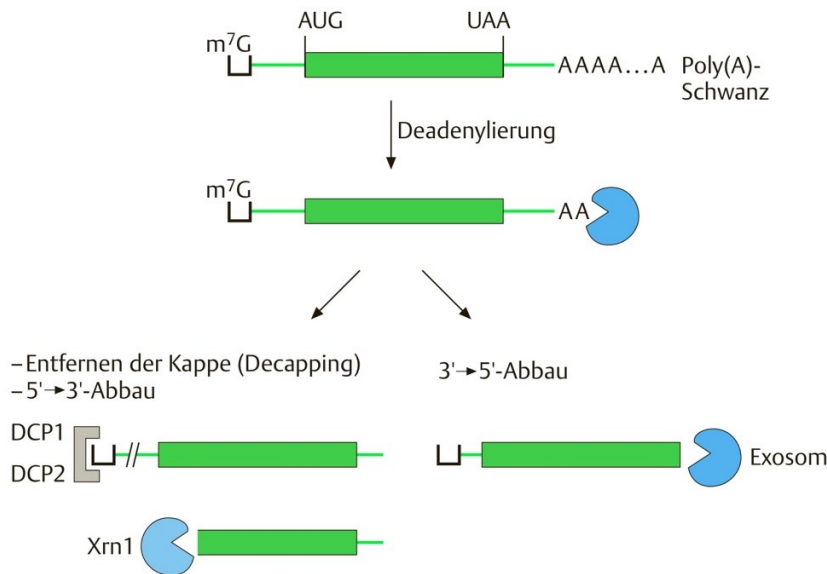


Abbildung 12: Abbauwege der mRNA.

Die meisten Abbauwege beginnen mit dem Entfernen des Poly(A)-Endes. Im Anschluss kann der weitere Abbau in 5'-3'- oder in 3'-5'-Richtung erfolgen (17).

Bei kurzlebigen mRNAs ist die 3'-UTR aufgrund einer Aneinanderreihung mehrerer AUUUA-Sequenzen, den sogenannten AU-reichen Elementen (AREs), auffällig und gekennzeichnet durch einen vermehrten Einbau von Adenin- und Uracilnukleotiden, welche auch als Destabilisierungssequenzen bezeichnet werden. Diese AREs fungieren darüber hinaus als Bindungsstellen für viele weitere Proteine, unter anderem Enzyme, die auch am Poly(A)-Schwanz-Abbau beteiligt sind (17,18).

Bekannt ist, dass die Ribosomen eine mRNA-Kontrolle durchführen und anschließend einen Abbau, im Falle des Auftretens einer fraglichen mRNA, auf drei verschiedene Arten, je nach Fehler, einleiten: Nonsense-vermittelter Abbau (NMD – nonsense-mediated mRNA decay) beim Vorkommen eines verfrühten Stoppcodons (PTC – premature termination codon), Abbau von Non-Stop-mRNA (NSD – non-stop mRNA decay), falls ein kompletter Verlust des Stopp-Codons vorliegt, und auch bei fehlerhaften Sequenzen, die ein Anhalten der Translation verursachen, No-go-mRNA-Abbau (NGD – no-go mRNA decay) (17,24). Es hat sich allerdings auch herausgestellt, dass Ribosomen anhand der Art des verwendeten Triplets in der mRNA nicht nur in der Lage sind den genetischen Code zu lesen, sondern zusätzlich regulatorische Information bezüglich der Stabilität und der zukünftigen Sekundärstruktur – der Proteinfaltung – beurteilen zu können (24). Dabei sind zwei Faktoren von Bedeutung: die Verwendung des

optimalen Triplets (Codon Optimality), welches sich in allen Punkten bei der Entstehung eines Proteins als förderlich erweist, und die Häufigkeit des Vorkommens eines bestimmten Triplets (Codon Usage) (24).

4.4 Regulation auf Translationsebene

Die Kontrolle auf Ebene der Translation, vor allem der Initiation, ist sehr wichtig für die Zelle, um sich an gegebene Umstände, auch Ausnahmesituationen, anpassen zu können. Bei dieser Art der Regulierung spielen vor allem Translationsinitiationsfaktoren, welche wiederum an der Bildung des Initiationskomplexes beteiligt sind, und bestimmte Sequenzen auf der mRNA selbst eine wichtige Rolle (17).

4.4.1 Auf Ebene der Cap-Struktur

Abgesehen davon, dass die 5'-Cap-Struktur zu einer stabilen mRNA beiträgt, ist sie ein wichtiger Faktor für den Translationsstart. Sie bildet den Ansatzpunkt für drei gefertigte Produkte, die sich zum Präinitiationskomplex (PIC) zusammenlagern (17).

Die ribosomale 40S-Untereinheit wird durch eIF3, einem großen Proteinkomplex, und eIF1A für das 60S-Ribosom blockiert. Gleichzeitig wird eIF2-GDP durch eIF2B zu eIF2-GTP aufgewertet, welches an die Initiations-tRNA binden kann, und mit ihr den ternären Komplex bildet, welcher sich wiederum zur Entstehung des 43S-PIC über die Vermittlung von eIF1 an die blockierte 40S-Untereinheit lagern kann (17).

Der letzte Schritt zur Bildung des fertigen 48S-PIC ist die Verbindung mit der vorbereiteten mRNA. Dies geschieht über phosphoryliertes eIF4E, das spezifisch an die 5'-Cap-Struktur bindet und über den Kontakt mit eIF4G, welcher wiederum mit dem PABP interagiert, eine Schleife zum Poly(A)-Schwanz und damit einen Angriffspunkt für weitere Regulatoren bildet (17).

Auch eIF4E und eIF2 werden selbst wiederum durch Phosphorylierung reguliert. Die Kontrolle des eIF4E-Proteins geschieht über das eIF4E-bindende Proteine (4E-BPs, eIF4E-binding proteins), welches auf verschiedene Umstände, wie Hormone, Zytokine, Wachstumsfaktoren aber auch Nährstoffangebote, über ein Zielprotein des Rapamycins (Sirolimus) von Säugetieren, mTOR (mammalian

target of rapamycin), phosphoryliert wird (17). Die Kontrolle des eIF2-Proteins wird über einige verschiedene Kinasen bewerkstelligt, wie unter anderem über die RNA-abhängige Proteinkinase (PKR), welche auf Interferonantwort bei Auftreten von langer doppelsträngiger RNA, vor allem in Folge von Virusinfektionen, reagiert, und durch Phosphorylierung der α -Untereinheit des eIF2 die Hemmung der Proteinsynthese und dadurch die Apoptose einleitet (17,25). Auch das Transmembranprotein PERK (RNA-abhängige Proteinkinase-ähnliche ER-Kinase) – ER steht für Endoplasmatisches Retikulum, da es deren Membran durchzieht – wird als Reaktion auf ER-Stress und der folgenden Antwort auf ungefaltete Proteine (UPR – unfolded protein response) im Lumen des ERs hin aktiviert und phosphoryliert eIF2, woraufhin die Proteinsynthese blockiert wird (17,26).

4.4.2 Länge und Sekundärstruktur der 5'-UTR

Während der Translationsinitiation verbinden sich die 40S-Untereinheit mit den eIFs 1, 1A, 3, 5 und der ternäre Komplex, bestehend aus eIF2, GTP und Methionyl-tRNA (Met-tRNA), zum 43S-PIC, welcher daraufhin die mRNA, beginnend am 5'-Ende und die 5'-UTR passierend, nach dem passenden Startcodon abscannt. Ist nun die 5'-UTR sehr lang, benötigt dieser 43S-PIC, trotz seiner Geschwindigkeit mehr Zeit, um auf die passende Startsequenz zu treffen, weshalb die Translationseffizienz bei kürzeren 5'-UTRs höher ist (27).

Auch durch Sekundärstrukturen, die sich in der 5'-UTR befinden, kann die Translationseffizienz deutlich reduziert werden (17). Es können sich hier stabile Haarnadelschleifen, sogenannte Stem-Loops, ausbilden, an welche weitere translationsblockierende Proteine binden können (19). Treten diese Stem-Loops in der Nähe des Startcodons auf, wird das scannende Ribosom in 5'-Richtung zurückbewegt und muss erneut die mRNA überprüfen (27). Befinden sich an dieser Stelle wiederum andere sehr komplexe Sekundärstrukturen, die inneren Ribosomen-Eingangsstellen (IRES – Internal Ribosome Entry Sites), ermöglichen diese einen von der 5'Cap unabhängigen Translationsstart. Solch eine Umgehung nutzen bestimmte Viren, um erfolgreich ihre Proteine in Wirtszellen herstellen zu können (19,28).

4.4.3 Stromaufwärtsliegende ORFs

In den 5'-UTRs können offene Leseraster (uORFs – upstream open reading frames) vorkommen, welche ein eigenes Startcodon, meist eine kanonische AUG- oder non-kanonische CUG-Sequenz, besitzen und oberhalb der primären ORF-Sequenz (mORF – main open reading frame) positioniert sind. Einige von diesen uORFs können unter stressfreien Bedingungen selbst in uProteine translatiert werden, interessanterweise jedoch nicht alle und andere besitzen regulatorische Funktionen (29). Diese Regulationen können über verschiedene Wege ablaufen. Bei Zellstress wird beispielsweise eine Erhöhung der Translationsrate des Hauptproteins erreicht, indem bestimmte uORFs überlesen werden (leaky scanning), oder es kann eine Repression der Expression durch die Translation eines weit entfernten uORFs auf einer längeren 5'-UTR erreicht werden. Bei kurzen 5'-UTRs ist beobachtet worden, dass sie keine uORFs enthalten, was sich produktiv auf die Translationsrate auswirkt und am Ende mehr von dem Zielprotein zur Verfügung steht (29). Ebenso besteht die Möglichkeit, dass das uORF übersetzt wird und die nötigen Initiationsfaktoren oder der ternäre Komplex sich von der mRNA loslösen und eine erneute Bindung am Startcodon des mORF ausbleibt. Sollte die Sequenz des uORF, meist mit kanonischem Startcodon, als sinnlos erkannt werden, kommt es infolge der Einleitung des NMD-Prozesses zum Abbau (29,30).

4.4.4 Das Umfeld des Startcodons

Die Umgebung des Startcodons ist bedeutend für den Translationsstart, da ein AUG von Ribosomen nicht immer gleich gut genutzt werden kann. Die optimale Translation-Initiation-Eintrittsstelle (TIS – translation initiation site), also der Bereich vor und hinter dem AUG, ist aus einer bestimmten Anordnung von Nukleotiden aufgebaut, wobei sich herausgestellt hat, dass vor allem zwei Positionen innerhalb dieser Struktur für die TIS-Erkennung essenziell sind, nämlich an -3 eine Purinbase, Adenin oder Guanin, und an +4 ein Guanin (wenn A in AUG +1) (17,31). In Vertebraten wurde eine genaue Sequenz, das sogenannte Kozak-Motiv, mit 5'-GCCRCCAUGG-3' festgelegt. Allerdings kann diese Sequenz stark variieren und trotzdem, solange diese zwei wichtigen Positionen erhalten bleiben, die optimale Eintrittsstelle bieten (31). Werden diese jedoch verändert fährt die ribosomale Untereinheit an dem betroffenen AUG vorbei und sucht sich

ein neues Startcodon weiter stromabwärts, was den zuvor bereits erwähnten Mechanismus ‚leaky scanning‘ erklärt (29,31).

4.4.5 3'-UTR

Im 3'-UTR befinden sich Andocksequenzen für regulatorische miRNAs, kleine, nur ca. 21 Nukleotide lange Moleküle, welche wiederum die Translation hemmen oder sogar für den Abbau einer mRNA sorgen (17,18,32).

5 Die mRNA-Impfstoffe

Seit der COVID19-Pandemie sind die mRNA-Impfstoffe in ein breites öffentliches Interesse gerutscht, obwohl schon viele Jahre an dieser Methode, vor allem für den Gebrauch im onkologischen (11,33,34) aber auch im infektiösen Bereich (35), geforscht wird. Bis zum jetzigen Zeitpunkt wurden hauptsächlich drei Arten von mRNA-Impfstoffen als onkologische Therapie, sowohl präventiv als auch therapeutisch, untersucht (16). Auf der einen Seite die am häufigsten getestete Variante, die eine sich nicht replizierende mRNA enthält, welche zum einen modifiziert oder nicht-modifiziert vorliegt, zum anderen eine virusähnlich sich replizierende mRNA (SAM – self-amplifying mRNAs), auf die nicht nur als Krebstherapie, sondern auch als Prävention gegen Infektionskrankheiten, immer mehr das Augenmerk gerichtet ist und aus diesem Grund vermehrt untersucht wird (36).

Die mRNA-Impfstoffe basieren auf der Präsentation eines oder mehrerer gezielter Antigene, die in der körpereigenen Zelle hergestellt werden und daraufhin dem körpereigenen Immunsystem präsentiert werden können. Die Idee dieser Methode ist das spezifische Attackieren der pathologischen Zellen, ohne den gesamten Organismus in Mitleidenschaft zu ziehen. Das Ziel hierbei ist die Aktivierung von Dendritischen Zellen (DCs) – die wichtigsten Antigen-präsentierenden Zellen (APCs) – woraufhin eine Antwort der naiven und im Anschluss der zytotoxischen T-Zellen provoziert wird. Ebenso kommt es aufgrund der eigenen enthaltenen Adjuvantien zu einer Stimulation der humoralen Abwehr (16,37). Durch Zugabe von zusätzlichen Adjuvantien kann die Antigen-spezifische T-Zell-Antwort weiter evoziert werden (16).

5.1 Herstellung der mRNA

Die mRNA für den gewünschten Impfstoff wird für gewöhnlich in vitro anhand einer komplementären DNA-Vorlage mittels der T3-, T7- oder SP6-RNA-Polymerase von Bakteriophagen transkribiert (IVT – In-vitro-Transkription) und erlaubt aufgrund dessen eine schnelle und kostengünstige Herstellung (36,37). Diese DNA-Matrize wird entweder synthetisch durch die Polymerase-Kettenreaktion

(PCR) hergestellt oder es wird auf linearisierte Plasmid-DNA zurückgegriffen (37).
(Abbildung 13A)

Die in vitro hergestellte mRNA ist in ihrem Aufbau der eukaryotischen mRNA gleich und beinhaltet einen an beiden Enden durch eine 5'- und 3'UTR eingerahmten ORF, welcher den codierenden Bereich für das Antigen repräsentiert. Dieser Nukleinsäurestrang ist wiederum beidseitig durch die 5'-Cap und den Poly(A)-Schwanz geschützt (36–38).

Das Anfügen der 5'-Cap kann posttranslational mithilfe des Vaccinia Virus Capping Enzyms (VCE), welches aus einer D1-, die enzymatische Aktivität besitzt (Triphosphatase, Guanylyltransferase, Methyltransferase), und einer D12-Untereinheit, die wiederum D1 aktiviert, bestehen, stattfinden, oder wird direkt kotranslational chemisch synthetisiert (36,37,39).

5.1.1 Reinigung des Impfstoffs

Ein wichtiger Aspekt bei der Herstellung der mRNA ist die Reinigung des Produkts, da bei der In-vitro-Transkription neben dem gewünschten Hauptprodukt noch eine Vielzahl an Nebenprodukten entstehen können. Dies können unbrauchbare kürzere, aber auch längere mRNAs oder doppelsträngige RNAs (dsRNAs) sein, die aufgrund ihrer Ähnlichkeit mit einem Zwischenprodukt eines RNA-Virus eine starke Typ-I-Interferon-Antwort induzieren können. Das wiederum führt zu einer Translationsstagnation. In weiterer Folge zerfällt die mRNA und es kommt zu einer Reduktion der zytotoxischen T-Zell- cluster of differentiation 8 (CD8⁺)-Aktivität (37,40). Diese Reaktion geschieht über die Aktivierung von intrazellulären Pattern-Recognition-Rezeptoren (PRRs), wie Protein Kinase RNA-activated Receptor (PKR), Melanoma Differentiation-associated protein (MDA)-5, 2'-5'-Oligoadenylat Synthase (OAS) usw. Es hat sich herausgestellt, dass das Entfernen der RNA-Abfälle, trotz Beibehaltung eines relativ hohen Zytokinlevels, eine Typ-I-Interferon-Antwort verhindert und so die Proteinproduktion um das 10-1000fache in den Dendritischen Vorläuferzellen erhöhen kann (36,37).

Einerseits lässt sich während der In-Vitro-Herstellung durch ein Absenken der Magnesiumkonzentration oder durch eine Erhöhung der Produktionstemperatur die Entstehung von dsRNA verringern, die andererseits durch ein im Anschluss durchgeführtes Reinigungsverfahren sogar zum großen Teil eliminiert werden können. Hierfür hat sich die schnelle Proteinflüssigchromatographie (FPLC) als

günstigste Methode herausgestellt, die in Kombination mit einem Puffer, der Ethanol und ein selektiv dsRNA-bindendes Zellulosepulver beinhaltet, zu einer 90%-igen Entfernung der dsRNA führt. Eine andere Methode hingegen, die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC), erzielt ein deutlich schlechteres Ergebnis und ist im Vergleich kostenaufwendiger (36).

5.2 Immunreaktion im Rahmen der mRNA-Impfung

Die durch Endozytose in das Zytoplasma einer Wirtszelle aufgenommene mRNA bindet an ein Ribosom und wird daraufhin in ein Protein, das gewünschte Antigen, translatiert. Dieses wird nun entweder von Proteasomen in kleine Peptidfragmente zersetzt, welche im ER auf einen Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC) I geladen werden und anschließend an der Zelloberfläche den zytotoxischen T-Zellen (CD8⁺-Zellen) präsentiert werden. Alternativ wird das gesamte Antigen-Protein aus der Zelle transportiert, wo es entweder von Dendritischen Zellen phagozytiert wird, zersetzt und über den MHC-II-Weg T-Helferzellen (CD4⁺-Zellen) und B-Zellen präsentiert wird oder direkt von B-Zellen erkannt wird (37).
(Abbildung 13B)

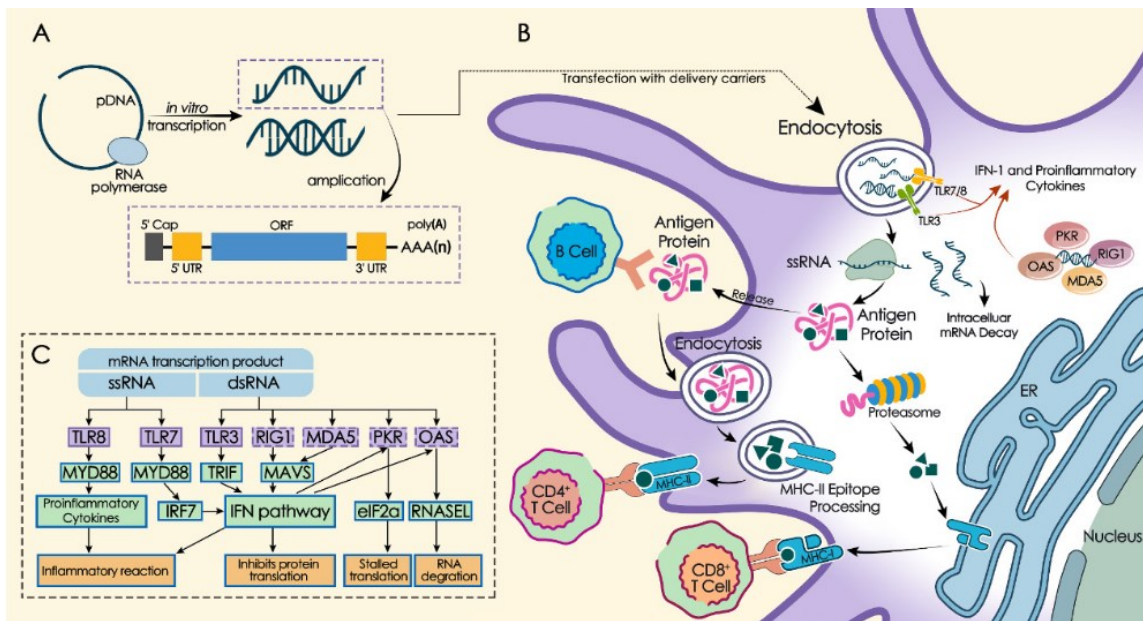


Abbildung 13: mRNA in-vitro-Transkription und angeborene Immunreaktion
A) In-vitro-Transkription der mRNA anhand einer DNA-Vorlage. Das Produkt enthält am Ende eine ssRNA (5' Cap, 5' UTR, ORF, 3' UTR, Poly-A-Schwanz) und eine dsRNA **B)** RNA-Translation und Antigenpräsentation, **C)** Selbst-Adjuvans-Effekt: Die mRNA stimuliert über die aufgezeigten Rezeptoren eine Interferonantwort und eine Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen. Es kommt zu einer Aktivierung des angeborenen Immunsystems (37)
MDA5: Melanoma Differentiation-associated protein 5, **MHC:** Major Histocompatibility Complex, **IFN:** Interferon, **OAS:** 2'-5'-oligoadenylate synthase, **PKR:** Protein Kinase RNA-activated Receptor, **PRR:** Pattern Recognition Receptor, **RIG-I:** Retinoic acid-inducible gene 1 protein, **TLR:** Toll-like-Receptor.

5.2.1 Die Kreuzpräsentation

Die Antigen-Kreuzpräsentation ist die Möglichkeit spezieller präsentierender Zellen exogen aufgenommene Proteine nicht nur am MHC-II-Rezeptor den CD4⁺-T-Zellen, sondern auch am MHC-I-Rezeptor den CD8⁺-T-Zellen und den Natürlichen Killerzellen (NKs) zu präsentieren. Diese Art der Präsentation hat sich für das Hervorrufen einer adaptiven Immunantwort gegen infektiöse Pathogene und Tumore als besonders wertvoll erwiesen, wobei jedoch gerade diese Art der Immunantwort in vielen Tumorgeweben gestört oder verändert zu sein scheint (41).

Ein exogenes Protein kann auf verschiedenen Wegen, entweder durch Rezeptor-abhängige Endozytose, Pinozytose oder Phagozytose, in die Zielzelle z.B. die DCs gelangen. Hier sind aktuell drei Arten der Verarbeitung dieser Antigene bekannt. Der Antigenpeptid-Transporter (TAP)- und Proteasomen-abhängige Weg, bei dem das phagozytierte Protein durch Proteasomen in Peptide zerlegt

wird und diese im Anschluss in das ER transportiert und hier auf das MHC-I-Molekül geladen werden. Der MHC-I-Peptid-Komplex wandert anschließend über den Golgi-Apparat an die Zelloberfläche (41). Weitere Arten der Verarbeitung sind der TAP- und Proteasomen-unabhängige Weg, wo das Protein direkt im Endosom durch Cathepsin zerlegt wird und der Weg, bei dem das Protein direkt im Phagosom verarbeitet und hier auf das MHC-I geladen wird. Diese beladenen MHC-I-Peptid-Komplexe werden anschließend an der extrazellulären Membranseite exprimiert und die Antigenfragmente den CD8⁺-T-Zellen (zytotoxischen Zellen) präsentiert (41).

5.2.2 Die immunverstärkende Komponente

Die mRNA-Impfstoffe sind in der Lage gleichzeitig, neben ihrer eigentlichen Aufgabe, als eigene immuninduzierende Adjuvantien zu fungieren und daher eine Immunantwort, ohne das Hinzufügen von Hilfsmitteln, auszulösen. Die mRNA wird hierbei von APCs erkannt, wodurch wiederum im Anschluss Strukturerkennungsrezeptoren (PRRs), wie die Pathogen-erkennenden Toll-like-Rezeptoren (TLRs), TLR3, TLR7 und TLR8, aktiviert werden. Sie spielen als Teil des angeborenen Immunsystems eine wichtige Rolle für die Abwehr gegen Mikroorganismen. Bei der IVT, der Herstellung von mRNA anhand einer DNA-Vorlage im Reagenzglas, entsteht nicht nur ssRNA, sondern auch dsRNA (37).

Die ssRNA wird von endosomalen Rezeptoren des angeborenen Immunsystems, wie beispielsweise TLR7 und TLR8, und die dsRNA von TLR3, erkannt. Außerdem spielen bei der dsRNA zytoplasmatische Rezeptoren, wie RIG-1, PKR, MDA5, OAS, eine Rolle. Aufgrund der verschiedenen Rezeptorbindungen stimulieren sie proinflammatorische Zytokine und Typ-1-Interferone. Des Weiteren können sie antivirale Enzyme aktivieren, welche die Translation stoppen und die mRNA schließlich abbauen (37). (*Abbildung 13C*)

5.3 Verbesserung und Anpassungen hinsichtlich

Translationseffizienz und Immunogenität

Während der Erprobung einiger mRNA-Impfstoffe stellte man fest, dass verschiedene Komponenten zu einer verstärkten Immunantwort beitragen können. Dies kann einerseits ein Vorteil sein, da die Zugabe von Adjuvantien hilfreich

werden würde, auf der anderen Seite jedoch auch Nachteile birgt. Die ssRNA ist während des Aufnahmevorganges in der Lage, die DCs über TLR7- und TLR8-Bindung in ihre antivirale Bereitschaft zu versetzen (37,42) und die dsRNA wiederum kann über TLR3 diese Immunstimulation zusätzlich verstärken. Kommt es jedoch zu einer überschießenden Ausschüttung von Typ-I-Interferon und anderen, führt dies wiederum zu einer mRNA-Translationsstagnation und einem verfrühten Abbau, was in weiterer Folge zu einer verminderten Aktivierung der CD8⁺-T-Zellen und einer limitierten Immunreaktion führt (37). Aufgrund dieser Reaktionen ist es notwendig, verschiedene Optimierungsmöglichkeiten zu kennen und den Impfstoff auf diese Weise modifizieren zu können, um schließlich eine effiziente Wirkung erzielen zu können.

5.3.1 Veränderung der 5'-Cap-Struktur

Die einfache eukaryotische und teilweise auch virale mRNA besitzt am 5'-Ende eine 7-Methylguanosinkappe, die über eine 5',5'-Triphosphatbrücke mit ihr verbunden ist, die sogenannte ,Cap0' (m7G(5')-ppp-(5')G) (36,37,43). Bei höheren Eukaryoten treten zusätzlich an der 2'-Position der Ribose Methylierungen auf, welche entweder am ersten bei ,Cap1' (m⁷GpppNmN) oder an den ersten beiden Nukleotiden bei ,Cap2' (m⁷GpppNmNm) stattfinden (43).

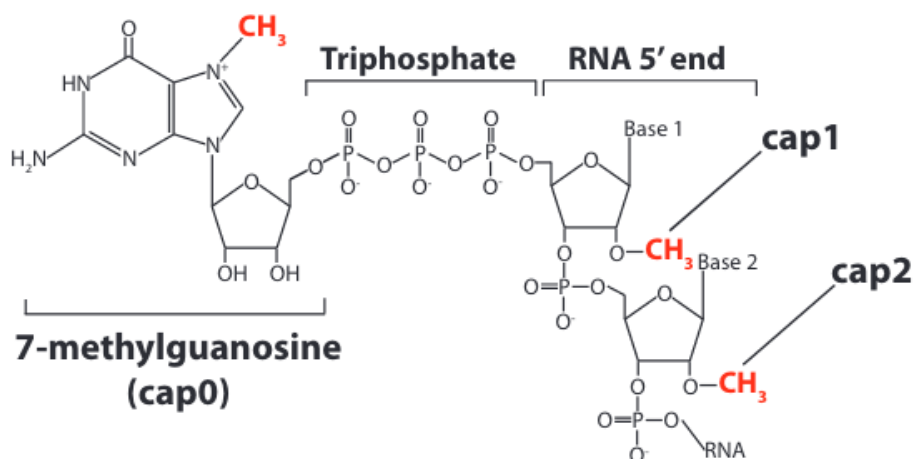


Abbildung 14: Die Struktur der synthetischen Kappe. CH₃ – Methylierung (43)
 Die Cap0 ist ohne Methylierung an den Basen am 5' Ende, was eine verkehrte Anlagerung an die mRNA begünstigt. Die Cap1 besitzt bereits eine Methylierung der Base am 5'Ende, die Cap2 noch eine weitere.

Diese Kappe ist essenziell für eine geringere Anfälligkeit gegenüber Nukleasen, für ein korrektes Spleißen und für die Bindung an den eIF4E, was wiederum die Translationsrate erhöht (17,19,36,37). Aus diesem Grund muss auch die In-Vitro-mRNA mit einer 5'-Cap ausgerüstet werden, was entweder posttranslational durch das VCE passiert oder kotranslational durch chemische Methoden erreicht wird. Der Vorteil des VCE ist seine Effizienz, wobei es jedoch für größere Produktionen nicht in Frage kommt, da es sehr kosten- und zeitintensiv ist (36,37,44).

Die chemische Handhabung mithilfe von Analogkappen bietet mittlerweile mehrere Möglichkeiten: Da sich die herkömmliche Kappe in einem Drittel der Fälle entgegen der gewünschten Richtung an die mRNA heften kann, wird sie dadurch für die Translation untauglich, weil sie dann als erstes für das zu transkribierende Nukleotid mit der fehlenden Methylierung fungiert (44).

Um diese unerwünschte Reaktion der herkömmlichen Kappe zu umgehen, wurde das Anti Reverse Capp-Analoga (ARCA) entwickelt. ARCA ist am C2- oder C3-Atom mit einer Methylgruppe modifiziert, was die korrekte Nukleotidanheftung an das nicht-methylierte Guanodin sicherstellt und so wiederum eine effizientere Translation gewährt (36,37,44). (Abbildung 14) Auch noch an ARCA selbst wurden weitere strukturelle Modifikationen vorgenommen, viele innerhalb der Triphosphatbrücke (44), wie unter anderem Phosphorothioat-Modifikationen, die zu einer höheren Affinität zu eIF4E führen und damit effizienter translatieren (36,37,44) Hierbei entstehen allerdings zwei Diastereomere, welche verschiedene biologische Aktivitäten besitzen und daher voneinander getrennt werden müssen (44). Bei beispielsweise der Variante β -S-ARCA ($m_2^{7,2'O}GppspG$) wurde von einer höheren Translationsrate in den DCs aufgrund seiner Stabilität berichtet (37). Ebenso nach Ersetzen eines phosphatbindenden Sauerstoffatoms durch eine Methylengruppe ($m_2^{7,3'O}Gp_{CH_2}ppG$, $m_2^{7,3'O}Gpp_{CH_2}pG$), nimmt die Empfindlichkeit gegenüber dem humanen Decapping-Enzym 2 (hDcp2) zu, jedoch gleichermaßen auch die Affinität zu eIF4E ab (45). Verbleibende Nachteile von ARCA sind die relativ geringe Capping-Effizienz (60-80%) und die unnatürliche Methylgruppe an Position C3, die als zellfremd erkannt wird und die Expression von Typ I Interferon triggern kann (36,43). Außerdem entsteht bei der Verwendung von Analogkappen ausschließlich „Cap0“ (36), was aufgrund der fehlenden Methylierung MDA5 aktiviert und auf diese Weise zusätzlich die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen befeuern kann (36,46).

Die jüngste Erfindung ‚CleanCap‘ ist entwickelt worden, um mithilfe eines kappenbildenden Initiators, welcher die physiologischere „Cap1“ mit einer 90-99%igen Capping-Effizienz bildet, eine hohe Translationsrate erzielen zu können, da durch die „Cap1“ im Gegensatz zur „Cap0“ die antivirale Antwort geringer ausfällt und auf diese Weise zu hohe Zytokinlevel vermieden werden (36,37,46).

5.3.2 Modifikationen an den Nicht-translatierenden Regionen

Der codierende Abschnitt der mRNA ist sowohl auf der 5‘- als auch auf der 3‘-Seite von einer UTR umgeben, welche nicht als direkte Vorlage des zukünftigen Proteins fungiert. Obwohl sie auf den ersten Blick keine relevante Information enthält, variiert sie je nach eukaryontischer Zelle und Zellstadium enorm hinsichtlich ihrer Länge und ist in der Lage eine Vielzahl an verschiedenen sekundären Strukturen auszubilden und damit die Translation auf vielen verschiedenen Ebenen zu beeinflussen. Des Weiteren wird über einen Zusammenhang mit Replikation und Abbau der mRNA berichtet (32,36,37,47,48).

Aufgrund dieser Beobachtungen kann in der Impftherapie die Optimierung von UTRs zusätzlich genutzt werden, um eine verbesserte Translation zu erzielen.

So wurde beobachtet, dass eine kürzere 5‘-UTR-Sequenz einen positiven und die Verwendung von Triplets wie ‚AUG‘ oder ‚CUG‘ als Startcodon einen störenden Einfluss auf den Translationsprozess haben können (36,37). Außerdem sind stabilisierende Elemente, wie zum Beispiel GC-reiche Sequenzen, förderlich für eine präzise Translation, wohingegen zu stabile sekundäre Strukturen zu vermeiden sind, da sie die Bindung eines Ribosoms an die mRNA verhindern können (37).

In Bezug auf die 3‘-UTR ist mittlerweile bekannt, dass sie Bindestellen für regulatorische Proteine enthält und dass deren Bindung durch ihre Länge beeinflusst werden kann. Beispielsweise erleichtert eine lange 3‘-UTR-Sequenz mRNA-abbauenden Proteinen den Zugang und führt daher zu einem früheren Zerfall (32). Auch am 3‘-Ende wirken sich stabilisierende Elemente, wie AU- und GU-reiche Sequenzen positiv aus. Eine weitverbreitete Sequenz beispielsweise setzt sich zusammen aus α -Globin und β -Globin, welche selbst Elemente für die Regulation von Stabilität und Translation enthalten. Sie wird daher vorwiegend im Zuge der Herstellung von IVT-mRNA verwendet (36,37).

5.3.3 Triplett-Änderung durch den Austausch einzelner Basen im offenen Leserahmen

Der Hauptteil der mRNA, der Teil, der direkt für das Protein codiert, sollte in seiner Information unverändert bleiben, und muss daher sehr sorgfältig optimiert werden. Für eine Aminosäure existieren mehrere codierende Kombinationsmöglichkeiten von drei Basen. Infolgedessen kann eine Base gegen eine andere ausgetauscht werden, ohne die zu transportierende Abfolge von Aminosäuren zu verändern (18). Auf diesem Wissen basierend lassen sich Optimierungen vornehmen, die zu einem besseren Ergebnis führen.

Beispielsweise wurde beobachtet, dass die Verringerung an Uridin-Bausteinen in der mRNA einen positiven Einfluss auf die Höhe der Antigenexpression hat, da eine übermäßige Immunreaktion durch eine Anhäufung dieser Nukleoside, welche von RIG-I erkannt werden, auf diese Weise vermieden wird (36). Ein zweiter Aspekt ist, dass bei dieser Entfernung automatisch Guanidin- und Cytodinreichere Bereiche entstehen, was wiederum Einfluss auf die Translationselongation hat (36). Es könne sich ebenso als Vorteil erweisen, die gewünschten Zielzellen in ihrer mRNA-Bauweise nachzuahmen, indem die von ihr bevorzugt eingesetzten Triplets und deren Häufigkeitsverteilung, vor allem von sehr oft exprimierten Proteinen, beachtet werden, und die Wahl der Triplets je nach verfügbaren tRNAs getroffen wird. Äußerst stabile Sekundärstrukturen und Haarnadel-Schlaufen sollten jedoch vermieden werden (36,37).

Zu beachten bleibt, dass je nach Protein auch eine langsamere Translation von Vorteil sein kann, da die korrekte Faltung ein komplizierter Prozess ist und Zeit in Anspruch nimmt, weshalb die Optimierung differenziert vorgenommen werden muss, um für ein qualitativ hochwertiges Antigen gewährleisten zu können (36,37).

5.3.4 Poly(A)-Schwanz

Ältere Forschungsarbeiten haben gezeigt, dass die Länge des Poly(A)-Teils einen Effekt auf die mRNA-Translationseffizienz hat, da er die mRNA-Stabilität und damit ihre Überlebenszeit verbessern kann. Es deutete daraufhin, dass die optimale Länge des Poly(A)-Schwanzes in DCs ungefähr zwischen 120-150 Nukleotiden (37,49) liegt, in unreifen T-Zellen jedoch ein längerer Teil von über 300 Nukleotiden effizienter sei (37,50). In aktuelleren Forschungen konnte allerdings gezeigt werden, dass die in ausreichenden Mengen translatierte mRNA

in Eukaryoten einen kurzen Poly(A)-Schwanz aufwiesen (51). Nichtsdestotrotz ist die Poly(A)-Teil-abhängige Translationseffizienz einer mRNA je nach Zelltyp unterschiedlich und bedarf eventuell einer Optimierung (37).

5.3.5 Hinzufügen von Adjuvantien

Trotz der eigenen Fähigkeit der mRNA eine Immunantwort auszulösen, hat sich herausgestellt, dass die Zugabe weiterer Adjuvantien die Effizienz der Impfwirkung positiv beeinflussen können. Die Immunogenität nicht modifizierter, ungereinigter mRNA lässt sich beispielsweise durch das Hinzufügen von TriMix stark erhöhen, was mit einer verbesserten Reifung von DCs und einer intensiveren Antwort der zytotoxischen T-Zellen einhergeht. TriMix selbst beinhaltet mRNAs, die für drei immunaktivierende Proteine, CD40-Ligand sowie ein aktiver TLR4 und CD70, codieren (37,52). Aber auch Trägerstoffe, wie die kationischen Lipide 1,2-Dioleoyl-3-trimethylammoniumpropan (DOTAP) und 1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamin (DOPE), welche eine hohe Sezernierung von Typ-I-Interferon induzieren, oder Protamin, das in der Lage ist die T-Helfer-Zell (TH) 1 -Antwort zu aktivieren, zeigen eine gute Adjuvans-Wirkung (37).

5.4 Trägersubstanzen

Die Übertragung der negativ geladen synthetisierten mRNA in die menschliche Zelle stellt aufgrund ihrer Vulnerabilität eine große Herausforderung dar. Die nackte mRNA ist sehr anfällig für abbauende Enzyme, wodurch es in Folge nur zu einer unzureichenden Proteinexpression kommen kann. Aufgrund dessen ist es notwendig, für eine spezielle Verpackung zu sorgen, die ein längeres Vorhandensein der Antigenvorlage gewährleistet und so im Anschluss eine ausreichende Immunantwort erzielt. Hier kommen zum einen Lipid-Nanopartikel (LNPs) mit höchstem Erfahrungswert, Polymere, Proteine und ein virusähnliches Replikon zum Einsatz (53).

5.4.1 Lipid-Nanopartikel (LNPs)

Eine seit der COVID19-Pandemie weitverbreitete und aufgrund dessen am meisten erforschte Methode ist die Verpackung der mRNAs in Nanolipide, was einerseits einen Abbau durch Enzyme verhindern kann und andererseits eine gute

Biokompatibilität voraussetzt (53). LNPs zeichnen sich durch ionisierbare Aminolipide aus, welche selbst mit der Endosomenmembran reagieren und so ein mRNA-Entkommen ermöglichen. Durch das Polyethylenglykol wird ein Binden an Plasmaproteine verhindert, was wiederum zu einer Verlängerung der Zirkulationszeit führt, da eine vorzeitige Entsorgung durch das retikulohistiozytäre System (RHS), welches auf Phagozytose und Speicherung bestimmter Stoffe spezialisiert ist, blockiert wird. Zusätzliche Phospholipide und Cholesterol fungieren als Stabilisatoren, die die Partikel zusammenhalten (53).

Wird die mRNA nun als Nanopartikel in den menschlichen Organismus appliziert, gelangen zirka zwei Drittel über den LDL-Rezeptor (low density lipoprotein receptor – LDLR) mithilfe von Apolipoprotein B₁₀₀ und Clathrin-vermittelter Endozytose in die Leberzellen und das andere Drittel in extrahepatische Zellen. Außerdem können Low Density Lipoproteins (LDLs), Lipoproteine mit niedriger Dichte, im Falle eines hohen Cholesterinangebotes über den Scavenger-Rezeptor von Makrophagen gefressen werden, was wiederum im Zusammenhang mit der Entstehung von arteriosklerotischen Plaques (Response-to-injury-Theorie) steht (53,54). Die Clathrin-vermittelte Endozytose bewirkt eine Invagination der Zellmembran, welche sich durch Abschnürung von dieser löst. Im Endosom wird nun der pH-Wert über Protonenpumpen abgesenkt, woraufhin eine Ablösung der Liganden vom Rezeptor und in diesem Fall eine Protonierung der Nanopartikel stattfindet. Es gibt Indizien, dass es durch die Interaktion dieser Kationen mit der anionischen, endosomalen Hülle zu einer Destabilisierung der Membran mit Ausbildung von Poren kommt. Durch diese können die Nanopartikel ohne Ruptur des Endosoms entkommen (55). Auf diese Weise gelangt nun die mRNA in das Zytosol, wo sie in das gewünschte Produkt translatiert werden kann. Da die LNPs jedoch zum größten Teil in die Leber gelangen, sind sie nicht besonders vorteilhaft, um eine DC-Aktivierung auszulösen und damit als Überträgersubstanz für systemische Verabreichung der mRNA-Krebsimpfung eher unbrauchbar. (56)

5.5 Applikationsformen

Die mRNA muss in der Lage sein, die Zellmembran der Wirtszelle zu durchdringen, um in das Zytoplasma an ein Ribosom zu gelangen, damit sie schließlich translatiert wird. Allerdings besitzen sowohl die Zellmembran als auch

die Nukleinsäure eine negative Ladung, die es zu überwinden gilt. Des Weiteren besteht die Gefahr des zu schnellen Abbaus der mRNA durch extrazelluläre Ribonuklease, welche bei transkutaner Verabreichung deutlich verringert ist (16,37). Aufgrund dieser Hindernisse ist das Finden der passenden Applikationsform, die das codierte Protein in eine Vielzahl von Zellen bringt und gleichzeitig eine hohe Translationsrate verspricht, eine große Herausforderung (16,37).

Es werden zwei Hauptgruppen von mRNA-Impfstoffen aufgrund ihrer Konstruktion und Replikationsfähigkeit unterschieden: die Selbst-amplifizierende mRNA (SAM), welche in ein Alphavirus-Genom anstelle dessen eigenen codierenden Strukturproteine eingepflanzt ist und daher virale Eigenschaften besitzt. Und die nicht-replizierende mRNA mit der Struktur einer reifen mRNA und dem codierenden ORF für das gewünschte Antigen (37). Der SAM-Impfstoff bleibt weiterhin umstritten, da sowohl die Reaktogenität als auch die Form der hervorgerufenen Entzündung im Gegensatz zum Nicht-replizierenden Impfstoff nur schwer modifizierbar sind (37,56).

5.5.1 Injektion oder transkutane Applikation nackter mRNA

Bei dieser Form der mRNA-Überlieferung besteht zum einen die Möglichkeit der direkten Injektion und zum anderen die Applikation der mRNA mithilfe physikalischer Mittel. Die direkte Injektion der nackten mRNA wird heutzutage hauptsächlich in der Behandlung oder Prävention von infektiösen Krankheiten verwendet. An Mäusen bei subkutaner Injektion konnte beobachtet werden, dass die Übertragungswirksamkeit sogar höher ist als bei einem nanopartikel-basierten Impfstoff, jedoch gleichzeitig ein zu rascher Abbau der mRNA stattfindet, was wiederum die Wirksamkeit insgesamt stark abschwächt (37).

Da die Haut in der Epidermis reich an Keratinozyten ist, welche eine wichtige Rolle in der Ausschüttung von Zytokinen spielen und sogar an der Antigenpräsentation beteiligt sind, und da die Haut auch viele Langerhans Zellen besitzt, ist sie ein anzustrebendes Zielorgan, um eine Immunantwort zu induzieren (16). Mithilfe physikalischer Mittel kann ein Durchtritt durch das Stratum corneum und die transdermale Übertragung der mRNA ermöglicht werden. Durch die Elektroporation, bei der die Zellmembran durch elektrischen Strom vorübergehend durchlässiger gemacht wird, können größere Moleküle wie die mRNA in die Zelle

geschleust werden. Bei einer Genkanone wiederum liegt die mRNA auf der Oberfläche von Goldpartikeln auf, welche unter einen durch Heliumgas erzeugten Druck in die Zellen geschossen werden. Zuletzt sei die perkutane Applikation der mRNA durch Mikronadeln noch erwähnt (16,37). Obwohl diese physikalischen Verfahren vielversprechende Ergebnisse liefern, gelten sie derzeit noch als riskant, da angenommen wird, dass hierbei die Zellstruktur und -aktivität verändert oder sogar ein nicht physiologischer Zelltod herbeigeführt werden könnte (37).

5.5.2 Der mRNA-Krebsimpfstoff

Das Prinzip, auf dem der mRNA-Krebsimpfstoff beruht, ist die Überlieferung eines gewünschten Antigens in Form eines codierenden mRNA-Transkripts in das Zytoplasma einer Wirtszelle, vorzugsweise in APCs. (37,57). Um den Schaden im gesunden Gewebe möglichst klein zu halten, wird vor allem auf Tumor-spezifische Antigene (TAAs), sogenannte Neoepitope, welche als Humane Leukozytenantigene (HLAs) spezifisch auf der Tumorzelloberfläche präsentiert werden, gesetzt und eine zellvermittelte Immunantwort über MHC-I angestrebt (56–58). Dieser mRNA-Botenstoff kann auf unterschiedliche Weise, sowohl in vitro als auch in vivo, in die Zelle eingebracht werden. Die nackte mRNA ist sehr instabil, aber auch die ungleiche Verteilung der Lymphozyten im Körper ist zu beachten, was eine genaue Abwägung der Verabreichungsform und der mRNA- ‚Verpackung‘ erfordert, was wiederum zusätzlich auf die unterschiedlichen Eigenschaften der verschiedenen Tumorgewebe abgestimmt werden muss (37).

Die in-vitro-Methode bedient sich der Elektroporation als Hilfsmittel, mit der die Membranen der extrahierten DCs kurzzeitig permeabler gemacht werden und auf diese Weise die gewünschte mRNA ins Zytoplasma gelangen kann. Bei dieser Applikationsform hat sich gezeigt, dass eine erhöhte Immunaktivität erreicht werden kann, wenn zusätzlich die mRNAs bestimmter Kostimulatoren, wie CD83, TNFRSF4 (tumor necrosis factor receptor superfamily member 4, OX40L) -Ligand und 4-1BB-Ligand gemeinsam übertragen werden (56,59). Aber auch an der Wirkung von ex vivo-geladenen DCs in Kombination mit TriMix, den codierenden mRNA-Adjuvantien CD70, CD40L und aktiver TLR4, oder wie in neueren Untersuchungen mit herkömmlichen Chemotherapeutika oder mit Immun-Checkpoint-Inhibitoren, wird geforscht. Die Kombination mit TriMix zeigte bereits in mehreren vorklinischen Studien eine verstärkte DC-Aktivität und eine unterstützte

Umwandlung von regulatorischen T-Zellen (T_{reg} s) in TH1-Zellen (56). Bei der Verabreichung von TriMixDC-MEL – TriMixDCs mit codierender mRNA einer Fusion von DC-LAMP (lysosomal associated membrane glycoprotein) und einer der vier Melanom-assoziierten Antigene (MAGE): Glykoprotein 100, Tyrosinase, MAGE-A3, MAGE-C2 – konnte eine Tumorregression im fortgeschrittenen Melanom erzielt werden (56,60–62). In Dreierkombination mit dem Monoklonalen Antikörper Ipilimumab, dem zytotoxischen T-Lymphozyten-Antigen 4 (CTLA4) und TriMix konnte sogar eine dauerhafte Tumorreduktion bei refraktären Melanomen und Melanom-Rezidiven erreicht werden (56,63).

Die direkte Injektion der mRNA-Krebsimpfung in den Organismus kann entweder auf herkömmlichen Wegen wie intrakutan, subkutan und intramuskulär geschehen oder auf unkonventionellere Art und Weisen (56). Die intranodale Injektion der nackten mRNA, auch in andere sekundäre Lymphgewebe wie die Milz, erlaubt ein Einbringen des Antigen-Rezepts in den Ort der Antigenpräsentation und der T-Zell-Aktivierung. Die nackte mRNA kann hier gezielt von DCs aufgenommen werden und eine starke systemische, antigenspezifische TH1-Immunantwort hervorrufen (56,64). Durch die vorherige systemische Verabreichung des FLT3 (Fms-like tyrosine kinase 3)-Liganden konnte eine um 40% höhere komplette Tumorremission als bei der alleinigen mRNA-Injektion in Mäusen erzielt werden (56,65). Die intratumorale Injektion der mRNA-Impfung bietet eine Methode, um eine schnelle und spezifische Aktivierung der ortsansässigen T-Zellen, jedoch in diesem Fall nicht durch die Präsentation von TAA-Rezepten, sondern durch mRNA codierte immunstimulierende Moleküle, hervorzurufen (56). Van der Jeugth et al. beobachteten, dass eine intratumoral verabreichte mRNA-Impfung, die für ein modifiziertes Zytokin, einem Interferon- β in Verbindung mit einem Transforming Growth Factor- β (TGF β) Antagonisten, codiert, für eine verstärkte CD8⁺-T-Zell-Aktivität und verzögertes Tumorwachstum in Mausmodellen bei Lymphomen oder Lungenkarzinomen mit Ovalbumin(OVA)-Expression sorgte (56,66).

Die systemische (intravenöse) Verabreichung der nackten mRNA ist hinsichtlich ihrer kurzen Überlebensdauer nicht besonders effizient, weshalb diese in Trägermoleküle ‚verpackt‘ werden muss. Auf diese Weise kann sie leichter in eine Zelle gelangen und ist besser vor RNasen geschützt, was wiederum zu einer effizienteren Translation führt (53,56). Die LNPs sind als Transportvehikel

aufgrund ihres hauptsächlichen Zielorganes, der Leber, für die mRNA-Krebsimpfung wenig gewinnbringend. Hier haben sich Lipoplex(LPX)-Formulierungen, bei der die mRNA von einer Lipid-Doppelschicht umschlossen wird (67), als deutlich geeigneter erwiesen. RNA-LPXs unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Zusammensetzung, ihrer Ladungsverhältnisse (Lipid-RNA-Ratio) und ihrer ionischen Bedingungen (68). In der Lunge zeigte sich eine höhere Antigen-Expression als in der Milz im Falle einer leicht positiven Ladung der Lipidvehikel, welche mit zunehmend sinkendem Ladungsverhältnis der Vehikel jedoch zugunsten der Milz ausfiel (56,68). RNA-LPX-Impfstoffe werden mittlerweile, da sich keine toxische Wirkung in Mäusen und nicht menschlichen Primaten gezeigt hat, in klinischen Studien getestet, unter anderem gegen Melanome im Spätstadium (NCT02410733) (37,56). Eine relativ neue Art der mRNA-,Verpackung‘ an der bereits geforscht wird, sind die Gold-Nanopartikel, welche als Bio-Vehikel dienen könnten (11).

6 Materialien und Methoden

6.1 Bioinformatische Abfrage

Um potenzielle neue Ziele für mRNA-Impfstoffe in der Krebstherapie zu identifizieren, wurde das Genotype-Tissue Expression (GTEx) portal (<https://gtexportal.org/home/>) verwendet, wo es gewebsspezifische RNA-Sequencing Daten für insgesamt 53 Gewebetypen gibt. Es stehen in dieser Datenbank Daten für 56200 Gene und Ihre Varianten, verteilt auf 53 Gewebetypen, zur Verfügung (detaillierte Auflistung in **Tabelle 1**). (adipose_subcutaneous, adipose_visceral_omentum, adrenal_gland, artery_aorta, artery_coronary, artery_tibial, bladder, brain_amygdala, brain_anterior_cingulate_cortex_ba24, brain_caudate_basal_ganglia, brain_cerebellar_hemisphere, brain_cerebellum, brain_cortex, brain_frontal_cortex_ba9, brain_hippocampus, brain_hypothalamus, brain_nucleus_accumbens_basal_ganglia, brain_putamen_basal_ganglia, brain_spinal_cord_cervical_c-1, brain_substantia_nigra, breast_mammary_tissue, cells_cultured_fibroblasts, cells_ebv-transformed_lymphocytes, cervix_ectocervix, colon_sigmoid, colon_transverse, esophagus_gastroesophageal_junction, esophagus_mucosa, esophagus_muscularis, fallopian_tube, heart_atrial_appendage, heart_left_ventricle, kidney_cortex, kidney_medulla, liver, lung, minor_salivary_gland, muscle_skeletal, nerve_tibial, ovary, pancreas, pituitary, prostate, skin_not_sun_exposed_suprapubic, skin_sun_exposed_lower_leg, small_intestine_terminal_ileum, spleen, stomach, testis, thyroid, uterus, vagina, whole_blood). Die Geneexpression des spezifischen Gens in den unterschiedlichen Gewebetypen wurde mit Transcripts Per Kilobase Million (TPM) angegeben. TPM bezeichnet die Anzahl der von diesem Gen/Transkript abstammenden RNA-Moleküle in der RNA-seq-Probe von 1.000.000 RNA-Moleküle. RNA-seq stellt eine Methode zur Bestimmung der Nukleotidabfolge der RNA dar. TPM wird errechnet, indem man das Produkt aus der Anzahl der auf dem Gen abgebildeten Reads, die Länge des Reads, und 1.000.000 durch das Produkt aus Länge des feature (Exons/Transkripts) vom Gen und die Summe aller "beprobten Transkripte" dividiert. Es wurde der komplette Datensatz von GTEx als CSV (Comma-separated values) heruntergeladen und

die Auswertung mittels R (Version 4.3.1) durchgeführt. Die PubMed-Abfrage erfolgte mittels der R-Bibliothek RCurl (version 1.98.1.13). Um die Genspezifischen Informationen erhalten und die ENSG-Nummer mit den jeweiligen Informationen verknüpfen zu können, wurde die R-Bibliothek BiomaRt (version 2.56.1) verwendet und die Ergebnisse mittels ggplot2 (version 3.4.2) visualisiert.

6.2 Literaturrecherche

Eine Liste der zwanzig häufigsten Gene wurde erstellt und das jeweilige Gen in PubMed gesucht (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>). Alle Informationen, welche Aufschluss über die Funktion eines Gens gaben, und dessen jeweilige Rolle im Krebs bzw. in unterschiedlichen Krebsarten im Speziellen wurden in den Resultaten zusammengefasst und in einer Tabelle übersichtlich dargestellt.

7 Ergebnisse

Insgesamt wurden in GetEx 56.200 Gene in 53 Gewebetypen (detaillierte Auflistung in **Tabelle 1**) untersucht. Die Gewebetypen mit den höchsten durchschnittlichen TPMs pro Gen waren der Uterus (8.30 TPM), die Prostata (8.02 TPM), das Ovar (7.69 TPM), der Nervus tibialis (7.21 TPM) und die Schilddrüse (6.89 TPM) (Detailliert in **Abbildung 15**). Die maximalen TPMs pro Gen pro Gewebe waren die Milz (33.53 TPM), gefolgt von der Prostata (30.77 TPM), der Schilddrüse (30.32 TPM), den Coronararterien (29.45 TPM) und dem Uterus (26.44 TPM).

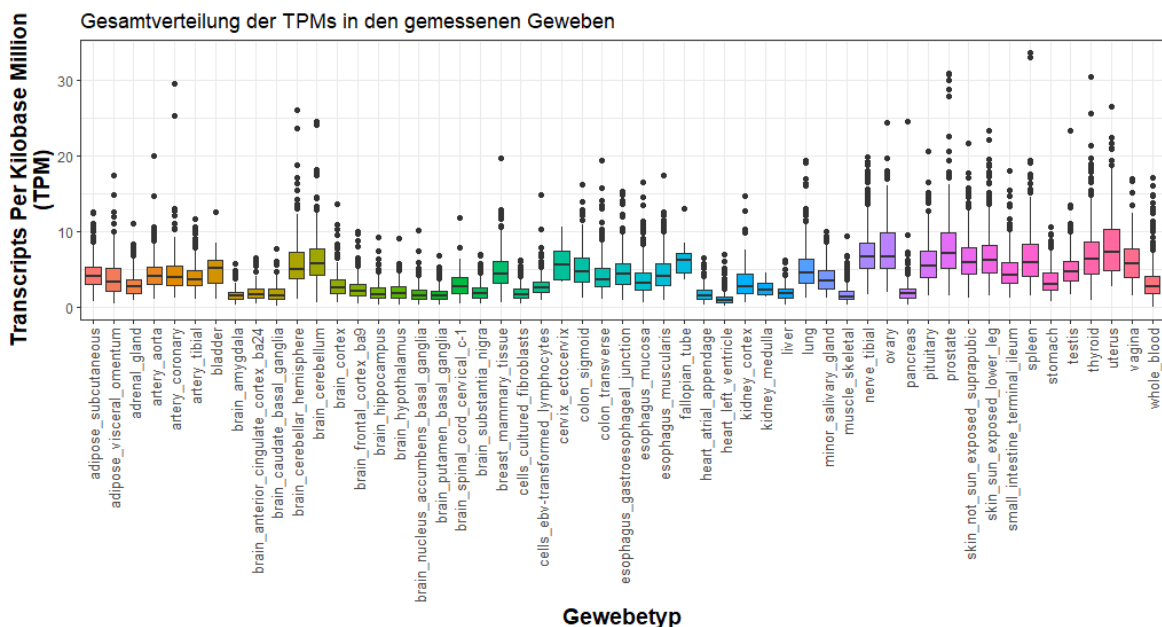


Abbildung 15: Mittlere Gesamtexpressionsverteilung aller Gene pro Gewebetyp. Das Expressionsmuster pro Gewebetyp wurde mittels Boxplot dargestellt, wobei auf der X-Achse die einzelnen Gewebetypen dargestellt sind und auf der Y-Achse die TPMs. (TPM = Transcripts Per Kilobase Million)

Schaut man sich die insgesamt 58800 Gene an und klassifiziert sie anhand ihrer ENSEMBL-Charakterisierung, so ergibt sich für die Gene, die in GetEx analysiert wurden, folgendes Bild: Die meisten der 58800 Gene waren Protein codierende Gene (n=19668, 33.45%), gefolgt von long-non-coding RNAs (lncRNA)(n=13685), prozessierten Pseudogenen (n=10012), ribosomale RNA (rRNA)(n=598), unprozessierten Pseudogenen (n=2496) und small RNAs (snRNA)(n=2075) (Vollständige Auflistung in **Tabelle 1**).

Table 1. ENSEMBL Kategorisierung der unterschiedlichen Gen-Loci.
 Jede ENSG-Nummer wurde über die ENSEMBL-Datenbank abgefragt und die Kategorien hier aufgelistet.

| Ensembl Gene Biotype | Beschreibung | Anzahl |
|---------------------------------|--|--------|
| artifact | | 19 |
| IG_C_gene | Immunglobulin-Gen mit konstanter Kette, durchläuft eine somatische Rekombination vor der Transkription | 14 |
| IG_C_pseudogene | | 9 |
| IG_D_gene | Immunglobulin-Gen mit variabler Kette, durchläuft eine somatische Rekombination vor der Transkription | 37 |
| IG_J_gene | Immunglobulin-Gen mit einer J-Kette, durchläuft eine somatische Rekombination vor der Transkription | 18 |
| IG_J_pseudogene | | 3 |
| IG_pseudogene | Inaktiviertes Immunglobulin-Gen | 1 |
| IG_V_gene | Immunglobulin-Gen mit variabler Kette, durchläuft eine somatische Rekombination vor der Transkription | 145 |
| IG_V_pseudogene | | 187 |
| lncRNA (long-non-coding RNA) | Nicht-codierendes Transkript bzw. Gen mit einer Basenlänge von > 200 Basen. | 13685 |
| miRNA | Kurze RNA (~22bp), legt die Expression einer Ziel-mRNA still | 1573 |
| misc_RNA (Miscellaneous RNA) | Nicht-codierende RNA, kann nicht klassifiziert werden | 2006 |
| Mt_rRNA | | 2 |
| Mt_tRNA | Transfer-RNA, die im mitochondrialen Genom lokalisiert ist | 22 |
| processed_pseudogene | Pseudogen ohne Introns, vermutlich durch reverse Transkription einer mRNA mit anschließender Integration der DNA in das Genom entstanden | 10012 |
| protein_coding | Gen/Transkript, das einen offenen Leseraster (ORF) | 19668 |

| | enthält. | |
|---|--|------|
| Pseudogene | Gen mit Homologie zu einem Protein-kodierenden Gen, das ein Frameshift oder Stoppcodon enthält, welches den ORF unterbricht, vermutlicher Funktionsverlust aufgrund von Genduplikation | 13 |
| Ribozyme | | 6 |
| rRNA | RNA-Komponente eines Ribosomes | 2598 |
| rRNA_pseudogene | | 482 |
| scaRNA (small Cajal body-specific RNA) | | 42 |
| scRNA | | 1 |
| snoRNA | Kurze nukleoläre RNA-Moleküle, die an den posttranskriptionellen Modifikationen beteiligt sind | 859 |
| snRNA | Kurze nukleäre RNA-Moleküle, die an der Prozessierung der Vorläufer-mRNA beteiligt sind | 2075 |
| sRNA | | 4 |
| TEC (To be Experimentally Confirmed) | Region mit EST (Expressed Sequenz Tag) -Cluster, welches durch Enthalten von Poly(A)-Merkmalen auf die Präsenz eines Protein-codierenden Gens hindeutet | 999 |
| TR_C_gene | T-Zell-Rezeptor-Gen mit konstanter Kette, durchläuft eine somatische Rekombination vor der Transkription | 6 |
| TR_D_gene | T-Zell-Rezeptor-Gen mit variabler Kette, durchläuft eine somatische Rekombination vor der Transkription | 4 |
| TR_J_gene | T-Zell-Rezeptor-Gen mit einer J-Kette, durchläuft eine somatische Rekombination vor der Transkription | 79 |
| TR_J_pseudogene | | 4 |
| TR_V_gene | T-Zell-Rezeptor-Gen mit variabler Kette, durchläuft eine somatische Rekombination vor der Transkription | 106 |

| | | |
|------------------------------------|---|--------------|
| TR_V_pseudogene | | 33 |
| transcribed_processed_pseudogene | | 477 |
| transcribed_unitary_pseudogene | | 147 |
| transcribed_unprocessed_pseudogene | Pseudogen, das Introns enthalten kann, da es durch Genduplikation entsteht. | 881 |
| translated_processed_pseudogene | Pseudogene, mit Hinweis auf deren Translation durch Massenspezifikationsdaten | 1 |
| Summe | | 58800 |

Ein wesentliches Problem vieler Medikamente sind potenziell lebensbedrohliche Nebenwirkungen. Ein weiteres Problem sind Schäden, die an besonders vulnerablen Organen auftreten können oder an Organen, wo Schäden unerwünscht sind, weil sich diese Gewebsarten gar nicht bis sehr langsam regenerieren. Aus diesem Grund wurden Gene mit einer sehr hohen Expression im Zentralnervensystem (ZNS) (brain_amygdala, brain_anterior_cingulate_cortex_ba24, brain_caudate_basal_ganglia, brain_cerebellar_hemisphere, brain_cerebellum, brain_cortex, brain_frontal_cortex_ba9, brain_hippocampus, brain_hypothalamus, brain_nucleus_accumbens_basal_ganglia, brain_putamen_basal_ganglia, brain_spinal_cord_cervical_c-1, brain_substantia_nigra) und dem Herzen (heart_atrial_appendage, heart_left_ventricle) aus der Analyse rausgenommen. Der Cutoff wurde bei 0.1 TPM vom Mittelwert des jeweiligen Genes genommen, wobei ein Wert über 0.1 TPM in einem der genannten Gewebsarten gereicht hat, damit das betreffende Gen exkludiert wurde.

Insgesamt wurden so 33518 Gene aus der Analyse exkludiert, wobei 17578 proteinkodierende Gene waren (Detailliert in **Tabelle 2**).

Tabelle 2. Anzahl der exkludierten Gentyphen

| Ensembl Gene Biotype | Anzahl |
|-----------------------------|---------------|
| Artifact | 10 |
| IG_C_gene | 13 |
| IG_C_pseudogene | 5 |
| IG_D_gene | 2 |
| IG_J_gene | 14 |
| IG_V_gene | 99 |
| IG_V_pseudogene | 6 |
| lncRNA | 8405 |

| | |
|------------------------------------|--------------|
| (long-non-coding RNA) | |
| miRNA | 189 |
| misc_RNA | 503 |
| Mt_rRNA | 3 |
| Mt_tRNA | 22 |
| processed_pseudogene | 3492 |
| protein_coding | 17578 |
| Pseudogene | 1 |
| rRNA | 4 |
| rRNA_pseudogene | 77 |
| scaRNA | 15 |
| scRNA | 1 |
| snoRNA | 249 |
| snRNA | 321 |
| sRNA | 1 |
| TEC | 614 |
| TR_C_gene | 6 |
| TR_J_gene | 13 |
| TR_V_gene | 53 |
| TR_V_pseudogene | 5 |
| transcribed_processed_pseudogene | 298 |
| transcribed_unitary_pseudogene | 104 |
| transcribed_unprocessed_pseudogene | 570 |
| translated_unprocessed_pseudogene | 3 |
| translated_processed_pseudogene | 1 |
| Unprocessed_pseudogene | 604 |
| Unitary_pseudogene | 21 |
| Summe | 33300 |

Um potenzielle Gene zu finden, die nur in einem Gewebetyp exprimiert bzw. stark überexprimiert sind, wurde der Median der Expression des jeweiligen Genes über alle Gewebetypen genommen und nur das Gen genommen, das zumindest eine 10-fache Überexpression im Vergleich zum Median hatte. Hierbei konnten wir insgesamt 3428 Gene identifizieren (Detailliert in **Abbildung 16**). Die meisten Gene waren im Hoden überexprimiert gefolgt von der Leber und dem Blut. Der Großteil der identifizierten Gene waren vom Typus her codierend für eine lncRNA (n=1921, 56.03%) gefolgt von proteincodierender RNA (n=581, 16.95%) (Detailliert in **Tabelle 3**).

Tabelle 3. Übersicht aller gefundenen Gene.

| Ensembl Gene Biotype | Anzahl |
|----------------------|--------|
| IG_D_gene | 1 |
| IG_V_gene | 4 |

| | |
|------------------------------------|-------------|
| IG_V_pseudogene | 11 |
| lncRNA | 1921 |
| miRNA | 9 |
| misc_RNA | 30 |
| processed_pseudogene | 362 |
| protein_coding | 581 |
| rRNA_pseudogene | 5 |
| snoRNA | 13 |
| snRNA | 16 |
| TEC | 60 |
| TR_J_gene | 27 |
| TR_J_pseudogene | 1 |
| TR_V_gene | 8 |
| TR_V_pseudogene | 2 |
| transcribed_processed_pseudogene | 64 |
| transcribed_unprocessed_pseudogene | 112 |
| unitary_pseudogene | 10 |
| unprocessed_pseudogene | 173 |
| transcribed_unitary_pseudogene | 18 |
| Summe | 3428 |

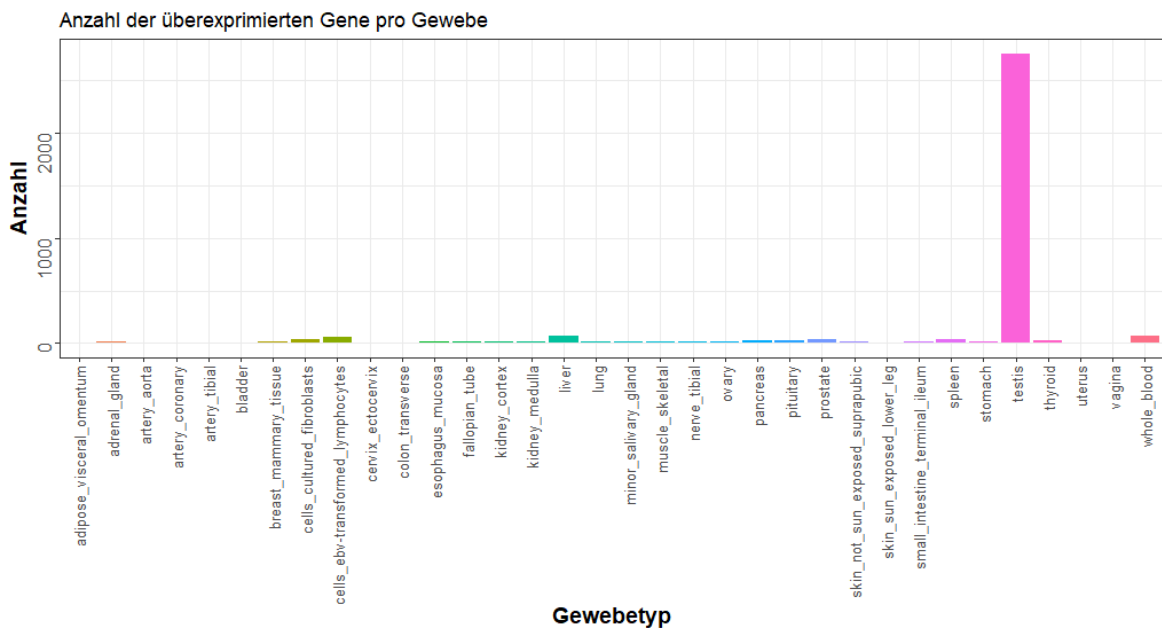


Abbildung 16: Anzahl der überexprimierten Gene pro Gewebe. Es wurde der Median der Expression des jeweiligen Gens über alle Gewebetypen genommen und nur Gene gezählt, die eine zumindest 10-fach höhere Expression in einem Gewebe als der Median über alle Gewebetypen hinweg hatten.

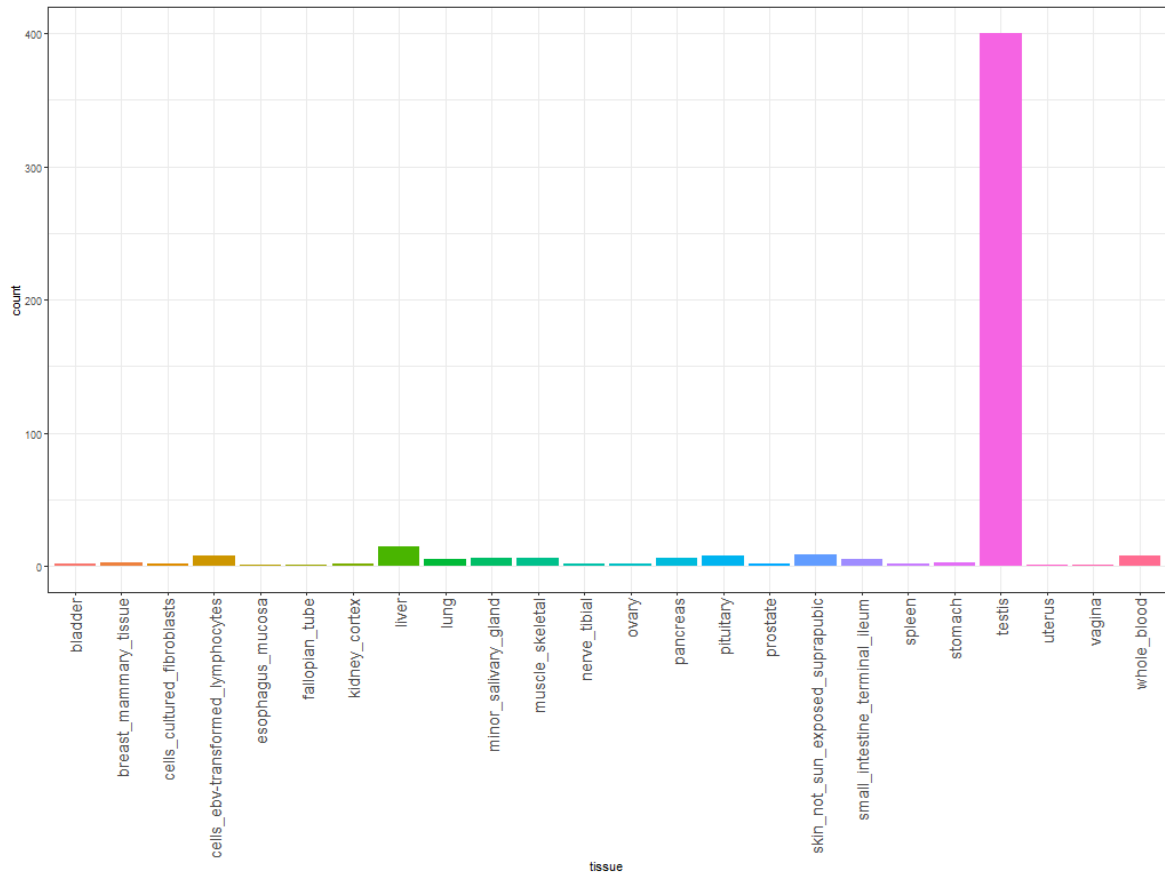


Abbildung 17: Gewebeverteilung der überexprimierten proteincodierenden Gene. Es wurden nur Gene in dieser Abbildung miteinbezogen, die laut ENSEMBL-Datenbank eine proteincodierende Funktion haben.

7.1 Genzusammenfassung

7.1.1 NCR2

Das NCR2-Gen (Natural Cytotoxicity Receptor 2), lokalisiert auf Chromosom 6 (6p21.1), gehört der NCR-Familie an, zu der außerdem zwei weitere Gene, NCR1, codierend für NKp46, und NCR3, codierend für NKp30, gezählt werden. NCR2 ist die codierende Vorlage für wiederum drei verschiedene durch Splicing entstehende Transkripte: NKp44-1, -2 und -3 (NK-Zell-aktivierenden Rezeptor NKp44 (CD336 (HLA))). Nur aus NKp44-1 entsteht ein Protein mit einem langen zytoplasmatischen Teil, welcher sowohl inhibiert als auch aktiviert werden kann. Die Aktivierung läuft über die Assoziation mit DAP12 (DNAX-activation protein of 12 KDa), die Inhibierung, welche mit der MHC-I-Präsentation der körpereigenen Proteine vergleichbar ist, über eine sogenannte ITIM-ähnlichen Sequenz (Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibition Motif) (69,70).

Der NKp44-Rezeptor wird überwiegend auf aktivierten NK-Zellen, anders als NKp46 und NKp30, die sich ebenso auf ruhenden NK-Zellen in der Peripherie befinden, exprimiert, da er durch die Stimulation von Interleukin (IL)-2 und IL-15 vermehrt eingebaut wird. Außerdem befindet sich dieser Rezeptor unter anderem auf plasmazytoiden dendritischen Zellen, auf sogenannten ILCs – innate lymphoid cells (ILC1 und ILC3), auf $V\delta 1^+$ -Zellen (periphere $\gamma\delta$ -T-Zelle) und auf intraepithelialen Lymphozyten (IELs) der Darmschleimhaut vor (70).

NKp44 spielt eine wichtige Rolle bei der Bewachung von Tumorzellen, da über diesen die Funktionen der NK-Zellen sowohl in ihrer Zytotoxizität als auch in ihrer Zytokinsekretion reguliert werden. Viele maligne Zellen, aber auch virusinfizierte Zellen, sezernieren Liganden, die durch Bindung an NKp44 sowie in Kooperation mit den anderen NCRs die Zytotoxizität der NK-Zellen befeuern, aber auch hemmen können (69). Eine vermehrte Expression von NKp44-1 wurde in den Dezidualzellen während einer Schwangerschaft festgestellt, was ebenso mit einem hohen Level von PCNA (Proliferating-Cell-Nuclear-Antigen) – einem inhibierenden Liganden – vergesellschaftet war, um vermutlich für eine bessere Akzeptanz zwischen Immunsystem der Mutter und dem kindlichen Gewebe zu sorgen. Jedoch haben sich viele Tumorzellen genau diesen Mechanismus zu eigen gemacht, weshalb sie unter anderem aufgrund dessen dem Immunsystem entkommen können (71).

Tabelle 4: Überblick – NCR2

| Gen | Physiologie | Pathologie | Survival |
|------|---|---|--|
| NCR2 | NKp44-Rezeptor-vermittelte Regulation der Zytotoxizität von NK-Zellen (CD8+-unabhängig), Erhöhung der Toleranz gegenüber kindlichem Gewebe in der Schwangerschaft | Liganden-vermittelte Immuntoleranz bei Virus-infizierten Zellen und Tumorzellen | Hohe NKp44-1-Expression war mit einem schlechteren Outcome in AML assoziiert (69,70,72). |

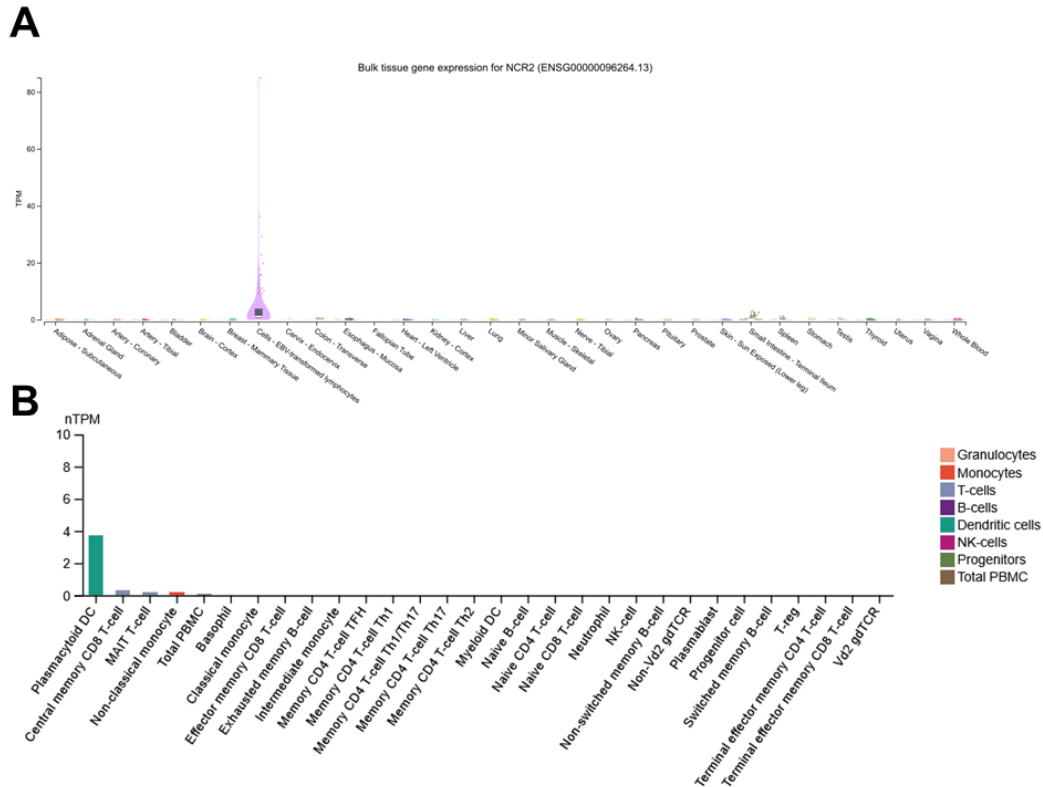


Abbildung 18: Expressionsprofil des NCR2-Gens.

(A) Violin-Plot mit dem Expressionsprofil des NCR2-Gens in 32 unterschiedlichen physiologischen Gewebetypen. Der Graph wurde von *gtexportal.org* zur Verfügung gestellt (73).

(B) Bar-Chart-Plot mit dem Expressionsprofil des NCR2-Gens in unterschiedlichen hämatopoetischen Zellen (74).

Die Gewebsspezifische Expression wurde auf der Y-Achse als TPMs (Transcripts Per Kilobase Million) dargestellt, der Zelltypus an der X-Achse.

In Bezug auf hämatologische Erkrankungen wurde keine signifikante Erhöhung des NKp44-Rezeptors auf den Zellen der Chronisch Lymphatischen Leukämie (CLL) und des Multiplen Myeloms (MM) festgestellt (75,76), wohingegen bei der Akuten Myeloischen Leukämie (AML) eine erhöhte Expression der Splicevariante NKp44-1 mit einer deutlich schlechteren Prognose assoziiert war (69,70,72).

In den frühen Stadien der Akuten Lymphatischen Leukämie (ALL) kommt es über die IL-15-Stimulation, aber auch auf den Zellen des Großzelligen B-Zell-Lymphoms (DLBCL) zu einer signifikant erhöhten Expression von NKp44 und zu einer Aktivierung der NK-Zellen, die eine Ausbreitung der malignen Zellen in die Peripherie eindämmt. Allerdings ist die vermehrte Expression von NKp44 und NKG2D – Natural Killer Group – im Knochenmark wiederum assoziiert mit einem deutlich erhöhten Risiko für einen späteren ZNS-Befall der Leukämiezellen,

vermutlich aufgrund der örtlich beschränkten NK-Zellen (77). Mit zunehmender Fortschreitung des DLBCLs lässt die NKp44-Expression hier jedoch deutlich nach (78).

Auch in primären Tumorgeweben von Brust, Lunge, Gebärmutter, Gebärmutterhals und Nieren konnte eine erhöhte Expression des Transkripts NKp44-1 im Vergleich zu gesundem Gewebe nachgewiesen werden. Im Kontrast hierzu ist im gastrointestinalen (GI-) Bereich dieses Transkript physiologisch weitaus höher vertreten als in anderen Organen, welches sogar in Relation zur Expression auf malignen Zellen aus GI-Tumoren überwiegt (71).

7.1.2 LGALS14

Das LGALS14-Gen (lectin-galactoside-binding soluble 14) ist auf Chromosom 19 (19q13.2) lokalisiert, codiert für das Protein Galektin-14, einem spezifischen humanen Galektin, dessen komplementäre DNA (cDNA) zunächst aus fetalem Gehirngewebe isoliert werden konnte, aber dessen mRNA hauptsächlich in Syncytiotrophoblasten exprimiert wird (79–81). Galektin-14 weist eine große Ähnlichkeit zu Galektin-13 auf, weshalb man teilweise auf überlappende Bezeichnungen in der Literatur stößt (80).

LGALS14 ist ein stark differentiell exprimiertes autosomales Gen, welches Entzündungen regulieren, die Apoptose aktivierter T-Zellen induzieren und Beta-Galactoside, z.B. Laktose, binden kann (82). In der Literatur existieren Hinweise, dass Galektin-14 die Akzeptanz des mütterlichen Immunsystems gegenüber dem kindlichen Gewebe erhöht und daher ein erfolgreiches Eindringen der extravillösen Trophoblasten in das Dezidualgewebe der Gebärmutter ermöglicht (79). Die Ursache für prä-/perinatalen Erkrankungen, die mit einer deutlich reduzierten Galektin-14-Expression einhergehen, wie Präeklampsie und Intrauterine Wachstumsretardierung (IUGR – Intrauterine Growth Restriction), welche wiederum mit Intrauterinem Fruchttod (IUFT) und Totgeburt, aber auch plötzlichem Kindstod (SIDS – Sudden Infant Death Syndrom) assoziiert sind, werden mit einem abnormal gesteuerten mütterlichen Immunsystem in Verbindung gebracht (82–85).

Tabelle 5: Überblick – LGALS14

| Gen | Physiologie | Pathologie | Survival |
|---------|---|--|---|
| LGALS14 | Spezifisches Plazenta-Galektin, vermutlich für eine erhöhte Toleranz gegenüber dem kindlichen Gewebe in der Schwangerschaft | weitgehend unbekannt – vermutlich durch Einfluss auf die Antitumor-Immunität und durch Unterstützung der Angiogenese | Erhöhte Expression assoziiert mit: schlechter Prognose beim Ovarialkarzinom, verbesserte Prognose beim Schilddrüsenkarzinom |

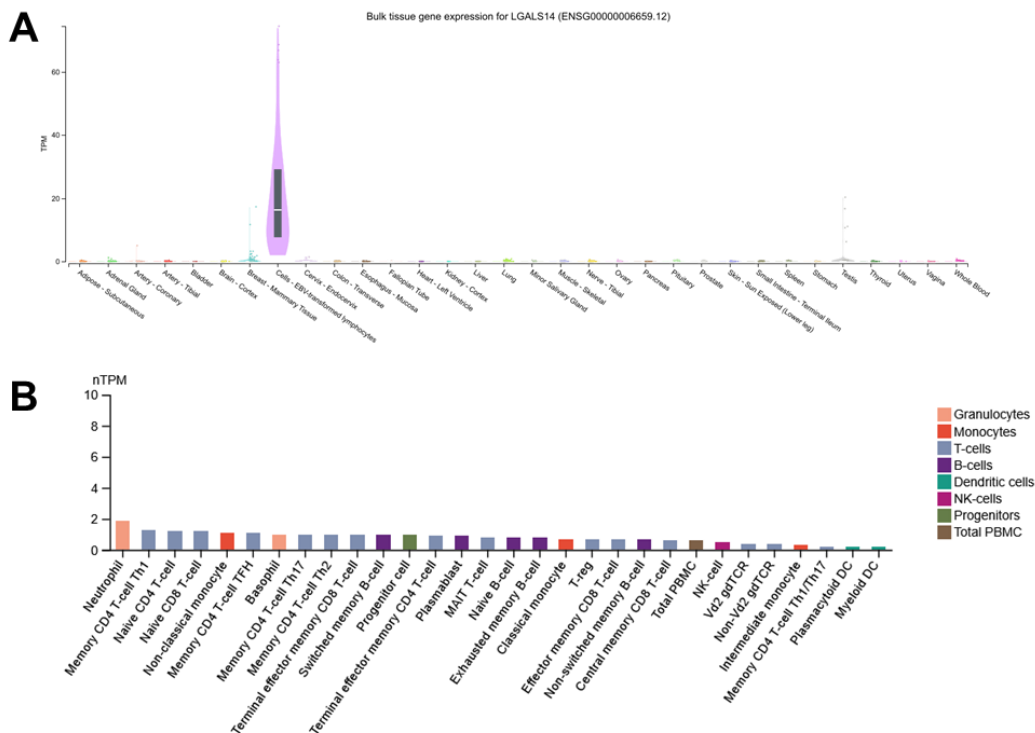


Abbildung 19: Expressionsprofil des LGALS14-Gen.

(A) Violin-Plot mit dem Expressionsprofil des LGALS14-Gen in 32 unterschiedlichen physiologischen Gewebetypen. Der Graph wurde von gtexportal.org zur Verfügung gestellt (73).

(B) Bar-Chart-Plot mit dem Expressionsprofil des LGALS14-Gen in unterschiedlichen hämatopoetischen Zellen (74).

Die Gewebsspezifische Expression wurde auf der Y-Achse als TPMs (Transcripts Per Kilobase Million) dargestellt, der Zelltypus an der X-Achse.

Über das Galektin-14 ist verhältnismäßig noch sehr wenig bekannt und besonders in Bezug auf hämatologische Erkrankungen sind Forschungsarbeiten noch ausstehend. Jedoch scheint es ein vielversprechendes Target zu sein, da schon andere Galektine (Gal-1, -3, -9, -12) als prognostische Marker für AML, Chronische Lymphatische Leukämie, Hodgkin- (HL), Non-Hodgkin-Lymphome (NHL) und andere hämatologische Malignitäten in Erwägung gezogen werden (86). Ebenso unerforscht bleibt bisher, ob Galektin-14 eine entscheidende Rolle in der Krebsentwicklung und -progression spielt und wenn ja, welche genau (87).

Bisher konnte eine erhöhte Galektin-14-Expression in Tumorgewebe von Leber, Brust, Uterus und Ovarien festgestellt werden. Aber auch das Lungenkarzinom wies eine sehr hohe Expressionsrate auf (88). Der seröse Histologietyp des Ovarialkarzinoms zeigte im Zusammenhang mit einer vermehrten Expression sogar eine schlechtere Prognose (89,90). Auch das Hepatozelluläre Karzinom (HCC) wird vermutlich durch Galektin-14 in seiner Progression unterstützt, da seine erhöhte Expression die Heparansulfat-Proteoglykan-Expression an der Zelloberfläche befeuert und dadurch wiederum die Epidermal-Growth-Factor-Sensibilität gesteigert wird, was mit einem schnelleren Wachstum einhergeht (91). Fuselier et al. hingegen konnten eine hohe Expressionsrate von LGALS14 im Schilddrüsenkarzinom mit verbesserter Prognose verzeichnen (88).

7.1.3 LIM2

Das LIM2-Gen (lens intrinsic membran protein 2) codiert auf Chromosom 19 (19q13.4) für das Membranprotein (MP) MP19, welches spezifisch für die Zellmembran der Linsenfasern zu sein scheint. Es stellte sich heraus, dass dieses Protein, solange der Zellkern noch vorhanden ist, im Zytoplasma verbleibt und erst bei Verlust des Nucleus in Folge der Ausdifferenzierung in die sekundären Linsenfasern, in die Membran eingebaut wird (92,93). Es gibt Hinweise, dass MP19 einen deutlichen Einfluss in der Linse auf die Ausbildung der Zellmorphologie, auf die Intakthaltung des Zytoskeletts und auf die interzelluläre Kommunikation – die Organisation der Zellverbindungen – hat und mit Calmodulin interagiert (94,95). Auch Spermatozoen, die Vorläuferzellen der Spermien (96), aber auch im Blut die NK-Zellen und wenige T-Zell-Untergruppen exprimieren dieses Gen (97).

Tabelle 6: Überblick – LIM2

| Gen | Physiologie | Pathologie | Survival |
|------|--|--|--|
| LIM2 | Membranprotein MP19 in der Zellmembran der kernlosen Linsenfaserzellen, vermutlich Barriereaufbau der Linse über Gap junctions | Kongenitaler Katarakt durch Mutation im LIM2-Gen: R130C (auto.-dom) G78D(auto.-rez.) | Gemeinsame Überexpression von CD133 und LIM2 im Glioblastom – Hinweis auf verkürztes Überleben |

Die Mutation R130C des LIM2-Gens, die einen autosomal-dominanten Katarakt, welcher zusätzlich mit einem Nystagmus und einer Amblyopie einhergeht, verursacht, wurde in einer chinesischen Familie untersucht (98). Auch die Missense-Mutation G78D ist verantwortlich für die autosomal-rezessive Katarakt-Vererbung (99). Zu dem LIM2-Gen gibt es bisher nur wenige Forschungsarbeiten bezüglich dessen genauen Funktion und seiner Involvierungen in maligne Erkrankungen. In Glioblastomen konnte eine erhöhte Expression festgestellt werden, welche in gemeinsamer Überexpression mit CD133 auf eine schlechte Prognose hindeutete (100).

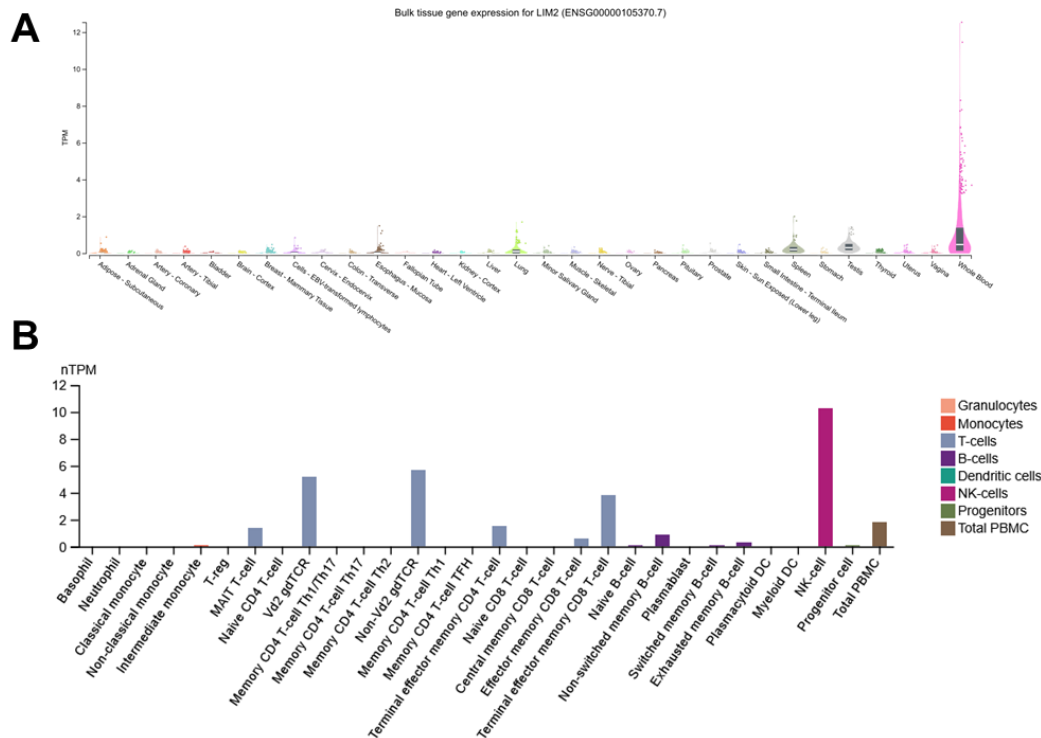


Abbildung 20: Expressionsprofil des LIM2-Gens.

(A) Violin-Plot mit dem Expressionsprofil des LIM2-Gens in 32 unterschiedlichen physiologischen Gewebetypen. Der Graph wurde von gtexportal.org zur Verfügung gestellt (73).

(B) Bar-Chart-Plot mit dem Expressionsprofil des LIM2-Gens in unterschiedlichen hämatopoetischen Zellen (74).

Die Gewebsspezifische Expression wurde auf der Y-Achse als TPMs (Transcripts Per Kilobase Million) dargestellt, der Zelltypus an der X-Achse.

7.1.4 CABP5

Das CABP5-Gen (Calcium-binding protein 5), codiert für ein gleichnamiges neuronales Calcium-bindendes Protein und liegt auf Chromosom 19 (19q13.33) zusammen mit dem CABP3-Gen. Dieses Gen wird in den ON- und OFF-Zapfenbipolarzellen sowie in den Stäbchenbipolarzellen der Retina und in den Haarzellen der Cochlea exprimiert (101,102). Die Calcium-bindende Subfamilie, bestehend aus fünf Mitgliedern, welche sich nicht alle auf einem Chromosom ansammeln. Sie weisen große Ähnlichkeit zum Calmodulin (CaM) auf und teilen sich bestimmte Angriffspunkte, wie spannungsgesteuerte Calciumkanäle, TRP- (transient receptor potential) Kanäle und IP3 (Inositol-1,4,5-triphosphat) Rezeptoren (101,102). Die genaue Funktion des Gens ist bisher nicht geklärt, jedoch wurde bei CABP5-Knockout-Mäusen eine verminderte Sensibilität der Ganglienzellen der Retina gegenüber Stäbchen-Reize festgestellt (102).

Außerdem ist CABP5 in verschiedenartige Signalwege über die Interaktion mit Proteinen involviert, unter anderem mit Munc18-1 (Syntaxin-binding-protein) und Myosin VI, welche in den Ablauf des Vesikelzyklus von Neurotransmittern eingebunden sind. CABP5 stimuliert das Auswachsen von Nervenaxonen und die Exozytose von Neurotransmitter-Vesikel in PC12-Zellen (Phäochromozytomzellen) (103).

Tabelle 7: Überblick – CABP5

| Gen | Physiologie | Pathologie | Survival |
|-------|---|------------|----------|
| CABP5 | neuronales Calcium-bindendes Protein, exprimiert von den Sinneszellen der Retina und der Cochlea, Involvierung im Vesikelzyklus von Neurotransmittern | - | - |

Forschungsarbeiten zu verschiedenen Zusammenhängen zwischen CABP5 und Pathologien oder Malignitäten konnten keine auf PubMed gefunden werden. Auch Hinweise auf Expression in Blutzellen und Geweben, wie Lunge und Milz, konnten nicht belegt werden. *The Human Protein Atlas* gibt hingegen die zusätzliche Expression in Testikelgewebe an (104).

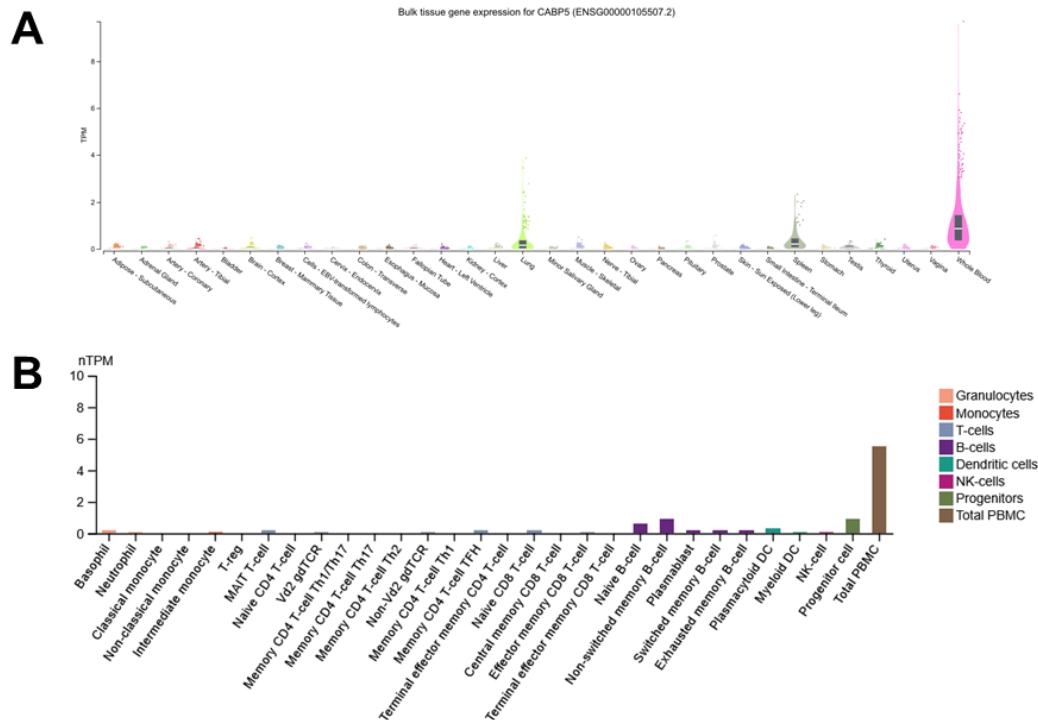


Abbildung 21: Expressionsprofil des CABP5-Gens.

(A) Violin-Plot mit dem Expressionsprofil des CABP5-Gens in 32 unterschiedlichen physiologischen Gewebetypen. Der Graph wurde von gtexportal.org zur Verfügung gestellt (73).

(B) Bar-Chart-Plot mit dem Expressionsprofil des CABP5-Gens in unterschiedlichen hämatopoetischen Zellen (74).

Die Gewebsspezifische Expression wurde auf der Y-Achse als TPMs (Transcripts Per Kilobase Million) dargestellt, der Zelltypus an der X-Achse.

7.1.5 OR51G2

Das OR51G2-Gen (olfactory receptor family 51 subfamily G member 2) codiert für einen G-Protein-gekoppelten, olfaktorischen Rezeptor (OR) und ist gespeichert im OR-Lokus auf Chromosom 11. OR51G2 gehört wie OR51B2 der Olfaktorischen Rezeptorfamilie, jedoch einer anderen Unterfamilie, an und ist daher mit Geruchsmolekülen kompatibel, die sich strukturell voneinander unterscheiden (105,106). Der Expressionsort von OR51G2 ist auch das Riechepithel in der Regio olfactoria, allerdings konnte dieser Rezeptor, sowie einige andere ORs, auch auf humanen Spermatozoen festgestellt werden (107).

Tabelle 8: Überblick – OR51G2

| Gen | Physiologie | Pathologie | Survival |
|--------|--|------------|----------|
| OR51G2 | G-Protein-gekoppelter Rezeptor im Riechepithel für die Aufnahme olfaktorischer Reize | - | - |

Dieses Gen und sein zugehöriger Rezeptor sind noch zu unbekannt und daher konnten keine Publikationen zu weiteren Funktionen oder Verbindungen hinsichtlich Pathologien gefunden werden.

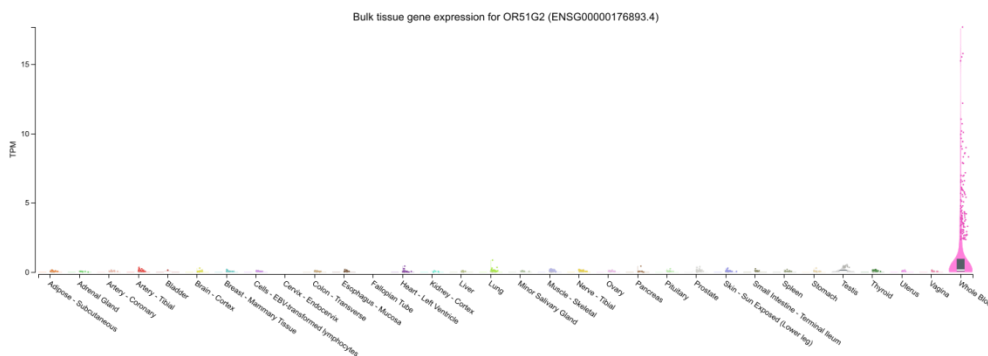


Abbildung 22: Expressionsprofil des OR51G2-Gens.

Violin-Plot mit dem Expressionsprofil des OR51G2-Gens in 32 unterschiedlichen physiologischen Gewebetypen. Der Graph wurde von gtexportal.org zur Verfügung gestellt (73).

Die Gewebsspezifische Expression wurde auf der Y-Achse als TPMs (Transcripts Per Kilobase Million) dargestellt, der Zelltypus an der X-Achse.

7.1.6 CCR8

Das CCR8-Gen (Chemokine-recetor-8-Gen) auf Chromosom 3 (3p22.1) codiert für seinen gleichnamigen G-Protein-gekoppelten Rezeptor, der vor allem mit zwei ausgewählten Chemokin-Liganden, CCL1 und CCL18 interagiert (108,109). CCL1 (I-309, TCA3), welches auch von T-Zellen sezerniert wird, nimmt eine einzigartige Rolle ein, da es die regulatorischen T-Zellen (T_{reg} – CD4⁺CD25⁺CD127^{low}) zu einer

vermehrten Expression von CCR8 anregt und sie nachfolgend über eine STAT3 (Signale Transducer and Activator of Transcription)-abhängige Erhöhung von CD39, Granzym B und IL-10 in ihrer immunsupprimierenden Aktivität verstärkt. (110,111) Es gibt laut weiterer Forschungsarbeiten auch Hinweise darauf, dass noch weitere Liganden am CCR8 wirken können (112,113).

Die physiologische CCR8-Exprimierung findet in Lymphozyten, bevorzugt in CD4⁺-αβ T-Zellen, vor allem Forkhead-Box-Protein P3-positiven (FoxP3⁺) T_{regs} und T-Gedächtniszellen, wie auch in folliculären THs, statt. In anderen Immunzell-Typen, außer auf wenigen γδT- und NK-Zellen, konnte keine Expression festgestellt werden (109,112). Des Weiteren ist CCR8 in gesunden Geweben, mit einer Ausnahme, nur äußerst gering oder gar nicht vorhanden. Es wurde nachgewiesen, dass in gesundem Hautgewebe die Anzahl der im peripheren Blut vorkommenden CCR8⁺-Zellen um ein Vielfaches übersteigt und dass sie einige Merkmale sesshafter Gedächtniszellen, wie z.B. die Expression von CD69/CD103 und ihre Proliferation auf IL-7- und IL-15-Aktivierung, aufweisen (109,114,115). An diesem vermehrten Auftreten von CCR8⁺-Zellen scheinen die hauttypischen Stoffe, Calcitriol (1,25-(OH)₂-Vitamin D₃) und Prostaglandin E₂, beteiligt zu sein, da sie die CCR8-Expression induzieren können (109,116). Älteren Beurteilungen nach wird über eine Expression von CCR8-mRNA in humanen Endothelzellen der Umbilikalvene und CCR8-Rezeptoren im Kaposi-Sarkom berichtet, jedoch werden diese Ergebnisse in späteren Forschungsarbeiten nicht wieder aufgegriffen (117,118).

Tabelle 9: Überblick – CCR8

| Gen | Physiologie | Pathologie | Survival |
|------|--|--|--|
| CCR8 | Chemokin-Rezeptor-vermittelte Regulation der immunsuppressiven Aktivität von T _{regs} , steuert gegen Autoimmunerkrankungen und Allergien, Instandhaltung eines | Ligand-gesteuerte Suppression einer Anti-Tumor-Immunität in vielen malignen Erkrankungen | Eine hohe Anzahl an CCR8 ⁺ -Zellen in verschiedenen soliden Tumoren als auch in hämatologischen Malignitäten sind mit einer |

| | | | |
|--|----------------------|--|--------------------------------------|
| | gesunden Hautgewebes | | schlechten Prognose assoziiert |
|--|----------------------|--|--------------------------------------|

Hämatologische Erkrankungen betreffend konnte nachgewiesen werden, dass vor allem Non-Hodgkin-Lymphome der T-Linie eine hohe Expressionsrate von CCR8 aufweisen. Das Anaplastische großzellige Lymphom (ALCL) lässt sich in zwei Gruppen teilen, das Anaplastische Lymphomkinase- (ALK) positive ALCL und das ALK-negative ALCL (119,120). Es zeigte sich, dass der ALK-negative Subtyp, welcher mit einer deutlich schlechteren Prognose verbunden ist, eine weitaus höhere Expression an CCR8 aufwies als der ALK-positive Subtyp mit einem besseren Outcome. (119,120) Auch als therapeutische Zielstruktur hinsichtlich der Adulten T-Zell-Leukämie/Lymphom (ATLL), ausgelöst durch das humane T-Zell-Leukämie-Virus Typ 1 (HTLV1), mit hochgradig schlechter Prognose, aber auch der ALL der T-Linie scheint der CCR8-Rezeptor ein vielversprechender Therapieansatzpunkt zu sein, da auch hier eine erhöhte Expression, bei der ATLL vermutlich durch die Überexpression des TAX-Onkogens stimuliert, vorliegt (121). Da sesshafte kutane T-Gedächtniszellen eine hohe Expression an CCR8 aufweisen und diese als Ursprungstumorzellen der kutanen T-Zell-Lymphome (CTCL), Mycosis Fungoides (MF) und Sézary Syndrom (SS), vermutet werden, wurde auch bei diesen malignen Erkrankungen CCR8 als Therapieansatzpunkt ausgemacht. Hier zeigte sich zum einen in der Tumorumgebung als auch in den Sézary-Zellen des peripheren Blutes eine deutliche Überexpression sowie eine mit steigender Expressionsrate der CCR8-mRNA und der CCL18-mRNA korrelierende schlechtere Prognose (122).

Abgesehen von der Detektion in NHLs der T-Linie wird über erhöhte Expressionsraten in der B-Zell-Reihe berichtet. So zeigte sich eine hohe Expression im extranodalen Diffusen Großzelligen B-Zell-Lymphom (eDLBCL) sowie im MALT (Mukosa Assoziiertes Lymphoides Gewebe)-Lymphom des Magens (123).

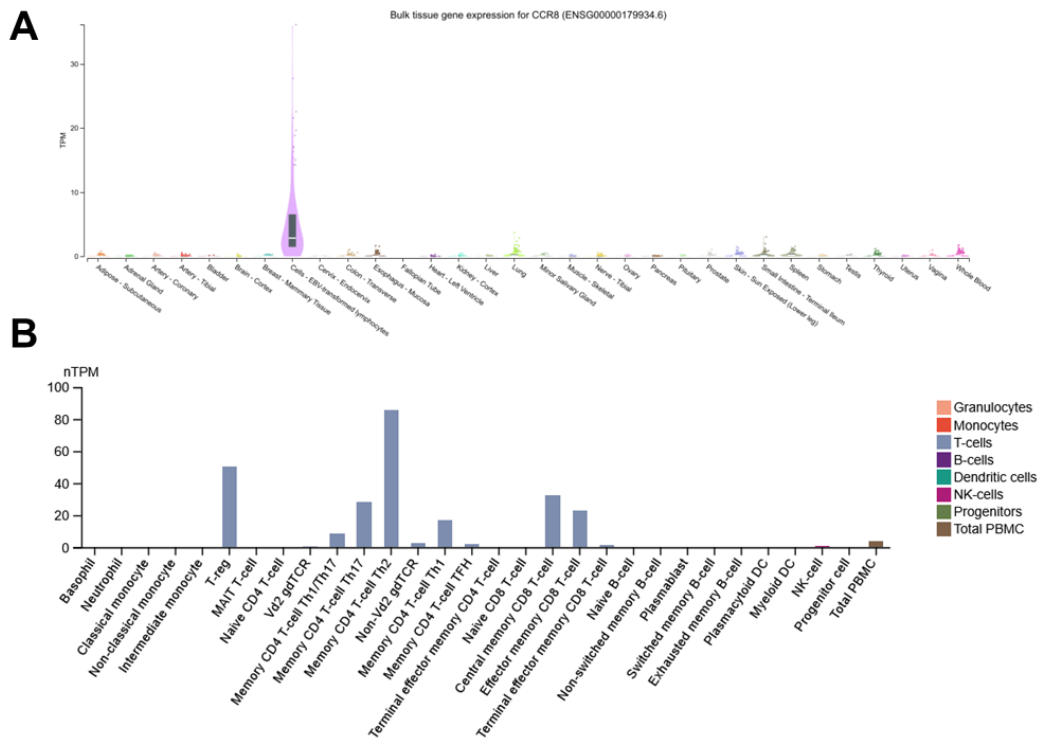


Abbildung 23: Expressionsprofil des CCR8-Gens.

(A) Violin-Plot mit dem Expressionsprofil des CCR8-Gens in 32 unterschiedlichen physiologischen Gewebetypen. Der Graph wurde von gtexportal.org zur Verfügung gestellt (73).

(B) Bar-Chart-Plot mit dem Expressionsprofil des CCR8-Gens in unterschiedlichen hämatopoetischen Zellen (74).

Die Gewebsspezifische Expression wurde auf der Y-Achse als TPMs (Transcripts Per Kilobase Million) dargestellt, der Zelltypus an der X-Achse.

Sogar in vielen soliden Tumorgeweben konnte vermehrt CCR8-exprimierende, tumorinfiltrierende T_{reg}S (FOXP3⁺CD4⁺) nachgewiesen werden, mit hoher Anzahl im Nierenzell- und Blasenkarzinom, aber auch im Magenkarzinom, Ovarialkarzinom, Melanom und Colorektalkarzinom sowie bei Mundhöhlenkarzinomen. In FOXP3-CD4⁺ und CD8⁺-Zellen war CCR8 nur sehr gering exprimiert, außer im kolorektalen Karzinom zeigten auch CD8⁺-Zellen verhältnismäßig hohe Expressionswerte (116,124). Des Weiteren hat sich die erhöhte Expression von CCR8 in mehreren Tumoren, wie z.B. im Lungenkarzinom, mit einer schlechten Prognose vergesellschaftet gezeigt (111).

7.1.7 CCR3

Das CCR3-Gen (Chemokine-Rezeptor-3-Gen) auf Chromosom 3 codiert wie CCR8 für einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor, welcher auf Eosinophilen, Basophilen,

IL-9-sezernierenden CD4⁺-T-Zellen, Mastzellen und Zellen des respiratorischen Epithels sowie des Gefäßendothels exprimiert wird (125–127). CCR3 interagiert mit verschiedenen Liganden, unter anderem mit CCL5 (RANTES – regulated on activation, normal T-cell expressed and secreted), CCL7 (MCP – Monocyte chemotactic protein – 3) und CCL11 (Eotaxin) (125).

Der CCR3-Rezeptor ist ein entscheidender Faktor, welcher an der Steuerung der Eosinophilen-Wanderung aus dem Knochenmark (KM) in die Peripherie (128) und zusammen mit CCR4 an der TH2- und TH9-Immunantwort beteiligt ist. Daher ist CCR3 mit seinen Liganden auch in Erkrankungen, wie allergisches Asthma und Tumore, involviert (125,126).

Tabelle 10: Überblick – CCR3

| Gen | Physiologie | Pathologie | Survival |
|------|---|--|---|
| CCR3 | Rezeptor-vermittelte Steuerung der Eosinophilen-Migration aus dem KM in die Peripherie, mediiert zusammen mit CCR4 die Th2- u. Th9-Immunantwort | CCL11-CCR3-Signalweg bei malignen Tumoren: Erleichterung der Proliferation, Migration u. Invasion, Apoptose-Resistenz, Förderung der Angiogenese | Eine hohe Expression ist in einigen soliden Tumoren mit schlechter Prognose assoziiert, bei Prostata- u. Ovarialkarzinom hingegen mit besserer Prognose |

Über den CCL11-CCR3-Signalweg kann das Wachstum von Tumoren durch die Erleichterung von Proliferation, Migration und Invasion und durch die Verstärkung der Resistenz gegenüber fremdinduzierter Apoptose (ERK (extracellular signal-regulated kinase) -MAPK (mitogen-activated protein kinase) -Aktivierung) sowie durch eine Förderung der Angiogenese, unterstützt werden (127,129). Erhöhte CCR3-Expressionen konnten mittlerweile in vielen Tumoren, wie zum Beispiel dem Nierenzellkarzinom, dem Glioblastom und dem Malignen Melanom

nachgewiesen werden (127,129,130). Darüber hinaus wurde in Zusammenhang mit hohen Expressionen in Tumorzellen von Lunge, Brust, Endometrium, Niere, Hoden, Pankreas und anderen eine schlechte Prognose nachgewiesen, wohingegen bei Prostata- und Ovarialkarzinom eine erhöhte Expression auf eine verbesserte Prognose hinwies (127).

Auch im hämatologischen Bereich wurde im Myelodysplastischem Syndrom eine Zunahme der zirkulierenden CD3⁺CCR3⁺-Zellen, bei Formen mit hohem Risiko eine vor allem erhöhte CD3⁺CD4⁺CCR3⁺-Zellanzahl (131), festgestellt. Eine vermehrte CCR3-Expression in Verbindung mit einer TH2-Zytokin-Produktion fand sich im großzelligen kutanen, CD30-positiven T-Zell-Lymphom (132). Bei NHLs der B-Zell-Reihe auf den entarteten Zellen im B-CLL und der Haarzelleukämie (HCL) wurde CCR3 exprimiert, während dieser Rezeptor auf gesunden B-Lymphozyten jedoch nicht vorkommt. Alle anderen B-Zell-Lymphome wiesen keine Expression auf (133). Unter anderem konnte im Lymphknoten-Infiltrat von HL-Erkrankten eine hohe CCR3- und CCR5-Expression in den T-Zellen, sowohl CD4⁺ als auch CD8⁺, und in B-Lymphozyten detektiert werden (134).

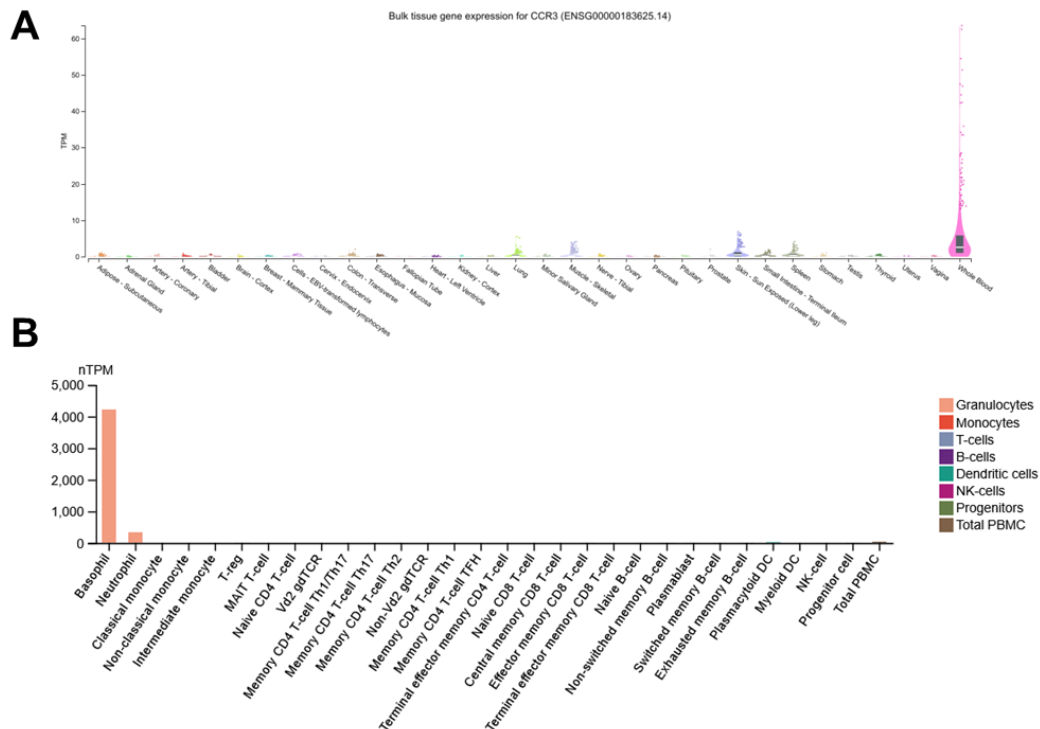


Abbildung 24: Expressionsprofil des CCR3-Gens.

(A) Violin-Plot mit dem Expressionsprofil des CCR3-Gens in 32 unterschiedlichen physiologischen Gewebetypen. Der Graph wurde von gtexportal.org zur Verfügung gestellt (73).

(B) Bar-Chart-Plot mit dem Expressionsprofil des CCR3-Gens in unterschiedlichen hämatopoetischen Zellen (74).

Die Gewebsspezifische Expression wurde auf der Y-Achse als TPMs (Transcripts Per Kilobase Million) dargestellt, der Zelltypus an der X-Achse.

7.1.8 C17orf99

Das C17orf99- (Chromosom 17 open reading frame 99-) Gen ist auf Chromosom 17 (17q25.3) lokalisiert und codiert für IL-40, einem von aktivierten B-Zellen sezerniertes Zytokin, welches eine wichtige Rolle in der Regulation des humoralen Immunsystems spielt, aber vermutlich auch einen Einfluss auf die Homöostase, Proliferation und Differenzierung der B-Zellen hat. Die Expression von C17orf99 wird stark in CD40L-aktivierten B-Lymphozyten unter dem Einfluss von IL-4 und TGF- β 1 angeregt. Hauptexpressionsgewebe von IL-40 sind das Knochenmark, die fetale Leber, die periphere B-Zellen und die laktierenden Brustdrüsen (135).

Interessanterweise konnte bei Mäusen festgestellt werden, dass Immunglobulin A (IgA) in der Muttermilch unter Abwesenheit von IL-40 deutlich abnimmt, aber auch auf die Peyer-Plaques in der Dünndarmschleimhaut schien sich das Fehlen von C17orf99, reduzierend auf ihre Größe und Anzahl auszuwirken (135).

Tabelle 11: Überblick – C17orf99

| Gen | Physiologie | Pathologie | Survival |
|----------|---|---|--|
| C17orf99 | IL-40-Zytokin – beeinflusst die humorale Immunantwort, ist vermutlich verantwortlich für die Homöostase der IgA-produzierenden B-Zellen | Wirkt vermutlich proinflammatorisch und ist evtl. beteiligt an der Entwicklung von Erkrankungen mit entzündlicher Pathogenese | Nur bei SLE als eventueller Prognosefaktor beschrieben |

Zurzeit gibt es noch wenige Pathologien, die in Zusammenhang mit einer veränderten IL-40-Konzentration in der Literatur beschrieben sind. IL-40 scheint ein proinflammatorisches Zytokin zu sein und ist im Serum/Plasma von pathologisch entzündlichen Prozessen wie Rheumatoider Arthritis, Spondylitis ankylosans, Systemischem Lupus Erythematoses (SLE) und Diabetes Mellitus Typ2 signifikant erhöht (136–138). Ebenso wird von einer zusätzlichen Erhöhung von IL-40 in den Glandulae salivariae im Rahmen des Sjögren-Syndroms berichtet (139).

Zur C17orf99-Expression in malignen Zellen ist die Datenlage noch sehr beschränkt. Es wird erwähnt, dass einige B-Zell-Lymphome eine wesentliche Produktion von IL-40 aufweisen und dass bei AML, beeinflussbar durch Geschlecht und Albumin-Konzentration, die Expression von C17orf99 deutlich vermindert war (135,136). In einer Studie von Said et al. wird von einer erhöhten IL-40-Expression im Blut im Rahmen des HCCs berichtet (140).

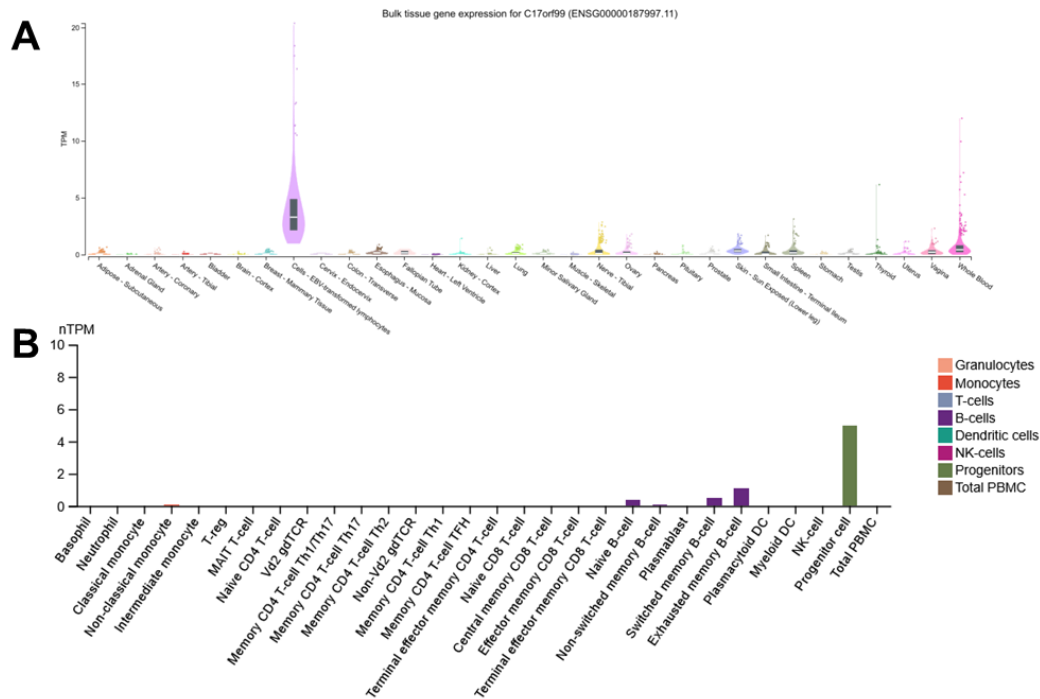


Abbildung 25: Expressionsprofil des C17orf99-Gens.

(A) Violin-Plot mit dem Expressionsprofil des C17orf99-Gens in 32 unterschiedlichen physiologischen Gewebetypen. Der Graph wurde von *gtexportal.org* zur Verfügung gestellt (73).

(B) Bar-Chart-Plot mit dem Expressionsprofil des C17orf99-Gens in unterschiedlichen hämatopoetischen Zellen (74).

Die Gewebsspezifische Expression wurde auf der Y-Achse als TPMs (Transcripts Per Kilobase Million) dargestellt, der Zelltypus an der X-Achse.

7.1.9 TREML4

Das TREML4-Gen (auch TREM-like-4) gehört zu der TREM- (Trigger-Rezeptor exprimiert auf myeloischen Zellen) Familie, welche auf Chromosom 6 (6q21.1) codiert liegt (141). TREML4 wird in der roten Pulpa der Milz von Monozyten und Makrophagen, den sogenannten Marginal Metallophilic Macrophages (MMM) exprimiert (142), welche besonders wichtig für die Antigen-Kreuzpräsentation sind, da sie den CD8⁺-DCs Antigene zuspiesen und gleichzeitig eine Aktivierung der zytotoxischen T-Zellen hervorrufen (143). Außerdem wurde eine Expression auf einer Untergruppe von DCs (CD8 α ⁺) und auf Neutrophilen nachgewiesen und eine Bindung an spät-apoptotische und nekrotische Zellen durch lösliche Rezeptoren gezeigt (142,144).

TREML4 ist assoziiert mit verschiedenen inflammatorischen und infektiösen Erkrankungen. Es spielt unter anderem eine Rolle bei der Entwicklung einer Sepsis, die meist mit einer neutrophilen Dysregulation einhergeht. TREML4 kann

an seinem zytoplasmatischen Teil über DAP-12, einem ITAM-tragenden (Immunoreceptor tyrosine-based activation motif) Molekül, den Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K)/Akt-Signalweg aktivieren und dadurch einen Calciumstrom auslösen. Dieser Ionenfluss wirkt als Stressfaktor auf das ER und führt zur Apoptose des Neutrophilen Granulozyten, aber auch zu einer Aktivierung von NF- κ B (nuclear factor, kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells) mit konsekutiver Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen (144). Auch im Verlauf von Autoimmunerkrankungen, wie SLE, scheint es einen Einfluss auf die Menge der gebildeten Autoantikörper und inflammatorischen Zytokine und damit auf die Progredienz von Gewebe- und Organentzündungen, zu haben (145). Des Weiteren steht eine erhöhte Expression von TREML4, sowohl als Transkript als auch als Protein, in Zusammenhang mit einer stärkeren Koronararterienverkalkung und der Alzheimer-Erkrankung (145).

Tabelle 12: Überblick – TREML4

| Gen | Physiologie | Pathologie | Survival |
|--------|--|--|--|
| TREML4 | Spezifische myeloische Rezeptor-vermittelte Steuerung von inflammatorischen Prozessen. | Mögliche Dysregulationen stehen im Zusammenhang mit Sepsis, Arterienverkalkungen und Autoimmunerkrankungen | Evtl. prognostischer Marker für den Grad der Koronararterienverkalkung als auch für die Progredienz von SLE. |

In Bezug auf maligne hämatologische Erkrankungen oder solide Tumore konnten keine Publikationen mit möglichen Zusammenhängen gefunden werden.

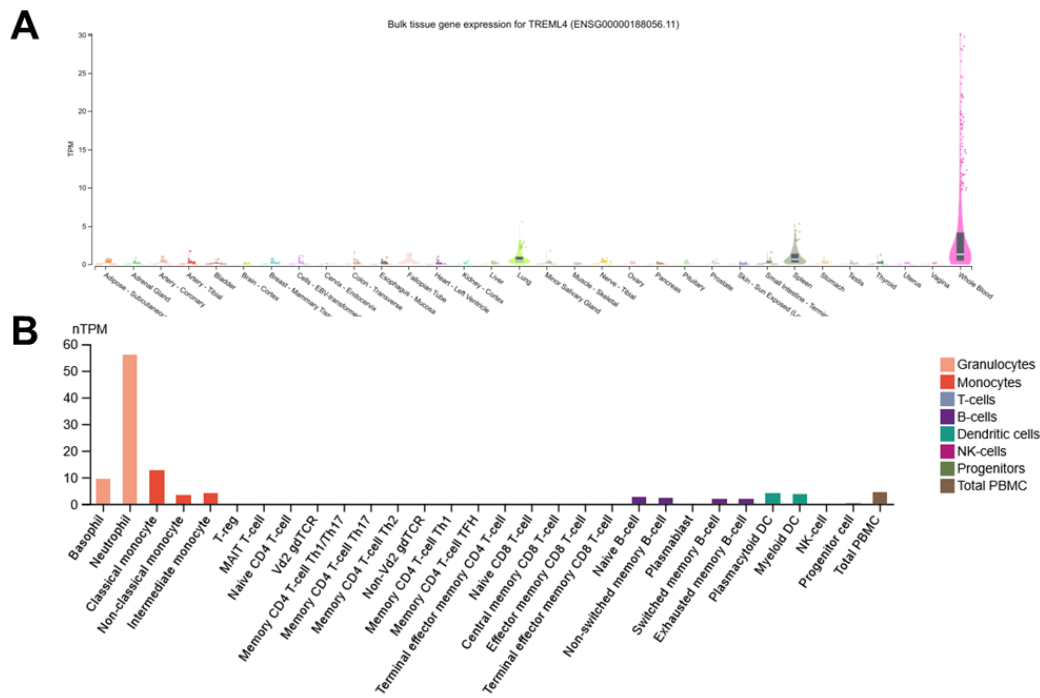


Abbildung 26: Expressionsprofil des TREML4-Gens.

(A) Violin-Plot mit dem Expressionsprofil des TREML4-Gens in 32 unterschiedlichen physiologischen Gewebetypen. Der Graph wurde von gtexportal.org zur Verfügung gestellt (73).

(B) Bar-Chart-Plot mit dem Expressionsprofil des TREML4-Gens in unterschiedlichen hämatopoetischen Zellen (74).

Die Gewebsspezifische Expression wurde auf der Y-Achse als TPMs (Transcripts Per Kilobase Million) dargestellt, der Zelltypus an der X-Achse.

7.1.10 CD300LD

CD300LD (CD300ld, CD300d) ist ein Mitglied der CD300-Immunglobulingenrezeptore-Familie auf Chromosom 17 (17q25.1), welche sich, mit Ausnahme von CD300a, ausschließlich auf myeloischen Zellen befinden (146). Bisher ist noch wenig über die Expression, Regulation und Funktion von CD300ld in Mastzellen, Eosinophilen und Basophilen bekannt. Allerdings konnte nachgewiesen werden, dass er seine höchste Expression auf neutrophilen Granulozyten erreicht und auf Makrophagen und Monozyten wiederum deutlich geringer vertreten ist. Im Knochenmark sind vor allem die reifen Neutrophilen gekennzeichnet durch eine hohe Expression, während im peripheren Blut und in der Milz sowohl naive als auch reife Neutrophile diesen Rezeptor tragen (147). CD300ld interagiert mit bestimmten Adapterproteinen – ITAMs, wie DAP12, Fc-Rezeptor (FcR) γ oder PI3K und kann dadurch verschiedene Prozesse, u.a.

Zellproliferation und -wachstum oder Zytokinproduktion und Zytotoxizität, beeinflussen (148).

Table 13: Überblick – CD300LD

| Gen | Physiologie | Pathologie | Survival |
|---------|--|---|--|
| CD300LD | Immunglobulin-Rezeptor - vermutlich mit Einfluss auf Zytotoxizität und Zytokinproduktion | Assoziiert mit der Infiltration von MDSCs ins Tumorgewebe und mit einer suppressiven Wirkung der T-Zell-Zytotoxizität | Korrelation zwischen einer vermehrten Expression und einer schlechten Prognose beim Malignen Melanom |

Unter dem Einfluss von Tumorzell-sezernierten Wachstumsfaktoren oder inflammatorischen Mediatoren kommt es zu einer reaktiven Granulopoese mit einer vermehrten Bildung und Ausschwemmung von pathologisch aktivierten Neutrophilen ins Blut, die einen Teil der Myeloiden Suppressorzellen (MDSCs – myeloid-derived suppressor cells) ausmachen, welche eine vermehrte Expression von CD300ld und eine hohe immunsuppressive Aktivität aufweisen (149). CD300ld ist beteiligt an der Einwanderung von MDSCs in das Tumorgebiet sowie an der über die STAT3-S100A8/A9-Achse unterstützten T-Zell-Suppression.

Grundsätzlich konnte eine vermehrte CD300ld-Expression in vielen verschiedenen Tumoren festgestellt und eine auffallende Korrelation zwischen Expressionsrate und schlechtem Outcome beim Malignen Melanom beobachtet werden (149). Hinsichtlich einer Expression in hämatologischen Neoplasien konnten jedoch derzeit keine Publikationen gefunden werden. Trotzdem bietet sich CD300ld als ein attraktives Zielgen in der Krebstherapie an, da durch den Einsatz von Antikörpern in Mäusen gezeigt werden konnte, dass durch seine Blockade eine Tumorregression ohne gravierende Nebeneffekte bewirkt werden konnte, u.a. auch bei Lymphomen (147). Die CD300ld-KO-Mäuse wiesen keinerlei signifikante Unterschiede hinsichtlich des Phänotyps, des Gewichts und der Organgröße auf und auch der prozentuelle Anteil der hämatopoetischen Stammzellen und der

Vorläuferzellen zeigten keine Veränderungen. Der Zustand der Neutrophilen präsentierte sich ebenso unauffällig (147).

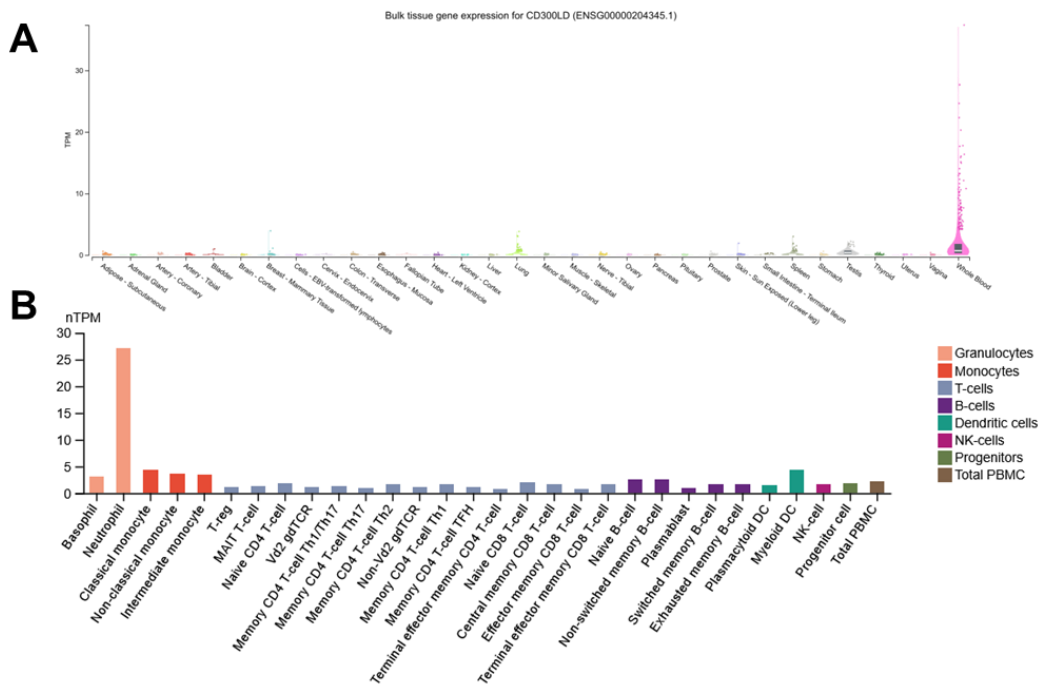


Abbildung 27: Expressionsprofil des CD300LD-Gens.

(A) Violin-Plot mit dem Expressionsprofil des CD300LD-Gens in 32 unterschiedlichen physiologischen Gewebetypen. Der Graph wurde von gtexportal.org zur Verfügung gestellt (73).

(B) Bar-Chart-Plot mit dem Expressionsprofil des CD300LD-Gens in unterschiedlichen hämatopoetischen Zellen (74).

Die Gewebsspezifische Expression wurde auf der Y-Achse als TPMs (Transcripts Per Kilobase Million) dargestellt, der Zelltypus an der X-Achse.

7.1.11 TARM1

Das TARM1-Gen codiert für den T-Zell-interagierenden, aktivierenden Rezeptor auf myeloischen Zellen (T-cell interacting, activating receptor on myeloid cells 1) und ist auf Chromosom 19 (19q13.4) im Leukozyten-Rezeptor-Komplex lokalisiert (150). TARM1 wird in erster Linie in Neutrophilen und Monozyten exprimiert und kann über Bindung an den ITAM-tragenden FcR γ in Zusammenhang mit einer Makrophagen-Aktivierung eine vermutlich positive Regulation der bakteriellen Immunabwehr bewirken (150–152). Die Expression der mRNA des TARM1-Gens konnte in lymphatischen Organen, wie Thymus, Milz, Mesenteriallymphknoten und im Knochenmark, aber auch in Lunge und Uterus nachgewiesen werden (150).

Tabelle 14: Überblick – TARM1

| Gen | Physiologie | Pathologie | Survival |
|-------|---|---|----------|
| TARM1 | vermutlich eine Rezeptor-vermittelte Regulation von proinflammatorischen Prozessen und bakteriellen Infektionen | Durch Unterstützung der DCs-Reifung und Zytokinproduktion evtl. ein Faktor bei der Entstehung von Autoimmunerkrankungen (Arthritis) | - |

Im Zuge einer Tuberkuloseinfektion hat sich gezeigt, dass TARM1 über eine Anhebung der Reaktiven Sauerstoffspezies-Konzentration (ROS – reactive oxygen species) in den Makrophagen die intrazelluläre Abtötung und Phagozytose der Mykobakterien unterstützt. Außerdem weist TARM1 eine konträre Wirkung auf, bei der zum einen eine Hemmung der T-Zell-Aktivität durch Makrophagen und Neutrophile, aber wiederum über ein Signal des Osteoklast-assoziierten Rezeptors (OSCAR) auf DCs eine Verstärkung der T-Zell-Antwort erreicht werden kann (152).

Kollagen II scheint als Ligand am TARM1-Rezeptor auf DCs zu agieren und damit die DCs-Reifung zu unterstützen, was wiederum eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung einer Arthritis spielt, da DCs eine Immunantwort auslösen können, indem sie den T-Zellen die eigenen Antigene präsentieren und eigenständig Zytokine produzieren (151).

Hinsichtlich hämatologischer Malignitäten und Tumore wurden keine Publikationen gefunden.

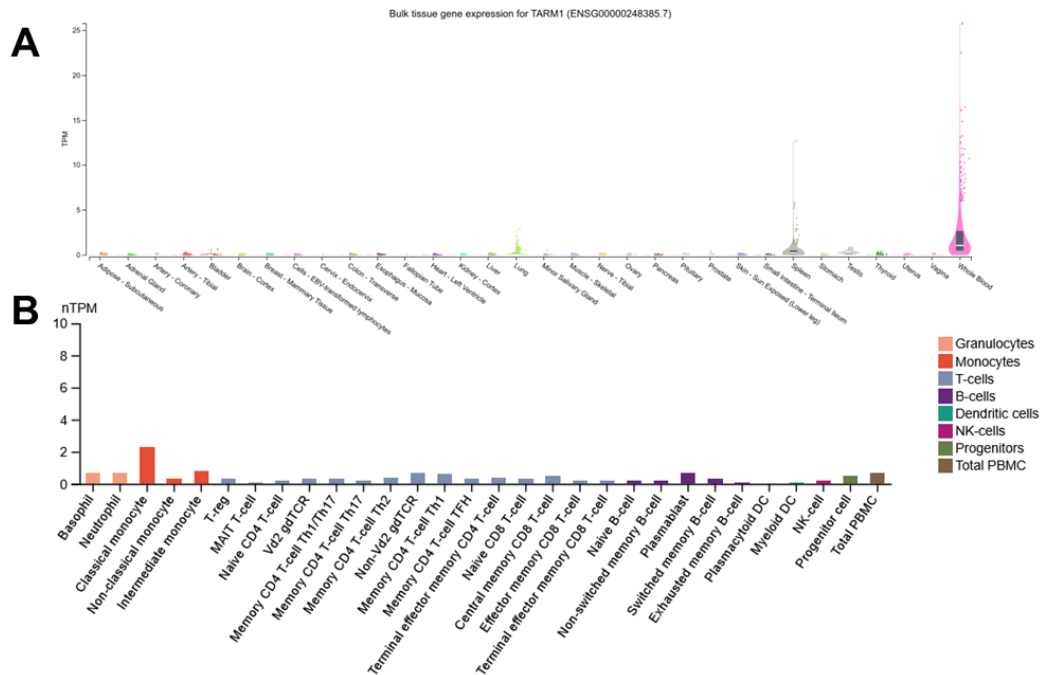


Abbildung 28: Expressionsprofil des TARM1-Gens.

(A) Violin-Plot mit dem Expressionsprofil des TARM1-Gens in 32 unterschiedlichen physiologischen Gewebetypen. Der Graph wurde von *gtexportal.org* zur Verfügung gestellt (73).

(B) Bar-Chart-Plot mit dem Expressionsprofil des TARM1-Gens in unterschiedlichen hämatopoetischen Zellen (74).

Die Gewebsspezifische Expression wurde auf der Y-Achse als TPMs (Transcripts Per Kilobase Million) dargestellt, der Zelltypus an der X-Achse.

7.1.12 OR51B2

Das OR51B2-Gen (olfactory receptor family 51 subfamily B member 2) codiert für einen G-Protein-gekoppelten, olfaktorischen Rezeptor (OR) und ist gespeichert im OR-Lokus auf Chromosom 11 (11q15.4). Die OR-Gen-Rezeptor Familie wird in der Schleimhaut der Regio olfactoria exprimiert und kann durch Geruchsmoleküle aktiviert werden, wodurch eine neuronale Antwort die Wahrnehmung eines Duftes bewirkt (153–155). Es wurde gezeigt, dass sich OR51B2 mit trans-3-Methyl-2-hexensäure, einem Bestandteil des axillären Schweißgeruches, verbindet (153).

Table 15: Überblick – OR51B2

| Gen | Physiologie | Pathologie | Survival |
|--------|-----------------------|---------------------------|----------|
| OR51B2 | G-Protein-gekoppelter | eventuelle Beteiligung am | - |

| | | | |
|--|--|---|--|
| | Rezeptor im Riechepithel für die Aufnahme olfaktorischer Reize, u.a. Axillarschweiß, evtl. involviert bei Partnerwahl | Fortschreiten der AML/CML, evtl. Einfluss auf Wachstum und Proliferation von Tumoren | |
|--|--|---|--|

Jedoch wurde in den letzten Jahren dieser Rezeptorfamilie bezüglich vermehrt Forschungen durchgeführt, welche Hinweise darauf geben, dass diese nicht beschränkt auf das Riechepithel exprimiert werden und daher eventuell extranasale Funktionen besitzen. Eine ORs-Expression, jedoch wird OR51B2 nicht explizit erwähnt, konnte in verschiedenen Geweben, wie Testikel, Muskel, Leber, Darm, Lunge, Herz und anderen festgestellt werden (156). Auch auf Makrophagen und Monozyten konnte eine OR-Expression, jedoch ohne genaue Charakterisierung, nachgewiesen werden (157).

Es gibt Hinweise, dass die ORs verschiedene Vorgänge, wie Spermienmotilität, Blutdruck, Atherosklerose und Entzündungen, beeinflussen können. Ebenso wird eine Bedeutung beim Fortschreiten der AML und CML vermutet (156,157). In einigen Tumorgeweben konnten ORs-Expressionen detektiert werden, wobei OR51B2 explizit als einer der drei hoch-exprimierten olfaktorischen Rezeptoren der Kolonkarzinom-Zelllinie HCT116 erwähnt wird (158). Genaue Funktionen oder Mechanismen sind jedoch keine bekannt.

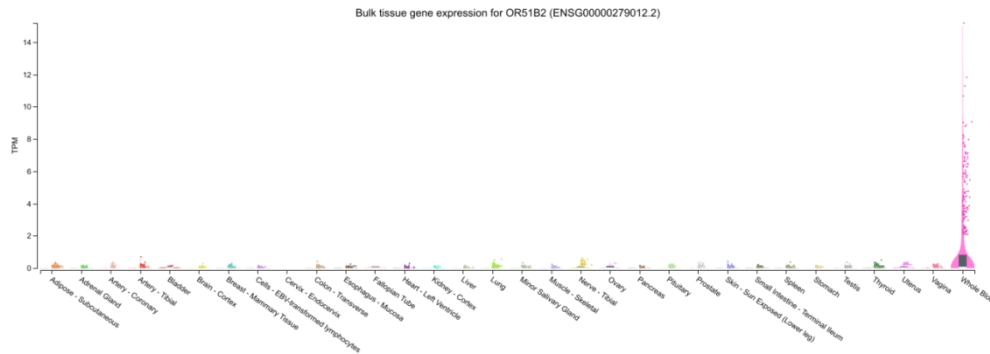


Abbildung 29: Expressionsprofil des OR51B2-Gens.

Violin-Plot mit dem Expressionsprofil des OR51B2-Gens in 32 unterschiedlichen physiologischen Gewebetypen. Der Graph wurde von gtxportal.org zur Verfügung gestellt (73).

Die Gewebsspezifische Expression wurde auf der Y-Achse als TPMs (Transcripts Per Kilobase Million) dargestellt, der Zelltypus an der X-Achse.

7.1.13 Gene ohne Expressionsdaten – GLYATL1B, H3C7, H3C8, H2AC14

Die Gene GLYATL1B, H3C7 und -C8 und H2AC14 weisen keine Expressionsdaten im gtxportal.org auf, weshalb sie hier nur kurz beschrieben werden.

Das **GLYATL1B-Gen** (Glycin-N-Acyltransferase Like 1B) liegt auf Chromosom 11 (11q12.1) und codiert für ein Enzym im Golgi-Apparat, welches vermutlich die Glutamin-N-Acyltransferase-Aktivität ermöglicht und somit in Glutamin-abhängige Stoffwechselprozesse involviert ist. Eine mRNA-Expression, jedoch keine Protein-Expression, ist dokumentiert in der weiblichen Brust und in lymphatischen Geweben, sowie in Prostatakrebs, im Lymphom und im Malignen Myelom (159,160). Publikationen zu diesem Gen konnten keine gefunden werden.

Das **H3C7-Gen** (H3 Clustered Histone 7 – auch HIST1H3F) wird im großen Cluster der Histon-Gene auf Chromosom 6 (6p22-21.3) gespeichert und codiert für ein Replikations-abhängiges Histon der Histon-H3-Familie (161,162). In malignen Erkrankungen ist H3C7 bereits in den Fokus der Forschung gelangt, da im Mammakarzinom (163) eine signifikant höhere, aber auch im Plattenepithelkarzinom (164) eine höhere Expression beobachtet werden konnte. Zusätzliche Forschungen geben Hinweise, dass eine H3C7-Überexpression im Plattenepithelkarzinom des Larynx mit einer schlechten Prognose (165), im Urothelkarzinom (166) hingegen mit einem längeren Überleben einhergeht.

Das **H3C8-Gen** (H3 Clustered Histone 8 – auch HIST1H3G) wird wie H3C7 im großen Cluster der Histon-Gene auf Chromosom 6 (6p22-21.3) gespeichert und codiert auch für ein Histon der Histon-H3-Familie (167,168). Dieses Gen wird in Zusammenhang mit der akuten B-Zell-Leukämie (169) erwähnt und als eines der drei am höchsten exprimierten Gene im epitheliale Ovarialkarzinom hervorgehoben (170).

Das **H2AC14-Gen** (H2A Clustered Histone 14 – auch HIST1H2AJ) wird wie die anderen beiden Histon-Gene im großen Cluster auf Chromosom 6 (6p22-21.3) gespeichert und codiert für ein Histon der Histon-H2A-Familie (171,172). H2AC14 könnte als Zielgen auf epigenetischer Ebene interessant werden, da sich im HCC, im Adenokarzinom der Lunge und im Plattenepithelkarzinom des Kopfes und des Nackens eine Hypermethylierung des H2AC14-Gens gezeigt hat (173).

8 Diskussion

In der onkologischen Therapie wird sich auf die Neoantigene, welche als HLA auf der Oberfläche der Tumorzellen exprimiert sind und im Rahmen von tumorspezifischen Mutationen neu entstehen können, konzentriert, die mittels codierender mRNA den Zielzellen vermittelt werden soll. Eine Interaktion auf dieser Ebene ermöglicht eine effiziente Tumorkontrolle im Rahmen einer hohen zentralen und peripheren Toleranz, was wiederum das Risiko einer potenziellen autoaggressiven Immunreaktion senkt (16). Aufgrund dieser vielversprechender Therapieoption haben wir im Rahmen dieser Arbeit nach möglichen Zielgenen für einen Impfstoff im hämatonkologischen Bereich anhand einer öffentlich zugänglichen Datenbank gesucht und Informationen zu den jeweiligen Zielen in PubMed gesammelt. Insgesamt konnten so 16 Gene ausfindig gemacht werden. Beim CCR8-Gen handelt es sich um ein Gen, das jetzt schon eine bedeutende Rolle in hämatonkologischen Erkrankungen spielt.

Eine wesentliche Limitation der Forschungsgemeinschaft ist die Tatsache, dass es zwar Expressionsdaten gibt, jedoch die Exploration der physiologischen, sowie pathologischen Funktion viel Geld und Zeit bedarf und der Entdeckung der Expressionsdaten immer hinterher hinkt. Daher gibt es hinsichtlich LIM2, CABP5, TARM1 und TREML4 zwar Daten im gtexportal.org, jedoch ist eine Einschätzung der Relevanz in Neoplasien aufgrund fehlender Forschungsarbeiten leider derzeit nicht möglich und bietet hierbei noch sehr viele Möglichkeiten weiterer Forschungsprojekte.

Ein wesentliches Beispiel ist IL-40, das durch C17orf99 codiert wird. Es wirkt vermutlich proinflammatorisch und daher wäre eine Involvierung in der Krebsentstehung denkbar (174). Allerdings wird davon ausgegangen, dass es an der Regulierung von Proliferation und Differenzierung der B-Zellen beteiligt ist, stark im Knochenmark exprimiert wird und in IL-40-Knockout-Mäusen hat sich eine verringerte Größe der Payer-Plaques gezeigt, was darauf hindeuten könnte, dass es in Folge einer C17orf99-Abzielung zu Blutbildungsstörungen mit beeinträchtigter Immunfunktion kommen könnte. Da jedoch für diese Art der Therapie ein funktionierendes Immunsystem wichtig ist, damit sie zum Erfolg führen kann, ist dieses Gen als Target unvorteilhaft.

Im Vergleich hierzu sind auch die OR-Gene, OR51B2 und OR51G2, welche zu der OR-Gen-Familie gehören, noch relativ unbekannt. Nur OR51B2 wird als einer der drei hoch exprimierten olfaktorischen Rezeptoren in der Kolonkarzinom-Zelllinie HCT116 explizit erwähnt, jedoch mit keinerlei Information über dessen mögliche Rolle oder dessen Prognoseassoziation (158). Über die Expressionen in hämatoonkologischen Neoplasien gibt es jedoch derzeit noch keine Publikationen. Allerdings werden physiologische Expressionen von OR-Genen unter anderem in Herz, Lunge, Muskel und Darm erwähnt. Sollten OR51B2 und OR51G2 in Zukunft als potenzielle Targets in Betracht gezogen werden, bedarf es unbedingt einer weiteren Abklärung, ob und wenn ja, in welchem Ausmaß die beiden Gene in diesen Geweben exprimiert werden und welche Funktion sie dort erfüllen, da es hier natürlich zu erhöhten Nebenwirkungsraten mit organspezifischen Problemen kommen kann.

Das NCR2-Gen als Target könnte bedeuten, dass Zellbereiche attackiert werden, deren genaue Funktionen teilweise noch recht unbekannt, andere wiederum sehr wichtig bei der Tumorüberwachung und Bekämpfung von Infektionen sind, wie beispielsweise ILCs (175). Vernachlässigbar wäre die Expression in den Dezidualzellen in diesem Fall, da sowohl bei Männern als auch bei Frauen ohne bestehende Gravidität eventuell ein zu großes Risiko für eine impfinduzierte Immunschwäche mit momentan noch unabsehbaren Folgen bestehen würde. Dieses Beispiel zeigt auch, dass hohe Expressionsdaten nur dann von biologischer Bedeutung sind, wenn sie funktionell genutzt werden und dass es durchaus Gene gibt, die geschlechtsspezifisch exprimiert werden und somit im Sinne der Genderforschung von entscheidender Bedeutung sind. Allein der Angriff auf IELs, könnte sich signifikant auf das Zusammenspiel von Darm, Immunsystem und Hirn auswirken (176). Da das weibliche Geschlecht im Allgemeinen stärker von autoimmunologischen Erkrankungen betroffen ist und in den USA und Europa vermehrt Frauen an Morbus Crohn erkranken, könnte man vermuten, dass diese von etwaigen Nebenwirkungen stärker betroffen sein könnten. Allerdings ist diese Vermutung differenziert zu betrachten, da in Asien wiederum mehr Männer von Morbus Crohn betroffen sind, was ein Hinweis auf andere möglicherweise gravierendere Einflussfaktoren, wie Ernährungsgewohnheiten, Lebensstil, Nikotinabusus und Hormonkonstellationen

geben könnte (177). Im Rahmen der ALL und des DLCLs kam es in den Anfangsstadien zu einer hohen NCR2-Expression, im Verlauf mit fortschreitendem Stadium jedoch zu einem deutlichen Rückgang (77,78), was ein Indiz auf eine Involvierung des NCR2-Rezeptors in die Tumorbekämpfung sein könnte. Allerdings wäre es hier sicherlich interessant ein Augenmerk auf eventuelle NKp-44-1-hemmende Liganden, die die zytotoxische Funktion der NK-Zellen stark eindämmen können, zu legen, da man bezüglich dessen, wie etwa PCNA im Multiplen Myelom, in einigen Tumoren bereits fündig wurde (178).

Das LGALS14-Gen, ein spezifisches Plazenta-Galektin-Gen, welches vor allem von Syncytiotrophoblasten exprimiert wird, scheint ein vielversprechendes Target zu sein, obwohl jedoch zum jetzigen Forschungsstand diesbezüglich noch zu wenig bekannt ist. Es konnte ein Zusammenhang zwischen einer verminderten Expression und Schwangerschaftserkrankungen wie Präeklampsie und Intrauterine Wachstumsretardierung beobachtet werden, was wiederum vermuten lässt, dass es eine gezielte immunsupprimierende Funktion besitzt (79). Andere Galektine konnten bereits als prognostische Marker für AML, CLL, HL und NHL identifiziert werden (86), jedoch mit widersprüchlicher Prognoseeinschätzung im Ovarial- und Schilddrüsenkarzinom (88–91). Um dieses Gen als Target in Betracht ziehen zu können, gibt es hier noch sehr viel Aufklärungsbedarf und eine Schwangerschaft wäre zum Zeitpunkt der Impfung und in der Wirkdauer im Anschluss eine eindeutige Kontraindikation. Aus physiologischer Sicht ist dieses Gen allerdings außerordentlich interessant, weil es offensichtlich einen großen immunologischen Effekt hat und andererseits ein hohes Expressionspattern in einem zeitlich limitierten Organsystem sowie unisexuell exprimiert wird. Das macht dieses Gen für weitere Entwicklungen sehr attraktiv.

Die nichtvorhandene Expression in physiologischen Geweben macht das CD300ld-Gen interessant, da nur mit geringen Nebenwirkungen zu rechnen wäre. Es wird ausschließlich von myeloischen Zellen exprimiert, hauptsächlich von Neutrophilen. Da gezeigt werden konnte, dass CD300ld eine Rolle in der Rekrutierung von MDSCs in Tumorgebiete spielt, hier eine T-Zell-Suppression unterstützen kann und darüber hinaus eine Tumorregression unter CD300ld-Blockade erzielt werden konnte (147), bietet dieses Gen einen potenziellen Angriffspunkt. In CD300ld-Knockout-Mäusen gab es keine Auffälligkeiten

hinsichtlich prozentueller Anteile der hämatopoetischen Stammzellen und der Vorläuferzellen oder des Zustandes der Neutrophilen. Bisher existieren jedoch keine Forschungen bezüglich einer Expression von CD300ld in hämatologischen Malignomen.

Das CCR3-Gen ist maßgeblich für die Wanderung von Eosinophilen aus dem Knochenmark in die Peripherie verantwortlich. Über die CCL11-CCR3-Aktivierung wird die Angiogenese gesteigert und Eosinophile sowie Makrophagen können in die Tumornische gelockt werden (127). Darüber hinaus scheint es die Proliferation und eine erhöhte Apoptose-Resistenz zu fördern (127). Was jedoch abzuklären bleibt, ist inwieweit und in welcher Form Eosinophile am Tumorgeschehen beteiligt sind, da sie sowohl Tumor-fördernde als auch -hemmende Wirkungen haben können (127,179,180). Hinsichtlich der Expression auf den Immunzellen, ist denkbar, dass die Abwehrfunktion gegenüber Parasiten geschwächt werden würde, aber auch der bakterielle und virale Schutz sinken könnte, was im Falle einer aktiven Immunisierung gegen den Krebs Präventionsmaßnahmen gegen Infektionen jeglicher Art bedarf. Auch je nach Höhe der Expression im respiratorischen Epithel und Gefäßendothel könnte es hier zu Funktionseinschränkungen kommen. In allen B-CLL und in vielen Haarzelleukämien hat sich eine Expression von CCR3 auf den malignen B-Lymphozyten gezeigt, während dieser auf gesunden B-Zellen nicht vorkommt (133), weshalb diesen Gen für einen therapeutischen Ansatz in diesen beiden Entitäten sehr interessant wäre.

Das CCR8-Gen ist von all den untersuchten Genen, die wohl attraktivste Zielstruktur. Die Expression dieses Chemokinrezeptors ist sehr dominant auf der Oberfläche von tumorinfiltrierenden T_{regs} zu finden, welche zum jetzigen Forschungsstand eine wichtige Rolle in der Suppression der Antitumor-Immunaktivität spielen (174), jedoch wird dieser Rezeptor nur sehr gering auf proinflammatorischen Effektor-T-Zellen und idealerweise im gesunden Gewebe kaum bis gar nicht, mit Ausnahme der Haut, exprimiert (122), was auf ein günstiges Nebenwirkungsprofil hinweist. Unter der Verabreichung von CCR8-Antikörpern konnte bereits mehrfach in Mäusen eine erfolgreiche Tumorregression bis hin zur Eradikation gezeigt werden (124,181,182). Während in Folge einer

gesamten T_{reg}-Depletion schwere Autoimmunerkrankungen auftraten, kam es bei der gezielten Entfernung der T_{reg}s mittels CCR8-Antikörper nur zu sehr geringen Autoimmunreaktionen (124,174). Ein weiterer positiver Aspekt ist, dass eine hohe CCR8-Expression in verschiedenen NHLs, vorwiegend in der T- aber auch in der B-Linie, nachgewiesen wurde. Ferner konnte in der ALL, im kutanen T-Zell-Lymphom sowie im MALT-Lymphom (B-Linie) eine Überexpression von CCR8 gezeigt werden. Aufgrund seiner breiten Expression in unterschiedlichen hämatologischen Erkrankungen und der guten Datenlage aus den Tierversuchen könnte ein Impfstoff gegen dieses Gen in einem breiten Feld von hämatoonkologischen Erkrankungen hilfreich sein.

Ein großes Problem in der Krebstherapie sind bestehende oder erworbene Therapieresistenzen, für welche vor allem im Knochenmark lokalisierte Tumorzellen prädestiniert sind (183). Tumorzellen entwickeln eine Vielzahl an verschiedensten Mechanismen, um ihr eigenes Überleben sichern zu können, und verbreiten diese mittels Vesikelabspaltung an andere Zellen (183,184). Eine große Rolle in der Entwicklung von Therapieresistenzen spielen hinsichtlich der mRNA-Impfstoffe vor allem Punktmutationen (SNPs – Single Nucleotide Polymorphism) im Zielmolekül und veränderte Expressionsraten der Zielstruktur durch epigenetische Modifikationen. Ferner können Vernetzungen verschiedener Signaltransduktionswege und Veränderungen der Expression von DNA-Reparaturproteinen (183) ebenso zu Resistenzen führen. Eine weitere wichtige Ursache liegt in der Präsenz von unterschiedlichen Zell-Subpopulationen mit einem hohen Grad an genetischer und phänotypischer Heterogenität, was in Folge, je nach Anzahl der Subpopulationen eine Vielzahl an Unempfindlichkeiten gegenüber verschiedenen Medikamenten innerhalb eines Tumorgewebes bedeuten kann. Unter anderem existieren Populationen von Tumor-Stammzellen, die mit der Fähigkeit ausgestattet sind, nach langer Ruhezeit wieder aktiv zu werden und zu differenzieren. Im Falle einer Eradikation des Krebses, können diese Subpopulationen überleben und unter bestimmten Umständen einen neuen therapierefraktären Tumor ausbilden (185–188). Diese ausgeklügelten Systeme machen deutlich, dass die Kombination mehrerer Wirkstoffe hinsichtlich Vermeidung von Resistenzen für eine effiziente Tumorbekämpfung Vorteile bieten könnte. Durch die Verknüpfung eines CCR8-Antikörpers mit einem PD-1-Inhibitor

konnten Van Damme et al. bereits eine gesteigerte Antitumor-Effektivität im Vergleich zur Monotherapie erzielen. Darüber hinaus blieben unter der Dualtherapie Entzündungen im Darmbereich aus, obwohl sie normalerweise unter Therapien mit Checkpoint-Inhibitoren vermehrt auftreten können (182).

Jedes wirksame Medikament kann abgesehen von der erhofften Wirkung, unerwünschte Reaktionen bewirken, so auch die mRNA-Impfstoffe, welche sich jedoch in klinischen Studien bisher als gut verträglich präsentiert haben (11,16,37,189). Die Nebenwirkungen dieses Medikamentes können abgesehen von IFN-1-abhängigen Effekten, wie Grippe-ähnliche Symptome und Autoimmunreaktionen (37), aber auch allergische Reaktionen (190) stark variieren, da sie größtenteils durch die Wahl des Targets aber auch der Trägersubstanz (190,191) bestimmt werden. Unter anderem werden extrazelluläre RNAs mit Thrombosen in Verbindung gebracht (192). Wenn es um die Krebsbekämpfung geht, sind stärkere Nebenwirkungen unter Umständen tolerierbarer als beispielsweise in der präventiven Impfung gegen Infektionen, da diese einem gesunden Menschen verabreicht würden.

Trotz ihrer vielen Vorteile ist die mRNA-Impfung in ihrer Wirksamkeit von der individuellen Immunantwort stark abhängig (16), was eine Kalibrierung der optimalen Immunreaktion erschwert. Sowohl eine zu geringe als auch eine zu starke Stimulation beeinträchtigen beide die Wirksamkeit. Im Rahmen der Melanom-Impfung kam es im Falle eines Impfabbruchs innerhalb weniger Monate zu einer deutlich nachlassenden Wirkung (193), jedoch wäre eine Überprüfung weiterer Impfstoffe notwendig, um die tatsächliche Dauer einer Immunität beurteilen zu können. Grundsätzlich wäre ein langanhaltendes Immungedächtnis erstrebenswert, auf der anderen Seite könnte eine kürzere Dauer im Falle einer Eradikation aller Tumorphpopulationen eventuell Vorteile aufweisen wie zum Beispiel in Bezug auf eine Gestation bei LGALS14.

Nichtsdestotrotz bietet der mRNA-Impfstoff für eine Multiple-Target-Therapie ein ideales Tool. Es lassen sich in einem Impfstoff mehrere Targets vereinen, was infolgedessen die Herstellung und die Applikation erleichtert. Ebenso wäre ein derartiges Kombinationspräparat, je nach Auswahl der Targets in Bezug auf Reaktionsintensität und Nebenwirkungen modifizierbar. Darüber hinaus können diese Impfstoffe in kurzer Zeit produziert, aber auch beliebig modifiziert werden.

Conclusio

Die mRNA-Impfung präsentiert sich als ein hervorragendes Werkzeug für eine immunaktivierende Krebstherapie mit Aussicht auf eine nebenwirkungsärmere Kombinationsmöglichkeit multipler Therapieansatzpunkte. Da im Rahmen von neoplastischen Erkrankungen der Organismus schon in Mitleidenschaft gezogen und geschwächt wird, ist eine nebenwirkungsärmere pharmakologische Intervention, vor allem hinsichtlich des krankheitsbedingten Leidensdruck und der damit einhergehenden psychischen Belastung, wünschenswert, was sich ebenso als positive Komponente im Kampf gegen den Krebs erweisen könnte.

Diese Arbeit soll einen Beitrag zur hämatologischen Krebsforschung leisten, zumal die Gen-Forschung sehr zeitintensiv und kostenaufwendig ist und viele Erkrankungen in diesem Formenkreis nach wie vor mit einer schlechten Prognose, vor allem Lymphome der T-Zelllinie, verbunden sind. Es wird auf potenzielle Zielgene aufmerksam gemacht, denen bisher wenig Beachtung zuteil wurden, welche aber aufgrund ihrer Expressionsgebiete und ihrer Rolle in Tumorerkrankungen durchaus von Interesse sein könnten. Darüber hinaus macht die Betrachtung der einzelnen Gene deutlich, in welchen Bereichen diesbezüglich noch große Wissenslücken vorhanden sind und liefert daher einen Input für neue Forschungsbereiche.

Ein wichtiger Aspekt soll zum Schluss noch erwähnt werden. Da im Rahmen von hämatoonkologischen Erkrankungen meist ein Zelltypus klonal proliferiert, welcher jedoch funktionslos geworden ist, kommt es zu einer Verdrängung der gesunden Blutzellen und einer gestörten Hämatopoese. Infolgedessen treten Anämien, Thrombozytopenie und Granulozytopenien auf, welche unter anderem mit einer verstärkten Blutungsneigung und einer Infektanfälligkeit einhergehen. Da jedoch die mRNA-Impfung nur im Zusammenspiel mit einem funktionierenden Immunsystem ihre volle Wirksamkeit entfalten kann, bedarf es hier unbedingt weiterer Abklärungen, ob die Impfung in diesem Gebiet tatsächlich erfolgreich sein kann.

9 Literaturverzeichnis

1. Boczkowski D, Nair SK, Snyder D, Gilboa E. Dendritic cells pulsed with RNA are potent antigen-presenting cells in vitro and in vivo. *J Exp Med.* 1. August 1996;184(2):465–72.
2. Global cancer burden growing, amidst mounting need for services [Internet]. [zitiert 22. März 2024]. Verfügbar unter: <https://www.who.int/news/item/01-02-2024-global-cancer-burden-growing--amidst-mounting-need-for-services>
3. Zhao A, Zhou H, Yang J, Li M, Niu T. Epigenetic regulation in hematopoiesis and its implications in the targeted therapy of hematologic malignancies. *Sig Transduct Target Ther.* 17. Februar 2023;8(1):71.
4. Nagarsheth N, Wicha MS, Zou W. Chemokines in the cancer microenvironment and their relevance in cancer immunotherapy. *Nat Rev Immunol.* September 2017;17(9):559–72.
5. Pavlova NN, Zhu J, Thompson CB. The hallmarks of cancer metabolism: Still emerging. *Cell Metabolism.* März 2022;34(3):355–77.
6. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell.* März 2011;144(5):646–74.
7. Hanahan D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discovery.* 1. Januar 2022;12(1):31–46.
8. Herold G. Innere Medizin: eine vorlesungsorientierte Darstellung: 2019: unter Berücksichtigung des Gegenstandskataloges für die Ärztliche Prüfung: mit ICD 10-Schlüssel im Text und Stichwortverzeichnis. Köln: Gerd Herold; 2019. 1002 S.
9. Böcker W, Aguzzi A, Herausgeber. Repetitorium Pathologie: mit 184 Tabellen. 2., vollst. überarb. Aufl. München Jena: Elsevier, Urban & Fischer; 2008. 563 S.
10. Abel GA, Klepin HD. Frailty and the management of hematologic malignancies. *Blood.* 1. Februar 2018;131(5):515–24.
11. Al-mansoori L, Elsinga P, Goda SK. Bio-vehicles of cytotoxic drugs for delivery to tumor specific targets for cancer precision therapy. *Biomedicine & Pharmacotherapy.* Dezember 2021;144:112260.
12. Dobosz P, Dzieciatkowski T. The Intriguing History of Cancer Immunotherapy. *Front Immunol.* 17. Dezember 2019;10:2965.
13. Singh S, Khasbage S, Kaur RJ, Sidhu JK, Bhandari B. Chimeric antigen receptor T cell: A cancer immunotherapy. *Indian J Pharmacol.* 2022;54(3):226–33.
14. Li M, Wang Z, Xie C, Xia X. Advances in mRNA vaccines. In: *International Review of Cell and Molecular Biology* [Internet]. Elsevier; 2022 [zitiert 21. Dezember 2023]. S. 295–316. Verfügbar unter: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1937644822000569>
15. Beck JD, Reidenbach D, Salomon N, Sahin U, Türeci Ö, Vormehr M, u. a. mRNA therapeutics in cancer immunotherapy. *Mol Cancer.* Dezember 2021;20(1):69.
16. Sun X, Zeng L, Huang Y. Transcutaneous delivery of DNA/mRNA for cancer therapeutic vaccination. *The Journal of Gene Medicine.* Juli 2019;21(7):e3089.
17. Nordheim A, Knippers R, Dröge P, Meister G, Schiebel E, Vingron M, u. a., Herausgeber. *Molekulare Genetik.* 11., unveränderte Auflage. Stuttgart New York: Georg Thieme Verlag; 2018. 563 S.
18. Horn F, Blaeschke F, Trugenberger K, Gröll M, Polzer C, Lechner K, u. a. *Biochemie des Menschen: das Lehrbuch für das Medizinstudium.* 8., überarbeitete und erweiterte Auflage. Stuttgart New York: Georg Thieme Verlag; 2021. 790 S.
19. Murken J, Grimm T, Holinski-Feder E, Zerres K, Herausgeber. *Taschenlehrbuch Humangenetik.* 9., teilaktualisierte Auflage. Stuttgart: Thieme; 2017. 589 S.

20. Xu M, Gonzalez-Hurtado E, Martinez E. Core promoter-specific gene regulation: TATA box selectivity and Initiator-dependent bi-directionality of serum response factor-activated transcription. *Biochimica et biophysica acta*. April 2016;1859(4):553.
21. Merrick WC, Pavitt GD. Protein Synthesis Initiation in Eukaryotic Cells. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 12. Januar 2018;10(12):a033092.
22. Lee JM, Hammarén HM, Savitski MM, Baek SH. Control of protein stability by post-translational modifications. *Nature Communications* [Internet]. 2023 [zitiert 30. Oktober 2023];14. Verfügbar unter: <https://www-1ncbi-1nlm-1nih-1gov-10013b5ok0d37.han.medunigraz.at/pmc/articles/PMC9839724/>
23. Bahl K, Saraya A, Sharma R. Increased Levels of Circulating and Tissue mRNAs of Oct-4, Sox-2, Bmi-1 and Nanog in ESCC Patients: Potential Tool for Minimally Invasive Cancer Diagnosis. *Biomarker Insights*. 2012;7:27.
24. Wu Q, Bazzini AA. Translation and mRNA Stability Control. *Annu Rev Biochem*. 20. Juni 2023;92(1):227–45.
25. V. Jammi N. Phosphorylation of the RNA-dependent protein kinase regulates its RNA-binding activity. *Nucleic Acids Research*. 15. Juli 2001;29(14):3020–9.
26. Wang Y, Chao L, Shen Y, Lyu J, Sheng H, Paschen W, et al. PERK (Protein Kinase RNA-Like ER Kinase) Branch of the Unfolded Protein Response Confers Neuroprotection in Ischemic Stroke by Suppressing Protein Synthesis. *Stroke*. Mai 2020;51(5):1570–7.
27. Wang J, Shin BS, Alvarado C, Kim JR, Bohlen J, Dever TE, et al. Rapid 40S scanning and its regulation by mRNA structure during eukaryotic translation initiation. *Cell*. November 2022;185(24):4474–4487.e17.
28. Leppek K, Das R, Barna M. Functional 5' UTR mRNA structures in eukaryotic translation regulation and how to find them. *Nat Rev Mol Cell Biol*. März 2018;19(3):158–74.
29. Ryczek N, Łyś A, Makołowska I. The Functional Meaning of 5'UTR in Protein-Coding Genes. *IJMS*. 3. Februar 2023;24(3):2976.
30. Yi Z, Sanjeev M, Singh G. The Branched Nature of the Nonsense-Mediated mRNA Decay Pathway. *Trends in Genetics*. Februar 2021;37(2):143–59.
31. Conservation and Variability of the AUG Initiation Codon Context in Eukaryotes. *Trends in Biochemical Sciences*. 1. Dezember 2019;44(12):1009–21.
32. Navarro E, Mallén A, Hueso M. Dynamic Variations of 3'UTR Length Reprogram the mRNA Regulatory Landscape. *Biomedicines*. 28. Oktober 2021;9(11):1560.
33. Kowalski PS, Rudra A, Miao L, Anderson DG. Delivering the Messenger: Advances in Technologies for Therapeutic mRNA Delivery. *Molecular Therapy*. April 2019;27(4):710–28.
34. Guo C, Manjili MH, Subjectek JR, Sarkar D, Fisher PB, Wang XY. Therapeutic Cancer Vaccines. In: *Advances in Cancer Research* [Internet]. Elsevier; 2013 [zitiert 7. April 2024]. S. 421–75. Verfügbar unter: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780124071902000071>
35. Zhang C, Maruggi G, Shan H, Li J. Advances in mRNA Vaccines for Infectious Diseases. *Front Immunol*. 27. März 2019;10:594.
36. Miao L, Zhang Y, Huang L. mRNA vaccine for cancer immunotherapy. *Molecular Cancer*. 25. Februar 2021;20(1):41.
37. Xu S, Yang K, Li R, Zhang L. mRNA Vaccine Era—Mechanisms, Drug Platform and Clinical Prospection. *International Journal of Molecular Sciences* [Internet]. September 2020 [zitiert 11. Oktober 2023];21(18). Verfügbar unter: <https://www-1ncbi-1nlm-1nih-1gov-10013b5sx171a.han.medunigraz.at/pmc/articles/PMC7554980/>
38. Rajan TS, Gugliandolo A, Bramanti P, Mazzon E. In Vitro-Transcribed mRNA

- Chimeric Antigen Receptor T Cell (IVT mRNA CAR T) Therapy in Hematologic and Solid Tumor Management: A Preclinical Update. *International Journal of Molecular Sciences* [Internet]. September 2020 [zitiert 11. Oktober 2023];21(18). Verfügbar unter: <https://www-1ncbi-1nlm-1nih-1gov-10013b5sx171a.han.medunigraz.at/pmc/articles/PMC7556036/>
39. Kyrieleis OJP, Chang J, de la Peña M, Shuman S, Cusack S. Crystal structure of vaccinia virus mRNA capping enzyme provides insights into the mechanism and evolution of the capping apparatus. *Structure*. 4. März 2014;22(3):452–65.
 40. Karikó K, Muramatsu H, Ludwig J, Weissman D. Generating the optimal mRNA for therapy: HPLC purification eliminates immune activation and improves translation of nucleoside-modified, protein-encoding mRNA. *Nucleic Acids Research*. November 2011;39(21):e142.
 41. Zhang T, Aipire A, Li Y, Guo C, Li J. Antigen cross-presentation in dendritic cells: From bench to bedside. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. Dezember 2023;168:115758.
 42. Honey K. TLR ligands from the natural world. *Nat Rev Immunol*. April 2004;4(4):247–247.
 43. Kumar P, Sweeney TR, Skabkin MA, Skabkina OV, Hellen CUT, Pestova TV. Inhibition of translation by IFIT family members is determined by their ability to interact selectively with the 5'-terminal regions of cap0-, cap1- and 5'ppp- mRNAs. *Nucleic Acids Research*. März 2014;42(5):3228.
 44. Schlake T, Thess A, Fotin-Mleczek M, Kallen KJ. Developing mRNA-vaccine technologies. *RNA Biology*. 11. November 2012;9(11):1319.
 45. Yamamoto A, Kormann M, Rosenecker J, Rudolph C. Current prospects for mRNA gene delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. März 2009;71(3):484–9.
 46. Goubau D, Deddouche S, Reis e Sousa C. Cytosolic Sensing of Viruses. *Immunity*. 5. Mai 2013;38(5):855.
 47. Leppek K, Das R, Barna M. Functional 5' UTR mRNA structures in eukaryotic translation regulation and how to find them. *Nat Rev Mol Cell Biol*. März 2018;19(3):158–74.
 48. Mayr C. What Are 3' UTRs Doing? *Cold Spring Harb Perspect Biol*. Oktober 2019;11(10):a034728.
 49. Sahin U, Karikó K, Türeci Ö. mRNA-based therapeutics — developing a new class of drugs. *Nat Rev Drug Discov*. Oktober 2014;13(10):759–80.
 50. Grier AE, Burleigh S, Sahni J, Clough CA, Cardot V, Choe DC, u. a. pEVL: A Linear Plasmid for Generating mRNA IVT Templates With Extended Encoded Poly(A) Sequences. *Molecular Therapy - Nucleic Acids*. 2016;5:e306.
 51. Lima SA, Chipman LB, Nicholson AL, Chen YH, Yee BA, Yeo GW, u. a. Short poly(A) tails are a conserved feature of highly expressed genes. *Nat Struct Mol Biol*. Dezember 2017;24(12):1057–63.
 52. Van Lint S, Goyvaerts C, Maenhout S, Goethals L, Disy A, Benteyn D, u. a. Preclinical Evaluation of TriMix and Antigen mRNA-Based Antitumor Therapy. *Cancer Research*. 1. April 2012;72(7):1661–71.
 53. Wang Y, Zhang Z, Luo J, Han X, Wei Y, Wei X. mRNA vaccine: a potential therapeutic strategy. *Mol Cancer*. Dezember 2021;20(1):33.
 54. Silbernagl S, Lang F, Gay R, Rothenburger A. *Taschenatlas Pathophysiologie*. 4., aktualisierte und erweiterte Auflage. Stuttgart New York: Georg Thieme Verlag; 2013. 428 S.
 55. Butt AM, Abdullah N, Rani NNIM, Ahmad N, Amin MCIM. Endosomal Escape of Bioactives Deployed via Nanocarriers: Insights Into the Design of Polymeric Micelles.

Pharm Res. 1. Juni 2022;39(6):1047–64.

56. Pardi N, Hogan MJ, Porter FW, Weissman D. mRNA vaccines — a new era in vaccinology. *Nat Rev Drug Discov.* April 2018;17(4):261–79.
57. T H, L P, Y H, D W, X H, J W, u. a. Lipid nanoparticle-based mRNA vaccines in cancers: Current advances and future prospects. *Frontiers in immunology* [Internet]. 26. August 2022 [zitiert 15. November 2023];13. Verfügbar unter: <https://pubmed-1ncbi-1nlm-1nih-1gov-10013b5ok32b7.han.medunigraz.at/36090974/>
58. Sahin U, Derhovanessian E, Miller M, Kloke BP, Simon P, Löwer M, u. a. Personalized RNA mutanome vaccines mobilize poly-specific therapeutic immunity against cancer. *Nature.* 13. Juli 2017;547(7662):222–6.
59. Dannull J, Nair S, Su Z, Boczkowski D, DeBeck C, Yang B, u. a. Enhancing the immunostimulatory function of dendritic cells by transfection with mRNA encoding OX40 ligand. *Blood.* 15. April 2005;105(8):3206–13.
60. Van Lint S, Wilgenhof S, Heirman C, Corthals J, Breckpot K, Bonehill A, u. a. Optimized dendritic cell-based immunotherapy for melanoma: the TriMix-formula. *Cancer Immunol Immunother.* September 2014;63(9):959–67.
61. Wilgenhof S, Van Nuffel AMT, Benteyn D, Corthals J, Aerts C, Heirman C, u. a. A phase IB study on intravenous synthetic mRNA electroporated dendritic cell immunotherapy in pretreated advanced melanoma patients. *Annals of Oncology.* Oktober 2013;24(10):2686–93.
62. Van Lint S, Goyvaerts C, Maenhout S, Goethals L, Disy A, Benteyn D, u. a. Preclinical Evaluation of TriMix and Antigen mRNA-Based Antitumor Therapy. *Cancer Research.* 1. April 2012;72(7):1661–71.
63. Wilgenhof S, Corthals J, Heirman C, Van Baren N, Lucas S, Kvistborg P, u. a. Phase II Study of Autologous Monocyte-Derived mRNA Electroporated Dendritic Cells (TriMixDC-MEL) Plus Ipilimumab in Patients With Pretreated Advanced Melanoma. *JCO.* 20. April 2016;34(12):1330–8.
64. Kreiter S, Selmi A, Diken M, Koslowski M, Britten CM, Huber C, u. a. Intranodal Vaccination with Naked Antigen-Encoding RNA Elicits Potent Prophylactic and Therapeutic Antitumoral Immunity. *Cancer Research.* 15. November 2010;70(22):9031–40.
65. Kreiter S, Diken M, Selmi A, Diekmann J, Attig S, Hüseemann Y, u. a. FLT3 Ligand Enhances the Cancer Therapeutic Potency of Naked RNA Vaccines. *Cancer Research.* 1. Oktober 2011;71(19):6132–42.
66. Van der Jeught K, Joe PT, Bialkowski L, Heirman C, Daszkiewicz L, Liechtenstein T, u. a. Intratumoral administration of mRNA encoding a fusokine consisting of IFN- β and the ectodomain of the TGF- β receptor II potentiates antitumor immunity. *Oncotarget.* 3. November 2014;5(20):10100–13.
67. BioNTech | mRNA: eine revolutionäre Wirkstoffklasse für sich [Internet]. [zitiert 21. März 2024]. Verfügbar unter: <https://www.biontech.com/de/de/home/research-and-innovation/drug-classes/mrna.html>
68. Kranz LM, Diken M, Haas H, Kreiter S, Loquai C, Reuter KC, u. a. Systemic RNA delivery to dendritic cells exploits antiviral defence for cancer immunotherapy. *Nature.* Juni 2016;534(7607):396–401.
69. Kundu K, Ghosh S, Sarkar R, Edri A, Brusilovsky M, Gershoni-Yahalom O, u. a. Inhibition of the NKp44-PCNA Immune Checkpoint Using a mAb to PCNA. *Cancer Immunology Research.* 1. Juli 2019;7(7):1120–34.
70. Barrow AD, Martin CJ, Colonna M. The Natural Cytotoxicity Receptors in Health and Disease. *Front Immunol.* 7. Mai 2019;10:909.
71. Shemesh A, Kugel A, Steiner N, Yezersky M, Tirosh D, Edri A, u. a. NKp44 and

- NKp30 splice variant profiles in decidua and tumor tissues: a comparative viewpoint. *Oncotarget*. 25. Oktober 2016;7(43):70912–23.
72. Shemesh A, Brusilovsky M, Hadad U, Teltsh O, Edri A, Rubin E, u. a. Survival in acute myeloid leukemia is associated with NKp44 splice variants. *Oncotarget*. 31. Mai 2016;7(22):32933–45.
73. Uhlén M, Fagerberg L, Hallström BM, Lindskog C, Oksvold P, Mardinoglu A, u. a. Tissue-based map of the human proteome. *Science*. 23. Januar 2015;347(6220):1260419.
74. Uhlen M, Karlsson MJ, Zhong W, Tebani A, Pou C, Mikes J, u. a. A genome-wide transcriptomic analysis of protein-coding genes in human blood cells. *Science*. 20. Dezember 2019;366(6472):eaax9198.
75. Costello RT, Knoblauch B, Sanchez C, Mercier D, Le Treut T, Sébahoun G. Expression of natural killer cell activating receptors in patients with chronic lymphocytic leukaemia. *Immunology*. Februar 2012;135(2):151–7.
76. Costello RT, Boehrer A, Sanchez C, Mercier D, Baier C, Le Treut T, u. a. Differential expression of natural killer cell activating receptors in blood versus bone marrow in patients with monoclonal gammopathy. *Immunology*. Juli 2013;139(3):338–41.
77. Frishman-Levy L, Shemesh A, Bar-Sinai A, Ma C, Ni Z, Frenkel S, u. a. Central nervous system acute lymphoblastic leukemia: role of natural killer cells. *Blood*. 5. Mai 2015;125(22):3420.
78. Essa ES, Tawfeek GAE, El Hassanin SA, Emara KGM. Modulation the expression of natural killer cell activating receptor (NKp44) in the peripheral blood of diffuse large B-cell lymphoma patients and the correlation with clinic pathological features. *Clinical Immunology*. 1. März 2018;188:38–44.
79. Than NG, Romero R, Goodman M, Weckle A, Xing J, Dong Z, u. a. A primate subfamily of galectins expressed at the maternal–fetal interface that promote immune cell death. *Proc Natl Acad Sci USA*. 16. Juni 2009;106(24):9731–6.
80. Si Y, Li Y, Yang T, Li X, Ayala GJ, Mayo KH, u. a. Structure–function studies of galectin-14, an important effector molecule in embryology. *The FEBS Journal*. Februar 2021;288(3):1041–55.
81. Yang QS, Ying K, Yuan HL, Chen JZ, Meng XF, Wang Z, u. a. Cloning and expression of a novel human galectin cDNA, predominantly expressed in placenta. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression*. April 2002;1574(3):407–11.
82. Xiao C, Wang Y, Fan Y. Bioinformatics Analysis Identifies Potential Related Genes in the Pathogenesis of Intrauterine Fetal Growth Retardation. *Evol Bioinform Online*. Januar 2022;18:117693432211127.
83. Bolnick JM, Kohan-Ghadr HR, Fritz R, Bolnick AD, Kilburn BA, Diamond MP, u. a. Altered Biomarkers in Trophoblast Cells Obtained Noninvasively Prior to Clinical Manifestation of Perinatal Disease. *Sci Rep*. 23. September 2016;6(1):32382.
84. Than NG, Romero R, Xu Y, Erez O, Xu Z, Bhatti G, u. a. Evolutionary origins of the placental expression of chromosome 19 cluster galectins and their complex dysregulation in preeclampsia. *Placenta*. November 2014;35(11):855–65.
85. Fritz R, Kohan-Ghadr HR, Bolnick JM, Bolnick AD, Kilburn BA, Diamond MP, u. a. Noninvasive detection of trophoblast protein signatures linked to early pregnancy loss using trophoblast retrieval and isolation from the cervix (TRIC). *Fertility and Sterility*. August 2015;104(2):339-346.e4.
86. Liu H, Dai Q, Li Y, Tang Z, She T. Association between high galectin expression and poor prognosis in hematologic cancers: a systematic review and meta-analysis. *Hematology*. 31. Dezember 2023;28(1):2227494.
87. Nehmé R, St-Pierre Y. Targeting intracellular galectins for cancer treatment. *Front*

- Immunol. 11. September 2023;14:1269391.
88. Fuselier C, Dumoulin A, Paré A, Nehmé R, Ajarrag S, Granger Joly De Boissel P, u. a. Placental Galectins in Cancer: Why We Should Pay More Attention. *Cells*. 29. Januar 2023;12(3):437.
 89. Kruk L, Braun A, Cosset E, Gudermann T, Mammadova-Bach E. Galectin functions in cancer-associated inflammation and thrombosis. *Front Cardiovasc Med*. 17. Februar 2023;10:1052959.
 90. Oliveira Fernandes De Araujo L, St-Pierre Y. Galectin-14 expression in ovarian cancer [Internet]. *Cancer Biology*; 2019 Juli [zitiert 23. Februar 2024]. Verfügbar unter: <http://biorxiv.org/lookup/doi/10.1101/717793>
 91. Gou L, Yang G, Ma S, Ding T, Sun L, Liu F, u. a. Galectin-14 promotes hepatocellular carcinoma tumor growth *via* enhancing heparan sulfate proteoglycan modification. *J Biomed Res*. 2023;37(6):418.
 92. Chen T, Li X, Yang Y, Erdene AG, Church RL. Does lens intrinsic membrane protein MP19 contain a membrane-targeting signal? *Molecular Vision*.
 93. Lüllmann-Rauch R, Paulsen F. Taschenlehrbuch Histologie: 10 Tabellen. 4., vollständig überarb. Aufl. Stuttgart: Thieme; 2012. 680 S.
 94. Shi Y, De Maria AB, Wang H, Mathias RT, FitzGerald PG, Bassnett S. Further Analysis of the Lens Phenotype in *Lim2* -Deficient Mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 20. September 2011;52(10):7332.
 95. Cvekl A, Camerino MJ. Generation of Lens Progenitor Cells and Lentoid Bodies from Pluripotent Stem Cells: Novel Tools for Human Lens Development and Ocular Disease Etiology. *Cells*. 6. November 2022;11(21):3516.
 96. Reza E, Azizi H, Skutella T. Sox2 Localization During Spermatogenesis and Its Association with other Spermatogenesis Markers Using Protein-Protein Network Analysis. *JRI* [Internet]. 30. Juli 2023 [zitiert 10. März 2024]; Verfügbar unter: <https://publish.kne-publishing.com/index.php/JRI/article/view/13273>
 97. Shembrey C, Foroutan M, Hollande F. A new natural killer cell-specific gene signature predicting recurrence in colorectal cancer patients. *Front Immunol*. 6. Januar 2023;13:1011247.
 98. Pei R. A novel mutation of LIM2 causes autosomal dominant membranous cataract in a Chinese family. *Int J Ophthalmol*. 18. Oktober 2020;13(10):1512–20.
 99. Irum B, Khan SY, Ali M, Kaul H, Kabir F, Rauf B, u. a. Mutation in LIM2 Is Responsible for Autosomal Recessive Congenital Cataracts. *Yan YB, Herausgeber. PLoS ONE*. 4. November 2016;11(11):e0162620.
 100. Li B, McCrudden CM, Yuen HF, Xi X, Lyu P, Chan KW, u. a. CD133 in brain tumor: the prognostic factor. *Oncotarget*. 14. Februar 2017;8(7):11144–59.
 101. Haeseleer F, Sokal I, Verlinde CLMJ, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Pronin AN, u. a. Five Members of a Novel Ca²⁺-binding Protein (CABP) Subfamily with Similarity to Calmodulin. *Journal of Biological Chemistry*. Januar 2000;275(2):1247–60.
 102. Rieke F, Lee A, Haeseleer F. Characterization of Ca²⁺-Binding Protein 5 Knockout Mouse Retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1. November 2008;49(11):5126.
 103. Sokal I, Haeseleer F. Insight into the Role of Ca²⁺-Binding Protein 5 in Vesicle Exocytosis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 24. November 2011;52(12):9131.
 104. Tissue expression of CABP5 - Summary - The Human Protein Atlas [Internet]. [zitiert 10. März 2024]. Verfügbar unter: <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000105507-CABP5/tissue>
 105. Malnic B, Godfrey PA, Buck LB. The human olfactory receptor gene family. *Proc Natl Acad Sci USA*. 24. Februar 2004;101(8):2584–9.
 106. Glusman G, Bahar A, Sharon D, Pilpel Y, White J, Lancet D. The olfactory

- receptor gene superfamily: data mining, classification, and nomenclature. *Mammalian Genome*. 1. November 2000;11(11):1016–23.
107. Corda PO, Santiago J, Fardilha M. G-Protein Coupled Receptors in Human Sperm: An In Silico Approach to Identify Potential Modulatory Targets. *Molecules*. 1. Oktober 2022;27(19):6503.
108. Gene: CCR8 (ENSG00000179934) - Summary - Homo_sapiens - Ensembl genome browser 111 [Internet]. [zitiert 21. Februar 2024]. Verfügbar unter: https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?g=ENSG00000179934;r=3:39329709-39333680
109. Moser B. Chemokine Receptor-Targeted Therapies: Special Case for CCR8. *Cancers*. 20. Januar 2022;14(3):511.
110. Barsheshet Y, Wildbaum G, Levy E, Vitenshtein A, Akinseye C, Griggs J, u. a. CCR8⁺ FOXP3⁺ T_{reg} cells as master drivers of immune regulation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 6. Juni 2017;114(23):6086–91.
111. Haruna M, Ueyama A, Yamamoto Y, Hirata M, Goto K, Yoshida H, u. a. The impact of CCR8⁺ regulatory T cells on cytotoxic T cell function in human lung cancer. *Sci Rep*. 30. März 2022;12(1):5377.
112. Inngjerdigen M, Damaj B, Maghazachi AA. Human NK Cells Express CC Chemokine Receptors 4 and 8 and Respond to Thymus and Activation-Regulated Chemokine, Macrophage-Derived Chemokine, and I-309. *The Journal of Immunology*. 15. April 2000;164(8):4048–54.
113. Chensue SW, Lukacs NW, Yang TY, Shang X, Frait KA, Kunkel SL, u. a. Aberrant in Vivo T Helper Type 2 Cell Response and Impaired Eosinophil Recruitment in Cc Chemokine Receptor 8 Knockout Mice. *The Journal of Experimental Medicine*. 5. März 2001;193(5):573–84.
114. Schaerli P, Ebert L, Willimann K, Blaser A, Roos RS, Loetscher P, u. a. A Skin-selective Homing Mechanism for Human Immune Surveillance T Cells. *The Journal of Experimental Medicine*. 3. Mai 2004;199(9):1265–75.
115. McCully ML, Ladell K, Andrews R, Jones RE, Miners KL, Roger L, u. a. CCR8 Expression Defines Tissue-Resident Memory T Cells in Human Skin. *The Journal of Immunology*. 1. März 2018;200(5):1639–50.
116. Fraga M, Yáñez M, Sherman M, Llerena F, Hernandez M, Nourdin G, u. a. Immunomodulation of T Helper Cells by Tumor Microenvironment in Oral Cancer Is Associated With CCR8 Expression and Rapid Membrane Vitamin D Signaling Pathway. *Front Immunol*. 7. Mai 2021;12:643298.
117. Haque NS, Fallon JT, Pan JJ, Taubman MB, Harpel PC. Chemokine receptor–8 (CCR8) mediates human vascular smooth muscle cell chemotaxis and metalloproteinase-2 secretion. *Blood*. 15. Februar 2004;103(4):1296–304.
118. Haque NS, Fallon JT, Taubman MB, Harpel PC. The chemokine receptor CCR8 mediates human endothelial cell chemotaxis induced by I-309 and Kaposi sarcoma herpesvirus-encoded vMIP-I and by lipoprotein(a)-stimulated endothelial cell conditioned medium. *Blood*. 1. Januar 2001;97(1):39–45.
119. Xing X, Flotte TJ, Law ME, Blahnik AJ, Chng WJ, Huang G, u. a. Expression of the Chemokine Receptor Gene, CCR8, is Associated With DUSP22 Rearrangements in Anaplastic Large Cell Lymphoma. *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology*. September 2015;23(8):580–9.
120. Kuklin I, Kungurov N, Kokhan M, Kuklina M. Klinische und immunhistochemische Aspekte der Diagnostik von anaplastischen großzelligen CD30-positiven Lymphomen. *Akt Dermatol*. 25. Februar 2013;39(01/02):27–30.
121. Zheng D, Wang X, Cheng L, Qin L, Jiang Z, Zhao R, u. a. The Chemokine

- Receptor CCR8 Is a Target of Chimeric Antigen T Cells for Treating T Cell Malignancies. *Front Immunol.* 26. Mai 2022;13:808347.
122. Giustiniani J, Dobos G, Moins-Teisserenc H, Eustaquio T, Battistella M, Ortonne N, u. a. CCR8 is a new therapeutic target in cutaneous T-cell lymphomas. *Blood Advances.* 14. Juni 2022;6(11):3507–12.
123. Deutsch AJ, Steinbauer E, Hofmann NA, Strunk D, Gerlza T, Beham-Schmid C, u. a. Chemokine receptors in gastric MALT lymphoma: loss of CXCR4 and upregulation of CXCR7 is associated with progression to diffuse large B-cell lymphoma. *Modern Pathology.* Februar 2013;26(2):182–94.
124. Kidani Y, Nogami W, Yasumizu Y, Kawashima A, Tanaka A, Sonoda Y, u. a. CCR8-targeted specific depletion of clonally expanded Treg cells in tumor tissues evokes potent tumor immunity with long-lasting memory. *Proc Natl Acad Sci USA.* 15. Februar 2022;119(7):e2114282119.
125. Tateyama N, Asano T, Suzuki H, Li G, Yoshikawa T, Tanaka T, u. a. Epitope Mapping of Anti-Mouse CCR3 Monoclonal Antibodies Using Flow Cytometry. *Antibodies.* 2. Dezember 2022;11(4):75.
126. Chu YT, Liao MT, Tsai KW, Lu KC, Hu WC. Interplay of Chemokines Receptors, Toll-like Receptors, and Host Immunological Pathways. *Biomedicines.* 25. August 2023;11(9):2384.
127. Korbecki J, Kojder K, Simińska D, Bohatyrewicz R, Gutowska I, Chlubek D, u. a. CC Chemokines in a Tumor: A Review of Pro-Cancer and Anti-Cancer Properties of the Ligands of Receptors CCR1, CCR2, CCR3, and CCR4. *IJMS.* 9. November 2020;21(21):8412.
128. Jung Y. Comparative Analysis of Dibutyric cAMP and Butyric Acid on the Differentiation of Human Eosinophilic Leukemia EoL-1 Cells. *Immune Netw.* 2015;15(6):313.
129. Tian M, Chen L, Ma L, Wang D, Shao B, Wu J, u. a. Expression and prognostic significance of CCL11/CCR3 in glioblastoma. *Oncotarget.* 31. Mai 2016;7(22):32617–27.
130. Lee YJ, Kim DH, Lee SH, Nam HS, Roh MR, Cho MK. Chemokine Receptor CCR3 Expression in Malignant Cutaneous Tumors. *Ann Dermatol.* 2010;22(4):412.
131. Sand KE, Rye KP, Mannsåker B, Bruserud Ø, Kittang AO. Expression patterns of chemokine receptors on circulating T cells from myelodysplastic syndrome patients. *OncoImmunology.* Februar 2013;2(2):e23138.
132. Kleinhans M, Tun-Kyi A, Gilliet M, Kadin ME, Dummer R, Burg G, u. a. Functional expression of the eotaxin receptor CCR3 in CD30+ cutaneous T-cell lymphoma. *Blood.* 15. Februar 2003;101(4):1487–93.
133. Trentin L, Cabrelle A, Facco M, Carollo D, Miorin M, Tosoni A, u. a. Homeostatic chemokines drive migration of malignant B cells in patients with non-Hodgkin lymphomas. *Blood.* 15. Juli 2004;104(2):502–8.
134. Buri C, Körner M, Schärli P, Cefai D, Uguccioni M, Mueller C, u. a. CC chemokines and the receptors CCR3 and CCR5 are differentially expressed in the nonneoplastic leukocytic infiltrates of Hodgkin disease. *Blood.* 15. März 2001;97(6):1543–8.
135. Catalan-Dibene J, Vazquez MI, Luu VP, Nuccio SP, Karimzadeh A, Kastenschmidt JM, u. a. Identification of IL-40, a Novel B Cell–Associated Cytokine. *The Journal of Immunology.* 1. November 2017;199(9):3326–35.
136. Bashi MA, Ad’hiah AH. Molecular landscape of the interleukin-40 encoding gene, C17orf99, in patients with acute myeloid leukemia. *Gene.* April 2024;904:148214.
137. Navrátilová A, Bečvář V, Hulejová H, Tomčík M, Štolová L, Mann H, u. a. New pro-inflammatory cytokine IL-40 is produced by activated neutrophils and plays a role in

- the early stages of seropositive rheumatoid arthritis. *RMD Open*. Mai 2023;9(2):e002894.
138. Rubaye AMA. Serum interleukin 40: an innovative diagnostic biomarker for patients with systemic lupus erythematosus. 2023;78(5).
 139. Guggino G, Rizzo C, Mohammadnezhad L, Lo Pizzo M, Lentini VL, Di Liberto D, u. a. Possible role for IL-40 and IL-40-producing cells in the lymphocytic infiltrated salivary glands of patients with primary Sjögren's syndrome. *RMD Open*. Mai 2023;9(2):e002738.
 140. Said NM, Yassin F, Esh AM, Saeed E. Association between serum level of pentraxin-3 and interleukin-40 with HCC disease in Egypt. *Biochemistry Letters*. 1. Dezember 2020;16(1):50–62.
 141. Gattis JL, Washington AV, Chisholm MM, Quigley L, Szyk A, McVicar DW, u. a. The Structure of the Extracellular Domain of Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells Like Transcript-1 and Evidence for a Naturally Occurring Soluble Fragment. *Journal of Biological Chemistry*. Mai 2006;281(19):13396–403.
 142. Hemmi H, Idoyaga J, Suda K, Suda N, Kennedy K, Aderem A, u. a. A new Trem family member, Trem14, binds to dead cells and is a DAP12 linked marker for subsets of mouse macrophages and dendritic cells. 2010;
 143. Backer R, Schwandt T, Greuter M, Oosting M, Jüngerkes F, Tüting T, u. a. Effective collaboration between marginal metallophilic macrophages and CD8⁺ dendritic cells in the generation of cytotoxic T cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 5. Januar 2010;107(1):216–21.
 144. Huang SJ, Li ZL, Ma XL, Wang JL. TREML4: a Potential Target for Immunotherapy of Sepsis. *Discovery Medicine*. 26. Oktober 2021;32(166):87–92.
 145. Gonzalez-Cotto M, Guo L, Karwan M, Sen SK, Barb J, Collado CJ, u. a. TREML4 Promotes Inflammatory Programs in Human and Murine Macrophages and Alters Atherosclerosis Lesion Composition in the Apolipoprotein E Deficient Mouse. *Front Immunol*. 30. März 2020;11:397.
 146. Comas-Casellas E, Martínez-Barriocanal Á, Miró F, Ejarque-Ortiz A, Schwartz S, Martín M, u. a. Cloning and Characterization of CD300d, a Novel Member of the Human CD300 Family of Immune Receptors. *Journal of Biological Chemistry*. März 2012;287(13):9682–93.
 147. Wang C, Zheng X, Zhang J, Jiang X, Wang J, Li Y, u. a. CD300ld on neutrophils is required for tumour-driven immune suppression. *Nature*. 28. September 2023;621(7980):830–9.
 148. Vitallé J, Terrén I, Orrantia A, Bilbao A, Gamboa PM, Borrego F, u. a. The Expression and Function of CD300 Molecules in the Main Players of Allergic Responses: Mast Cells, Basophils and Eosinophils. *IJMS*. 30. April 2020;21(9):3173.
 149. Li Y, Wang C, Lu Z, Luo M. Targeting PMN-MDSCs via CD300ld receptor for cancer immunotherapy. *Clinical & Translational Med*. Januar 2024;14(1):e1534.
 150. Radjabova V, Mastroeni P, Skjødt K, Zacccone P, De Bono B, Goodall JC, u. a. TARM1 Is a Novel Leukocyte Receptor Complex–Encoded ITAM Receptor That Costimulates Proinflammatory Cytokine Secretion by Macrophages and Neutrophils. *The Journal of Immunology*. 1. Oktober 2015;195(7):3149–59.
 151. Yabe R, Chung SH, Murayama MA, Kubo S, Shimizu K, Akahori Y, u. a. TARM1 contributes to development of arthritis by activating dendritic cells through recognition of collagens. *Nat Commun*. 4. Januar 2021;12(1):94.
 152. Li X, Wang M, Ming S, Liang Z, Zhan X, Cao C, u. a. TARM-1 Is Critical for Macrophage Activation and Th1 Response in *Mycobacterium tuberculosis* Infection. *The Journal of Immunology*. 1. Juli 2021;207(1):234–43.
 153. Li B, Kamarck ML, Peng Q, Lim FL, Keller A, Smeets MAM, u. a. From musk to

- body odor: decoding olfaction through genetic variation [Internet]. *Genetics*; 2021 Apr [zitiert 5. März 2024]. Verfügbar unter: <http://biorxiv.org/lookup/doi/10.1101/2021.04.27.441177>
154. Young JM, Endicott RM, Parghi SS, Walker M, Kidd JM, Trask BJ. Extensive Copy-Number Variation of the Human Olfactory Receptor Gene Family. *The American Journal of Human Genetics*. August 2008;83(2):228–42.
155. OR51B2 olfactory receptor family 51 subfamily B member 2 [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI [Internet]. [zitiert 6. März 2024]. Verfügbar unter: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?Db=gene&Cmd=ShowDetailView&TermToSearch=79345>
156. Tong T, Wang Y, Kang SG, Huang K. Ectopic Odorant Receptor Responding to Flavor Compounds: Versatile Roles in Health and Disease. *Pharmaceutics*. 23. August 2021;13(8):1314.
157. Orecchioni M, Matsunami H, Ley K. Olfactory receptors in macrophages and inflammation. *Front Immunol*. 13. Oktober 2022;13:1029244.
158. Weber L, Al-Refae K, Ebbert J, Jägers P, Altmüller J, Becker C, u. a. Activation of odorant receptor in colorectal cancer cells leads to inhibition of cell proliferation and apoptosis. *Matsunami H, Herausgeber. PLoS ONE*. 8. März 2017;12(3):e0172491.
159. GLYATL1B Gene - GeneCards | GLYLB Protein | GLYLB Antibody [Internet]. [zitiert 12. März 2024]. Verfügbar unter: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=GLYATL1B>
160. GLYATL1B protein expression summary - The Human Protein Atlas [Internet]. [zitiert 12. März 2024]. Verfügbar unter: <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000255151-GLYATL1B>
161. H3C7 protein expression summary - The Human Protein Atlas [Internet]. [zitiert 12. März 2024]. Verfügbar unter: <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000277775-H3C7>
162. H3C7 Gene - GeneCards | H31 Protein | H31 Antibody [Internet]. [zitiert 12. März 2024]. Verfügbar unter: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=H3C7&keywords=h3c7>
163. Xie W, Zhang J, Zhong P, Qin S, Zhang H, Fan X, u. a. Expression and potential prognostic value of histone family gene signature in breast cancer. *Exp Ther Med* [Internet]. 25. Oktober 2019 [zitiert 12. März 2024]; Verfügbar unter: <http://www.spandidos-publications.com/10.3892/etm.2019.8131>
164. Zheng Y, Chi S, Li C. Identification of potential gene drivers of cutaneous squamous cell carcinoma: Analysis of microarray data. *Medicine*. 25. September 2020;99(39):e22257.
165. Xiang F, Li L, Lin J, Li S, Peng G. Network Pharmacology and Bioinformatics Methods Reveal the Mechanism of Zao-Jiao-Ci in the Treatment of LSCC. Zhao D, Herausgeber. *Journal of Oncology*. 25. Juni 2021;2021:1–15.
166. Liu S, Shi J, Liu Y, Wang L, Zhang J, Huang Y, u. a. Analysis of mRNA expression differences in bladder cancer metastasis based on TCGA datasets. *J Int Med Res*. März 2021;49(3):030006052199692.
167. H3C8 Gene - GeneCards | H31 Protein | H31 Antibody [Internet]. [zitiert 12. März 2024]. Verfügbar unter: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=H3C8>
168. H3C8 protein expression summary - The Human Protein Atlas [Internet]. [zitiert 12. März 2024]. Verfügbar unter: <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000273983-H3C8>
169. Castañeda-Partida L, Ocadiz-Delgado R, Sánchez-López JM, García-Villa E, Peñaloza-González JG, Velázquez-Aviña MM, u. a. Global expression profiling of CD10 + /CD19 + pre-B lymphoblasts from Hispanic B-ALL patients correlates with comparative TARGET database analysis. *Discov Onc*. Dezember 2022;13(1):28.

170. Zhang M, Luo SC. Gene expression profiling of epithelial ovarian cancer reveals key genes and pathways associated with chemotherapy resistance. *Genet Mol Res* [Internet]. 2016 [zitiert 12. März 2024];15(1). Verfügbar unter: <http://www.funpecrp.com.br/gmr/year2016/vol15-1/pdf/gmr7496.pdf>
171. H2AC14 Gene - GeneCards | H2A1J Protein | H2A1J Antibody [Internet]. [zitiert 12. März 2024]. Verfügbar unter: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=H2AC14&keywords=H2AC14>
172. H2AC14 protein expression summary - The Human Protein Atlas [Internet]. [zitiert 12. März 2024]. Verfügbar unter: <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000276368-H2AC14>
173. Bhat V, Srinathan S, Pasini E, Angeli M, Chen E, Baciu C, u. a. Epigenetic basis of hepatocellular carcinoma: A network-based integrative meta-analysis. *WJH*. 27. Januar 2018;10(1):155–65.
174. Li Y, Zhang C, Jiang A, Lin A, Liu Z, Cheng X, u. a. Potential anti-tumor effects of regulatory T cells in the tumor microenvironment: a review. *J Transl Med*. 20. März 2024;22(1):293.
175. Blom B, Van Hoveven V, Hazenberg MD. ILCs in hematologic malignancies: Tumor cell killers and tissue healers. *Seminars in Immunology*. Februar 2019;41:101279.
176. Mohamed AA, al-Ramadi BK, Fernandez-Cabezudo MJ. Interplay between Microbiota and $\gamma\delta$ T Cells: Insights into Immune Homeostasis and Neuro-Immune Interactions. *IJMS*. 1. Februar 2024;25(3):1747.
177. Greuter T, Manser C, Pittet V, Vavricka SR, Biedermann L, on behalf of Swiss IBDnet an official working group of the SS of G. Gender Differences in Inflammatory Bowel Disease. *Digestion*. 29. Januar 2020;101(Suppl. 1):98–104.
178. Iraqi M, Edri A, Greenspan Y, Goldstein O, Ofir N, Bolel P, u. a. Blocking the PCNA/NKp44 Checkpoint to Stimulate NK Cell Responses to Multiple Myeloma. *IJMS*. 25. April 2022;23(9):4717.
179. Sakkal S, Miller S, Apostolopoulos V, Nurgali K. Eosinophils in Cancer: Favourable or Unfavourable? *CMC*. 15. März 2016;23(7):650–66.
180. Xing Y, Tian Y, Kurosawa T, Matsui S, Touma M, Yanai T, u. a. CCL 11-induced eosinophils inhibit the formation of blood vessels and cause tumor necrosis. *Genes to Cells*. Juni 2016;21(6):624–38.
181. Nagira Y, Nagira M, Nagai R, Nogami W, Hirata M, Ueyama A, u. a. S-531011, a Novel Anti-Human CCR8 Antibody, Induces Potent Antitumor Responses through Depletion of Tumor-Infiltrating CCR8-Expressing Regulatory T Cells. *Molecular Cancer Therapeutics*. 5. September 2023;22(9):1063–72.
182. Van Damme H, Dombrecht B, Kiss M, Roose H, Allen E, Van Overmeire E, u. a. Therapeutic depletion of CCR8⁺ tumor-infiltrating regulatory T cells elicits antitumor immunity and synergizes with anti-PD-1 therapy. *J Immunother Cancer*. Februar 2021;9(2):e001749.
183. Khamisipour G, Jadidi-Niaragh F, Jahromi AS, Zandi K, Hojjat-Farsangi M. Mechanisms of tumor cell resistance to the current targeted-therapy agents. *Tumor Biol*. August 2016;37(8):10021–39.
184. Cesi G, Walbrecq G, Margue C, Kreis S. Transferring intercellular signals and traits between cancer cells: extracellular vesicles as “homing pigeons”. *Cell Commun Signal*. Dezember 2016;14(1):13.
185. Wang MM, Coupland SE, Aittokallio T, Figueiredo CR. Resistance to immune checkpoint therapies by tumour-induced T-cell desertification and exclusion: key mechanisms, prognostication and new therapeutic opportunities. *Br J Cancer*. 12. Oktober 2023;129(8):1212–24.

186. Guo S, Chen X, Guo C, Wang W. Tumour-associated macrophages heterogeneity drives resistance to clinical therapy. *Expert Rev Mol Med*. 2022;24:e17.
187. El-Sayes N, Vito A, Mossman K. Tumor Heterogeneity: A Great Barrier in the Age of Cancer Immunotherapy. *Cancers*. 15. Februar 2021;13(4):806.
188. Jamal-Hanjani M, Thanopoulou E, Peggs KS, Quezada SA, Swanton C. Tumour heterogeneity and immune-modulation. *Curr Opin Pharmacol*. August 2013;13(4):497–503.
189. Zhang G, Tang T, Chen Y, Huang X, Liang T. mRNA vaccines in disease prevention and treatment. *Sig Transduct Target Ther*. 20. September 2023;8(1):1–30.
190. Zhang Y, Lin S, Wang XY, Zhu G. Nanovaccines for cancer immunotherapy. 2020;
191. Hurst M, Jordan A, Capstick J, Brewerton M, Cockroft R, Ingram J. Patients with previous immediate hypersensitivity reactions to polyethylene glycol can safely receive the BNT162b2 mRNA COVID-19 vaccine. *Internal Medicine Journal*. Oktober 2022;52(10):1818–20.
192. Kannemeier C, Shibamiya A, Nakazawa F, Trusheim H, Ruppert C, Markart P, u. a. Extracellular RNA constitutes a natural procoagulant cofactor in blood coagulation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 10. April 2007;104(15):6388–93.
193. Sahin U, Oehm P, Derhovanessian E, Jabulowsky RA, Vormehr M, Gold M, u. a. An RNA vaccine drives immunity in checkpoint-inhibitor-treated melanoma. *Nature*. 3. September 2020;585(7823):107–12.