

Diplomarbeit

**mRNA-Impfstoffe in der soliden Onkologie –
Stand der Entwicklung und Ausblick**

eingereicht von

Edgar Mkrtchyan

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der gesamten Heilkunde

(Dr. med. univ.)

an der

Medizinischen Universität Graz

ausgeführt am

Universitätsklinikum für Innere Medizin

an der

Klinischen Abteilung für Onkologie

unter der Anleitung von

**Dr. med. univ. Georg Richtig, PhD,
Assoz. Prof. Priv.-Doz. Dr. med. univ. Martin Pichler**

Graz, 09.09.2024

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, 09.09.2024

Edgar Mkrtchyan eh.

Danksagungen

An aller erster Stelle möchte ich mich bei meiner Familie bedanken. Deren Unterstützung kann man nicht in Worte fassen und ich werde ihnen mein Leben lang für alles dankbar sein.

Auch möchte ich mich bei meinen Freunden und Mariia bedanken, die mich ebenfalls während des Studiums unterstützten.

Schließlich möchte ich mich bei meinen Betreuern Dr. med. univ. Georg Richtig, PhD, und Assoz. Prof. Priv.-Doz. Dr. med. univ. Martin Pichler recht herzlich bedanken. Sie haben sehr viel Mühe und Geduld für mich aufgeopfert, damit ich diese Arbeit fertigstellen konnte.

Zusammenfassung

Einleitung

Wie die Corona-Pandemie gezeigt hat, können mRNA-Impfstoffe einen vielfältigen Anwendungsbereich haben. So wurde bereits vor der Pandemie daran gearbeitet, mRNA-Impfstoffe bei Krebserkrankungen zu erforschen. Jedoch hat es bis heute keine Zulassung für einen mRNA-Impfstoff in der Krebstherapie gegeben. Das mag vor allem an der komplizierten Krebsbiologie liegen, jedoch auch an der Tatsache, dass eigentlich gegen körpereigene Zellen geimpft werden sollte.

Das Ziel dieser Arbeit war es einen Überblick darüber zu verschaffen, wie mRNA-Impfstoffe funktionieren und was das dahinterliegende Konzept ist. Weiters soll gezeigt werden, welche Krebsarten sich für einen mRNA-Impfstoff eignen würden bzw. welche Gene.

Material und Methoden

Es wurde der komplette Datensatz (RNASeq-Daten von 53 verschiedenen Gewebearten) von gtexportal.org heruntergeladen und mittels R Script wurden die Expressionsdaten analysiert. In einem zweiten Schritt wurde eine PubMed-Abfrage gemacht, um die gefundenen Gene in Zusammenhang mit der derzeitigen Literatur zu setzen.

Resultate

Insgesamt wurden in GetEx-Datenbank 56.200 Gene in 53 Gewebetypen untersucht gefunden. 33518 Gene wurden aus der Analyse exkludiert, da sie zu hohe Expressionswerte in kritischen Gewebetypen zeigten (Gehirn und Herz). Nachdem nur Gene genommen wurden, die eine ubiquitäre Expression in nur einem Gen hatten, blieben 3428 Gene übrig, wovon 581 Protein-codierende Gene waren. In der PubMed-Abfrage gab es für die Gene GIP (n=5572), F9 (n=4935), IL21 (n=3908), LCT (n=2527) und ZAN (n=1989) die meisten Einträge.

Schlussfolgerung

Die mRNA-Impfung ist eine mögliche therapeutische Option mit enorm großem Potential. Die Liste der möglichen Gene ist allerdings endenwollende, sofern man nicht zu viele Off-Target-Effekte in Kauf nehmen möchte.

Abstract

Introduction

As the corona pandemic has shown, mRNA vaccines can have a wide range of applications. For example, even before the pandemic, research was being carried out into mRNA vaccines for cancer. However, to date there has been no approval for an mRNA vaccine in cancer therapy. This may be mainly due to the complicated biology of cancer, but also to the fact that vaccines should actually be used against the body's own cells. The aim of this thesis was to provide an overview of how mRNA vaccines work and what the underlying concept is. Furthermore, it should be shown which types of cancer would be suitable for an mRNA vaccine and which genes.

Material and methods

The complete data set (RNASeq data of 53 different tissue types) was downloaded from gtexportal.org and the expression data was analyzed using R Script. In a second step, a PubMed query was performed to correlate the found genes with the current literature.

Results

A total of 56,200 genes in 53 tissue types were found in the GetEx database. 33518 genes were excluded from the analysis because they showed too high expression levels in critical tissue types (brain and heart). After taking only genes that had ubiquitous expression in only one gene, 3428 genes remained, of which 581 were protein-coding genes. In the PubMed query, the genes GIP (n=5572), F9 (n=4935), IL21 (n=3908), LCT (n=2527) and ZAN (n=1989) had the most entries.

Conclusion

mRNA vaccination is an possible therapeutic option with enormous potential. However, the list of possible genes is endless if one does not want to accept too many off-target effects.

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|------|
| Danksagungen | II |
| Zusammenfassung | III |
| Abstract..... | IV |
| Inhaltsverzeichnis | V |
| Glossar und Abkürzungen | VII |
| Abbildungsverzeichnis | XIII |
| Tabellenverzeichnis | XV |
| 1. Einleitung | 1 |
| 2. Das menschliche Erbgut | 1 |
| 3. Proteinbiosynthese..... | 4 |
| 3.1. Transkription..... | 4 |
| 3.2. Translation | 7 |
| 3.3. Regulation der Translation | 11 |
| 3.4. Modifikation von Proteinen..... | 12 |
| 3.5. Transport von Proteinen..... | 13 |
| 3.6. Initiierung der Proteinbiosynthese..... | 14 |
| 3.6.1. mRNA-Rekrutierung und Scanning | 16 |
| 3.6.2. AUG-Erkennung..... | 18 |
| 3.6.3. eIF2-GTP-Hydrolyse | 19 |
| 3.6.4. Verbindung der 60S-Untereinheiten | 20 |
| 3.6.5. Alternative Initiationsereignisse | 20 |
| 3.6.6. Regulierung des 80S-Initiationsweges | 21 |
| 4. Die mRNA-Impfstoffe..... | 22 |
| 4.1. Einleitung | 22 |
| 4.2. Modifikation der mRNA | 22 |
| 4.2.1. Fünf-Prime-Cap (5`cap) | 23 |
| 4.2.2. Regulierung der Untranslatierten Regionen (UTRs) und ORFs..... | 24 |
| 4.2.3. Synthese der Poly(A)-Sequenz..... | 25 |
| 4.2.4. Reinigung der mRNA..... | 25 |
| 4.3. Immunogene Regulierung von mRNA..... | 26 |
| 4.3.1. Regulierung der selbstadjuvanten Eigenschaft mittels mRNA-Sequenz | 27 |
| 4.3.2. Einfluss von Adjuvantien auf die mRNA-Immunogenität | 28 |
| 4.4. Das mRNA-Transportsystem..... | 29 |
| 4.4.1. Die mRNA-Übertragung | 29 |
| 4.4.2. DCs als Transportsystem | 30 |

| | |
|--|-----|
| 4.4.3. Peptide als mRNA-Träger und Immunaktivatoren..... | 30 |
| 4.4.4. Lipide als Verabreichungssystem | 31 |
| 4.4.5. Polymer-basiertes Verabreichungssystem | 34 |
| 4.4.6. CNE, LCP und LPR als Verabreichungsform..... | 35 |
| 4.4.7. Injektion von mRNA-Impfstoffen | 36 |
| 4.5. mRNA als Wirkstoffplattform | 37 |
| 5. mRNA-Impfstoffe in der Krebstherapie..... | 38 |
| 5.1. Für Immunstimulantien kodierende mRNA | 40 |
| 5.2. Die Rolle tumorassoziierter Antigene (TAAs) beim mRNA-Impfstoff | 41 |
| 5.3. Für Neoantigen kodierender mRNA-Impfstoff | 42 |
| 6. Materialien und Methoden..... | 43 |
| 7. Resultate | 44 |
| 8. Diskussion | 97 |
| 9. Literaturverzeichnis | 101 |
| Supplementary Data | 127 |

Glossar und Abkürzungen

4E-BP - eIF4E-bindende Proteine
A- Adenin
A-Bereich – Akzeptorbereich
Abb – Abbildung
AIH - Autoimmunhepatitis
AITD - autoimmune Schilddrüsenerkrankung
AMP – Adenosinmonophosphat
ADP - Adenosindiphosphat
APC - Antigen-präsentierende Zellen
APE - Aminopolyester
Arg – Arginin
ARCA - Anti-Reverse-Cap-Analoga
ATF – activating transcription factor
ATP – Adenositriphosphat
C – Cytosin
ca – konstitutiv aktiv
CAR-T-Zellen - Chimeric antigen receptor
CART - charge-altering releasable transports
CCT - Chaperonin Containing Tcp1
CD - Cluster of Differentiation
CFTR - cystic-fibrosis transmembrane regulator
circRNA - kreisförmige RNA
CLDN6 - Claudin 6
CNE - kationische Nanoemulsion
CpG – Cytosin, Phosphor, Guanin
CPP - Cell-penetrating peptides/zelldurchdringende Peptide
CRC - Kolorektales Karzinom
CRP – C-reaktives Protein
CTLA - zytotoxische T-Lymphozyten-Antigen
CTT - carboxyterminale Schwanz
DAZ - Deleted in Azoospermia

DC – dendritische Zellen
DFS - Krankheitsfreie Überleben
DOPC - 1,2-Dioleoyl-sn-glycero- 3-Ethylphosphocholin
DOPE - 1,2-Dioleoyl-sn-Glycero-3-Phosphoethanolamin
DOTAP – 1,2-Dioleoyl-3-Trimethylammonium-Propan
DOTMA - 1,2-Di-O-octadecenyl-3-tri- methylammoniumpropan
DSB - Doppelstrangbruch
DSPC – 1,2-Distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholin
DSPE-PEG - 1, 2-Distearoyl-sn-glycero-3-phos-phoethanolamin-N-
[amino(polyethylenglycol)-2000
dsRNA - doppelsträngige RNA
DNA - Desoxyribonukleinsäure
E-Bereich – Exitbereich
EBV - Epstein-Barr-Virus
eIF - eukaryotischer Initiationsfaktor
eIF2 α P - α -Untereinheit von eIF2
eIF4E - Translationsinitiationsfaktor 4E
ER - endoplasmatische Retikulum
ETMR - Embryonaler Tumor mit mehrschichtigen Rosetten
FGF - Fibroblastenwachstumsfaktor
FLS - fibroblastenähnliche Synoviozyten
FPLC - fast protein liquid chromatography
FXR - farnesoid X receptor
G – Guanin
GBC - Gallenblasenkrebs
GCCPuCCAUGG - Kozak-Konsensussequenz
GDI – GDP-Dissoziationsinhibitor
GDP - Guanosindiphosphat
GDPNP - 5'-Guanylylimidodiphosphat
GEF – Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor
GH2 - Growth hormone 2
GIST - Gastrointestinaler Stromatumor
GIP - Gastric inhibitory polypeptide
GIPR – GIP-Rezeptor

GS - Gallensäure
GTEx - Genotype-Tissue Expression
GTP – Guanosintriphosphat
HBV - Hepatitis-B-Virus
HCC - Hepatozelluläres Karzinom
HER2 - human epidermal growth factor receptor 2
HIV - Humanes Immundefizienzvirus
HLA - humanes Leukozytenantigen
HPLC - high-pressure liquid chromatography/Hochdruckflüssigkeitschromatographie
HPV - Humanes Papillomavirus
HWZ – Halbwertszeit
i.c. - intracutan
IFN – Interferon
IGCN - Intratubilären Keimzelleoplasien
IgG - Immunglobulin G
ISG - IFN-stimulierte Gene
IL - Interleukin
i.m. - intramuskulär
i.n. - intranodal
i.v. - intravenös
IVT – in vitro Transkription
ITP - Immunthrombozytopenie
kb – Kilobase
LAMP - Lysosomal-assoziiertes Membranprotein
LCP - Lipid/Calcium/Phosphat
LPS - Lipopolysaccharid
Leu-tRNA - an Leucin gebundene Elongator-Transfer-RNA
lncRNA - long-non-coding RNA
LNP - Lipid-Nanopartikel
LPR - Lipid-Polymer-RNA
IFN- α - Interferon- α
IRES - Internal Ribosome Entry Sites/Ribosomeintrittsstelle
NET - Neuroendokriner Tumor
NK – Natürliche Killerzellen

NMIC - Nicht-muskelinvasiver Krebs
NSCLC - nicht-kleinzelliger Lungenkrebs
NTD – N-terminal domain
NTT - aminoternale Schwanz
m7G-Kappem/7GpppN-Struktur - 5` 7-Methylguanosin-Kappe
MBL - Mannose-bindendes Lektin
MCF-7 - Michigan Cancer Foundation - 7
MCP - monozytochemotaktische Protein
Met-tRNAi – Initiator-Methionyl-Transfer-RNA
MF - Mikrofluidisierung
MHC - Haupthistokompatibilitätskomplex/Major histocompatibility complex
mRNA – Messenger-RNA
MSC - Mesenchymale Stammzellen
nm - Nanometer
OAS – 2`-5`-Oligoadenylat-Synthetase
OATP1B1 - Organic Anion Transporting Polypeptide 1B1
OC - Ovarialkarzinom
ORF - Open Reading Frame
pABOL - Poly(CBA-co-4-amino-1-butanol)
PABP – Poly(A)-Bindungsprotein
PAMAM - Polyamidoamin
PAMP - pathogen-associated molecular pattern
PBAE - Polybetaaminoester
P-Bereich – Peptidylbereich
PCNA - Proliferating-Cell-Nuclear-Antigen
PD-1 - programmed cell death protein 1
PDCL2 - Phosducin like 2
PD-L1 - programmed death-ligand 1
PEG - Polyethylenglykol
PEI – Polyethylenimin
PGH - Plazentare Wachstumshormon
Pi – Phosphat
PIPAC - intraperitoneale Druck-Aerosol-Chemotherapie
PIC – 43S-Präinitialisierungskomplex

pKa – Säuredissoziationskonstante
PMTs - Phosphaturischer mesenchymaler Tumor
ppp – Triphosphatbrücke
PRR – Mustererkennungszepptoren/Pattern Recognition Receptor
pSS - Primäres Sjögren-Syndrom
PTC - Papillärer Schilddrüsenkarzinom
RA - rheumatoide Arthritis
RLR - Retinoic-acid-inducible gene I like receptors
RNA - Ribonukleinsäure
Rp – ribosomales Protein
RPB - RNA-bindendes Protein
rRNA - Ribosomale RNA
SAM - selbst-amplifizierende mRNA-Impfstoffe
SARS-CoV - Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus
s.c. - subcutan
Ser-51 – Serinrest
SHP - Small Heterodimer Partner
SNP - Single Nucleotide Polymorphism
SLE - systematischer Lupus erythematoses
SLP - synthetisches langes Peptid
sn-RNA – small nuclear RNA
SRP – Signalerkennungspartikel
ssRNA - einzelsträngige RNA
STING - Stimulator of Interferon Genes
T – Thymin
T1D - Typ-1-Diabetes
TAA - tumorassoziiertes Antigen
TC - ternärer Komplex
Th - T-Helferzellen
TLR – Toll-like-Rezeptor
TNBC - Tripple negative breast cancer
TNF α - Tumornekrosefaktor- α
TISU – Translationsinitiator der kurzen 5'UTR
TPM - Transcripts Per Kilobase Million

tRNA – Transfer-RNA

U – Uracil

UBC - Urothelialer Blasenkrebs

UMP - Uridinmonophosphat

UTR - untranslatierte Regionen/untranslated Regions

VCE - Vaccinia virus Capping Enzyme

VRP - virale Replikationspartikel

WT- Wildtyp

ZNS - Zentralnervensystem

Abbildungsverzeichnis

| | |
|--|----|
| Abbildung 1: Aufbau eines Nukleotids. | 2 |
| Abbildung 2: Bindung der DNA-Basen. | 3 |
| Abbildung 3: Aufbau der DNA-Doppelhelix. | 3 |
| Abbildung 4: Entstehung des mRNA-Stranges. | 5 |
| Abbildung 5: Bildung der reifen mRNA durch Splicing..... | 6 |
| Abbildung 6: Bildung des Transkriptions-Initiationskomplexes..... | 7 |
| Abbildung 7: Beginn der Translation. | 8 |
| Abbildung 8: Elongation der Translation. | 9 |
| Abbildung 9: Termination der Translation. | 10 |
| Abbildung 10: Verknüpfung der Aminosäure mit der tRNA..... | 11 |
| Abbildung 11: Fördernde und hemmende mRNA-Sequenzen..... | 12 |
| Abbildung 12: Transport des Proteins zum ER. | 14 |
| Abbildung 13: Grobe Darstellung der Translationsinitiation. | 16 |
| Abbildung 14: PIC während der AUG-Erkennung..... | 19 |
| Abbildung 15: Auslösung der Immunantwort durch die mRNA..... | 27 |
| Abbildung 16: Aufbau eines LNP..... | 32 |
| Abbildung 17: Gewebsverteilung der überexprimierten proteincodierenden Gene..... | 48 |
| Abbildung 18: Expressionsprofil des GIP-Genes in normalem Gewebe und Krebsgewebe inklusive Kaplan-Meier-Plots von unterschiedlichen Krebsarten. | 49 |
| Abbildung 19: Expressionsprofil des F9-Genes in normalem Gewebe und Krebsgewebe inklusive Kaplan-Meier-Plots von unterschiedlichen Krebsarten. | 51 |
| Abbildung 20: Expressionsprofil des IL21-Genes in normalem Gewebe und Krebsgewebe inklusive Kaplan-Meier-Plots von unterschiedlichen Krebsarten. | 53 |
| Abbildung 21: Expressionsprofil des LCT-Genes in normalem Gewebe und Krebsgewebe inklusive Kaplan-Meier-Plots von unterschiedlichen Krebsarten. | 56 |
| Abbildung 22: Expressionsprofil des ZAN-Genes in normalem Gewebe und Krebsgewebe inklusive Kaplan-Meier-Plots von unterschiedlichen Krebsarten. | 58 |
| Abbildung 23: Expressionsprofil des CCR3-Genes in normalem Gewebe und Krebsgewebe inklusive Kaplan-Meier-Plots von unterschiedlichen Krebsarten. | 60 |
| Abbildung 24: Expressionsprofil des CYP7A1-Genes in normalem Gewebe und Krebsgewebe inklusive Kaplan-Meier-Plots von unterschiedlichen Krebsarten. | 63 |

| | |
|---|----|
| Abbildung 25: Expressionsprofil des MYF5-Genes in normalem Gewebe und Krebsgewebe inklusive Kaplan-Meier-Plots von unterschiedlichen Krebsarten. | 65 |
| Abbildung 26: Expressionsprofil des DMP1-Genes in normalem Gewebe und Krebsgewebe inklusive Kaplan-Meier-Plots von unterschiedlichen Krebsarten. | 67 |
| Abbildung 27: Expressionsprofil des SLCO1B1-Genes in normalem Gewebe und Krebsgewebe inklusive Kaplan-Meier-Plots von unterschiedlichen Krebsarten. | 70 |
| Abbildung 28: Expressionsprofil des FGF4-Genes in normalem Gewebe und Krebsgewebe inklusive Kaplan-Meier-Plots von unterschiedlichen Krebsarten. | 72 |
| Abbildung 29: Expressionsprofil des PDCL2-Genes in normalem Gewebe und Krebsgewebe inklusive Kaplan-Meier-Plots von unterschiedlichen Krebsarten. | 75 |
| Abbildung 30: Expressionsprofil des MBL2-Genes in normalem Gewebe und Krebsgewebe inklusive Kaplan-Meier-Plots von unterschiedlichen Krebsarten. | 77 |
| Abbildung 31: Expressionsprofil des DMRT1-Genes in normalem Gewebe und Krebsgewebe inklusive Kaplan-Meier-Plots von unterschiedlichen Krebsarten. | 79 |
| Abbildung 32: Expressionsprofil des MAGEA3-Genes in normalem Gewebe und Krebsgewebe inklusive Kaplan-Meier-Plots von unterschiedlichen Krebsarten. | 81 |

Tabellenverzeichnis

| | |
|---|-----|
| Tabelle 1. Anzahl der exkludierten Gentypen geordnet nach deren Genfunktion..... | 45 |
| Tabelle 2. Übersicht über alle Gene, die gefunden wurden und deren biologische Funktion..... | 46 |
| Tabelle 3. Tabellarische Zusammenfassung der untersuchten Gene..... | 85 |
| STabelle 1. Unterschiedliche GetEx Bezeichnungen und deren anatomisches Korrelat... | 126 |
| STabelle 2. Krebsarten in der Datenbank von proteinatlas.org..... | 127 |
| STabelle 3. Unterschiedliche Krebsarten, die in Kmplot gelistet sind und deren biologisch deutsche Bezeichnung..... | 127 |

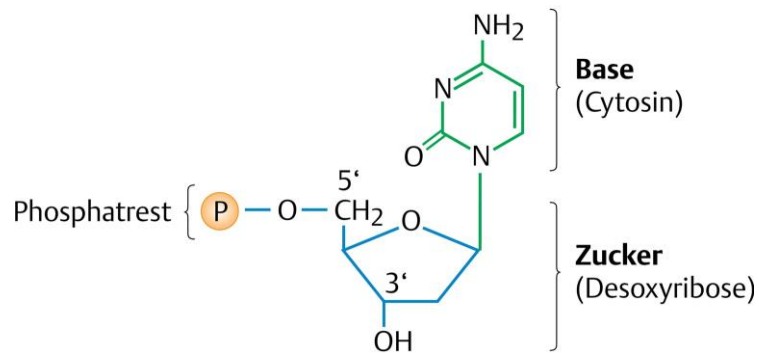
1. Einleitung

Bei dieser Diplomarbeit wird die aktuelle Entwicklung rund um die Technologie der mRNA-Impfstoffe dargestellt. Es wird darauf eingegangen, wie der Impfstoff designed, wie er in die Zelle gelangt und wie das Immunsystem auf ihn reagiert. Dann werden Proteine aus Datenbanken analysiert und deren Affinität zu unterschiedlichen Geweben untersucht. Diese Proteine stellen mögliche Angriffspunkte für mRNA-Impfstoffe dar und daraus können dann auch die Nebenwirkungen und Limitationen abgeleitet werden. Doch bevor man sich mit der mRNA-Impfstofftechnologie auseinandersetzt, sollte man sich mit den Grundlagen beschäftigen. Aus diesem Grund wird bei dieser Diplomarbeit das menschliche Erbgut und die Proteinbiosynthese erläutert. Erst dann erfolgt die Ausführung über die Funktionsweise von mRNA-Impfstoffen.

2. Das menschliche Erbgut

Die Desoxyribonukleinsäure (DNA) ist der Träger des menschlichen Erbguts. Die Ribonukleinsäure spielt eine wichtige Rolle bei der Proteinbiosynthese. Die DNA ist aus einem Doppelstrang aufgebaut und enthält folgende Komponenten:

- 1) Purin- oder Pyrimidinbase
- 2) Zuckermolekül 2' Desoxyribose
- 3) Phosphatrest (1-3)



Zucker + Base = Nukleosid

Nukleosid + Phosphat = Nukleotid

Abbildung 1: Aufbau eines Nukleotids.

(1) Murken, Jan; Grimm, Tiemo; Holinski-Feder, Elke; Zerres K. Taschenlehrbuch Humangenetik. 9th ed. Thieme; 2017

Das Zuckermolekül ist über das C₁-Atom über eine Stickstoffverbindung mit der Base verbunden. Das C₅ des Zuckermoleküls ist mit Phosphorsäure über eine OH-Gruppe verestert. Diese Phosphatgruppe ist mit dem C₃-Atom des anderen Zuckermoleküls verbunden. (1–3)

Das Zuckermolekül in Kombination mit einer Base wird als Nukleosid bezeichnet. Ein Nukleosid mit der Phosphatgruppe wird als Nukleotid bezeichnet. Über die C₃-C₅-Phosphorsäurediesterbindungen sind Nukleotide zu einem Strang verknüpft. Diese beiden Stränge sind antiparallel zueinander ausgerichtet und bilden eine alpha-Doppelhelix. (1–3) Die Enden der Stränge haben ein 3'-Ende, bei der die OH-Gruppe des C₃ nicht verestert ist und ein 5'-Ende, bei der die Phosphorsäuregruppe am C₅ nicht verestert ist. Die Stränge sind komplementär über Basen miteinander verbunden. (1–3) Das Adenin eines Stranges ist über zwei Wasserstoffbrückenbindungen mit dem Thymin des anderen Stranges verbunden. Cytosin ist über drei Wasserstoffbrückenbindungen mit dem Guanin des anderen Stranges verbunden. (1–3)

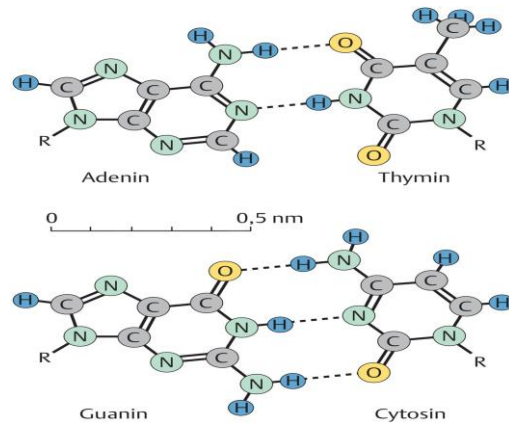


Abbildung 2: Bindung der DNA-Basen.

(1) Murken, Jan; Grimm, Tiemo; Holinski-Feder, Elke; Zerres K. Taschenlehrbuch Humangenetik. 9th ed. Thieme; 2017.

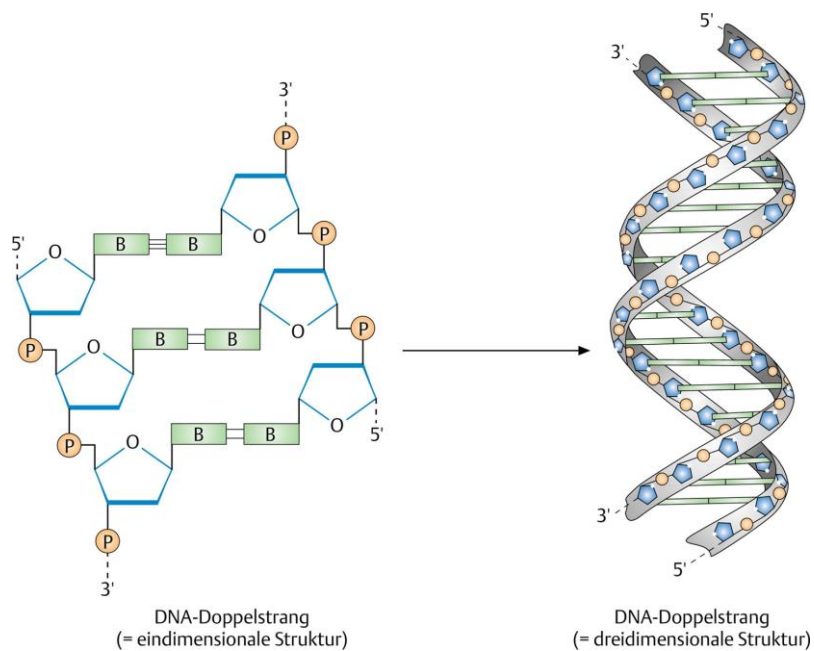


Abbildung 3: Aufbau der DNA-Doppelhelix.

(1) Murken, Jan; Grimm, Tiemo; Holinski-Feder, Elke; Zerres K. Taschenlehrbuch Humangenetik. 9th ed. Thieme; 2017.

Die RNA (Ribonukleinsäure) hat im Gegensatz zur DNA, Ribose als Zuckermolekül und ist – im Gegensatz zur DNA – einzelsträngig. In seltenen Fällen weist auch sie intrahelikale Strukturen auf. Statt Thymin enthält die RNA die Base Uracil. (1–4) Man unterscheidet dabei unterschiedliche RNA-Formen.

- a) Die Messenger-RNA (mRNA) dient als Boten-RNA während der Transkription der Proteinbiosynthese.
 - b) Ribosomale RNA (rRNA) ist am Aufbau von Ribosomen beteiligt.
 - c) Transfer-RNA (tRNA) ist an der Translation der Proteinbiosynthese beteiligt. Sie transportiert die Aminosäuren zu den Ribosomen.
 - d) Die small nuclear RNA entfernt Introns (nicht codierte Abschnitte der DNA).
 - e) Die small nucleolar RNA steuern Basenmodifikationen
 - f) Die Antisense-RNA kann die Translation verhindern, indem sie die mRNA blockieren.
- (1–3)

Die DNA befindet sich im Zellkern der menschlichen Zellen und zwar kondensiert in Form von Chromosomen. Die Abfolge der Basen macht dabei den genetischen Code aus. Drei Nukleotide kodieren für eine Aminosäure. (1–3) Es gibt zwar 21 Aminosäuren, jedoch gibt es mehr Kodierungsmöglichkeiten. (1–3) Eine Aminosäure kann also durch mehrere Basenabfolgen kodiert werden. Die Gene können jedoch auch nicht kodierte Abschnitte (Introns) und kodierte Abschnitte (Exons) enthalten. Die Introns werden nach der Transkription aus der DNA durch Splicing entfernt. (1–3)

3. Proteinbiosynthese

Die Proteinbiosynthese spielt eine wichtige Rolle in der Technologie der mRNA-Impfstoffe. Aus diesem Grund wird die Proteinbiosynthese in diesem Teil erläutert, damit die Wirkungsweise der mRNA-Impfstoffe besser nachvollziehbar ist.

Die beiden Hauptprozesse der Proteinbiosynthese sind Transkription und Translation. Das Ergebnis dieses Prozesses ist dann ein fertiges Protein, welches aus der DNA und dann später der mRNA abgelesen wurde.

3.1. Transkription

Die Transkription findet im Zellkern statt. Dort werden rRNA, tRNA und mRNA synthetisiert. Es wird eine RNA synthetisiert, indem die DNA an einem Strang abgelesen und ein neuer Anti-Sense-RNA-Strang synthetisiert wird. (1–3) Die Transkription der

RNAs erfolgt dabei durch die Enzyme der Polymerase Familie. Polymerase I transkribiert rRNA, Polymerase II die mRNA und Polymerase III die tRNA. (1–3)

Die Transkription beginnt damit, dass Transkriptionsfaktoren an die Promotorregion der DNA binden. Der Promotor ist dabei eine spezifische Nukleotidabfolge, an dem die Transkription beginnt. (1–3) Die Promotorregion enthält dabei eine sogenannte „TATA-Box“. (1–3) An diese binden die Transkriptionsfaktoren und die RNA-Polymerase und diese bilden einen „Transkriptions-Initiationskomplex“. (1,3) Danach wird die RNA-Polymerase phosphoryliert, wodurch diese aus dem Transkriptions-Initiationskomplex freigesetzt wird. Reguliert wird die Transkription dabei durch genregulatorische Sequenzen. (1,3)

Durch Schleifenbildung kommen sie über ein Genregulatorprotein mit dem Promotor in Berührung. Unter diesen Sequenzen gibt es Enhancer, welche die RNA-Polymerase verstärken und Silencer, welche die RNA-Polymerase abschwächen. (1,3) Gene können auch durch Methylierung reguliert werden. Dabei werden Cytosinreste methyliert. Das Gen hinter der methylierten Region wird dadurch seltener abgelesen. Auf diese Weise können nicht mehr benutzte Gene permanent inaktiviert werden. (1,3)

Die RNA-Synthese beginnt dabei 25 Nukleotide stromabwärts von der TATA-Box.

Am sogenannten codogenen Strang erfolgt das Ablesen der DNA. Dies erfolgt vom 3′-Ende zum 5′-Ende. Dadurch wird der RNA-Strang in 5′-3′-Richtung synthetisiert. (1–3) Der RNA-Strang enthält dann die komplementären Basen des codogenen DNA-Stranges. Adenin, Cytosin, Guanin und Thymin des DNA-Stranges werden entsprechend an der RNA zu Uracil, Guanin, Cytosin und Adenin transkribiert. (1–3)

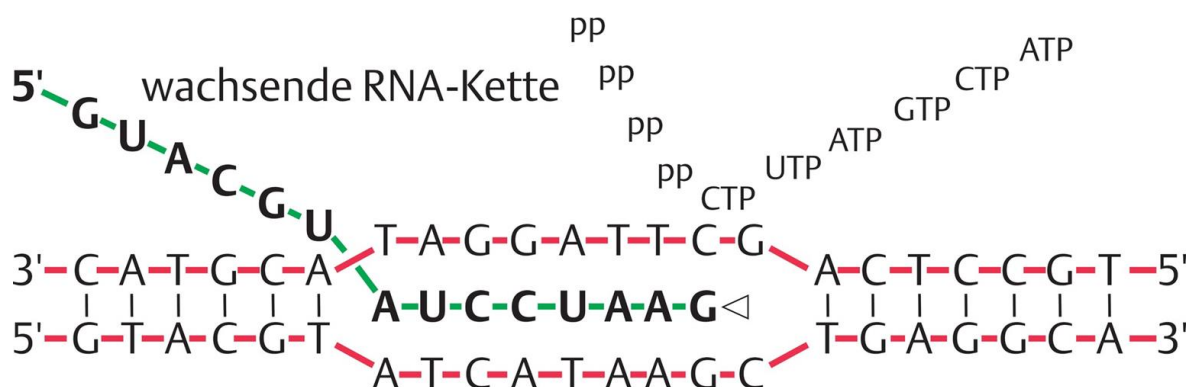


Abbildung 4: Entstehung des mRNA-Stranges.

(3) Nordheim, Alfred; Knippers R. Molekulare Genetik. 11th ed. Thieme; 2018.

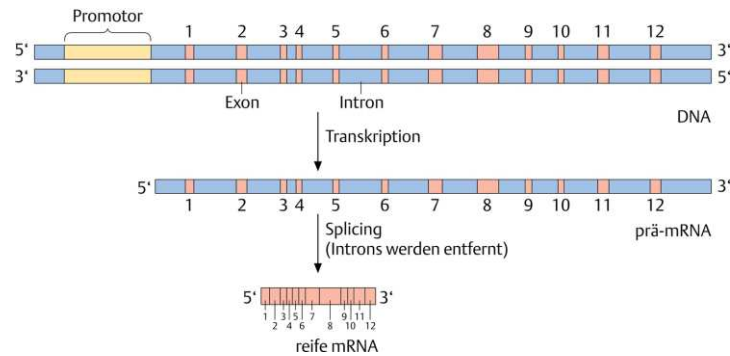


Abbildung 5: Bildung der reifen mRNA durch Splicing

(1) Murken, Jan; Grimm, Tiemo; Holinski-Feder, Elke; Zerres K. Taschenlehrbuch Humangenetik. 9th ed. Thieme; 2017.

Wie bereits erwähnt enthält die RNA Uracil statt Thymin, weswegen Adenin zu Uracil transkribiert wird. Nach Passieren des „Polyadenylierungssignals“ endet die Transkription. (1–3) Die gerade erwähnten Prozesse spielen in allen RNAs ab. Die nachfolgenden Prozesse betreffen die mRNA.

An die mRNA wird eine sogenannte „CAP-Struktur“ angehängt. (1,3) Diese schützt die mRNA vor enzymatischem Abbau der 5′-3′-Exonukleasen und ermöglicht die Bindung an das 80s-Ribosom während der Translation. (1,3) Am 3′-Ende wird dann eine Polyadenylierung vollzogen. Die Poly-A-Polymerase erkennt die Signalsequenz AAUAAA und verlängert diese. Es entsteht ein Poly-A-Schwanz. Dieser verleiht der mRNA Stabilität und längere Halbwertszeit, indem es die mRNA vor enzymatischem Abbau der Ribonukleasen schützt. (1,3–5) Die entstandene mRNA ist allerdings noch unreif, womit es sich hierbei also um eine prä-mRNA handelt. (1,3)

Im nächsten Schritt erfolgt das Splicing, wo aus der unreifen prä-mRNA die mRNA entsteht. In diesem Schritt werden die Introns durch Spliceosome herausgeschnitten und Exons miteinander verknüpft. Bei den Spliceosomen handelt es sich dabei um einen Komplex aus sn-RNA und Proteinen. (1,3)

„Alternatives Splicing“ kommt jedoch auch vor. D.h. Introns müssen nicht zwangsweise herausgeschnitten werden bzw. Exons können auch entfernt werden. Dadurch ist es möglich aus einem Gen unterschiedliche Genprodukte zu translatieren. (1,3)

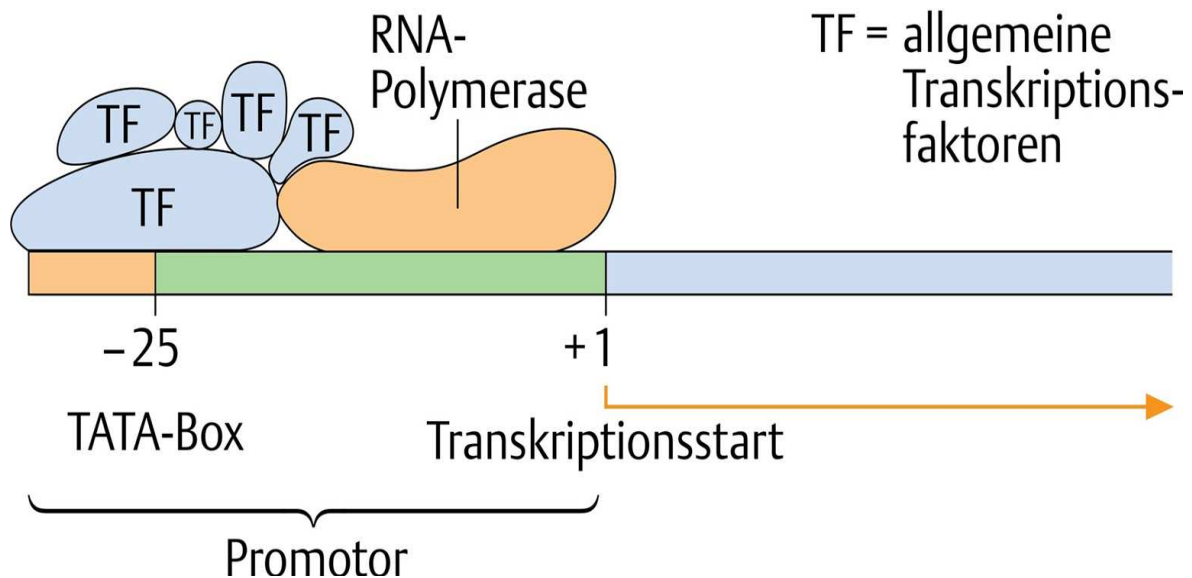


Abbildung 6: Bildung des Transkriptions-Initiationskomplexes.

(1) Murken, Jan; Grimm, Tiemo; Holinski-Feder, Elke; Zerres K. Taschenlehrbuch Humangenetik. 9th ed. Thieme; 2017.

3.2. Translation

Die Translation findet an den Ribosomen statt. Sie besteht aus Initiation, Elongation und Termination. Das Ribosom enthält eine große und eine kleine Untereinheit. An der kleinen Untereinheit befinden sich der Akzeptor-, Peptidyl- und Exitbereich. (1–3)

Bei der Initiation entsteht zunächst der Initiationskomplex aus der mRNA, tRNA und der kleinen Untereinheit des Ribosoms. Die kleine Untereinheit erkennt die CAP-Struktur der mRNA. (1,3) Danach erkennt die kleine Untereinheit die Startsequenz (AUG). Diese Sequenz befindet sich nun an dem P-Bereich der kleinen Untereinheit (Peptidylbereich) des Ribosoms. Danach bindet die tRNA mit den komplementären Basen (UAC) an die AUG-Sequenz der mRNA, wo sich am anderen Ende die dazu passende Aminosäure befindet, womit der Initiationskomplex nun vollständig ist. An diesen bindet dann die große Untereinheit des Ribosoms. (1,3)

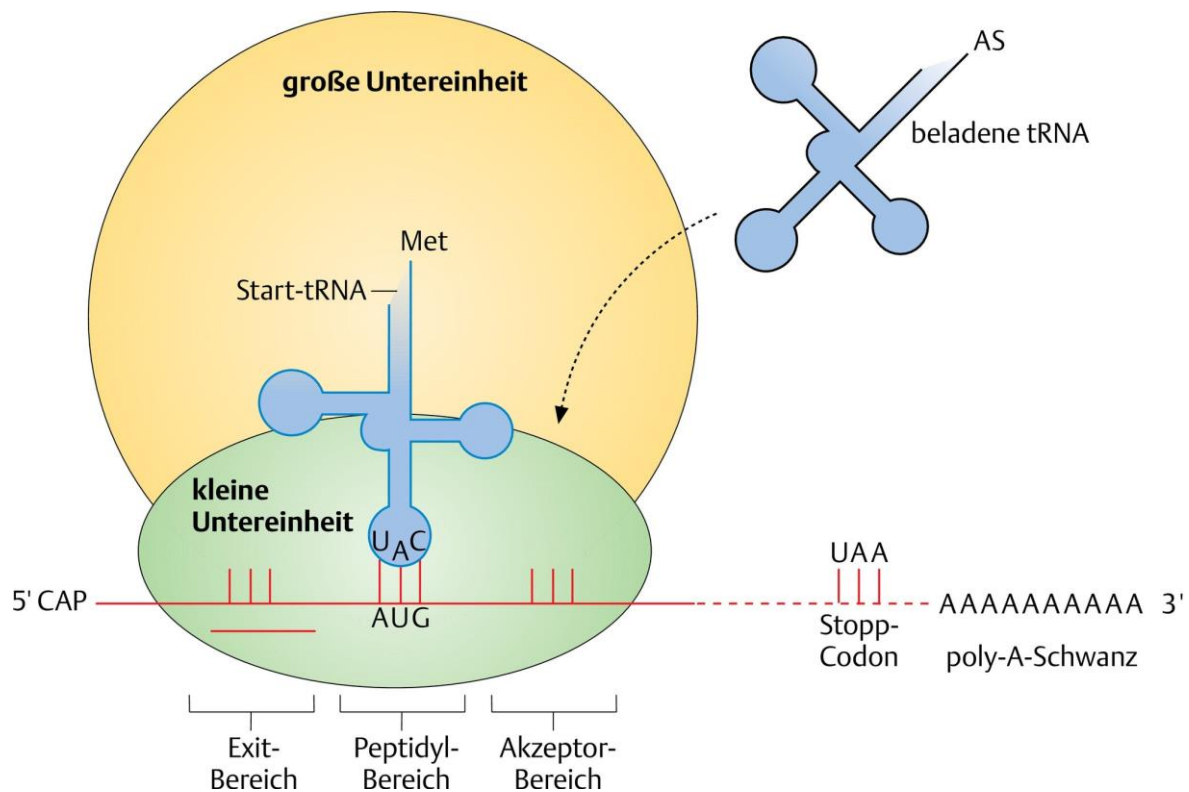


Abbildung 7: Beginn der Translation.

(1) Murken, Jan; Grimm, Tiemo; Holinski-Feder, Elke; Zerres K. Taschenlehrbuch Humangenetik. 9th ed. Thieme; 2017.

Bei der Elongation wird die mRNA weiter in 5'-3'-Richtung abgelesen und hierbei werden drei Basen in Form von Triplets abgelesen. Die nächste tRNA bindet mit ihren komplementären Basen an den A-Bereich (Akzeptor) des Ribosoms, wo sich an ihrem Ende die passende Aminosäure befindet. (1-3) Die Aminosäuren aus dem A- und P-Bereich werden durch die Peptidyltransferase miteinander verknüpft. (1,3) Die tRNA am P-Bereich verlässt nun das Ribosom über den E-Bereich und das Ribosom verlagert sich um ein Triplet weiter. Die tRNA im A-Bereich verlagert sich nun in den P-Bereich. Der A-Bereich ist nun wieder frei. An diesen bindet wieder eine neue tRNA mit komplementären Basen und der dazu passenden Aminosäure am anderen Ende. Die neue Aminosäure wird dann mit den restlichen verknüpft und diese Prozedur setzt sich dann genauso weiter fort. (1-3)

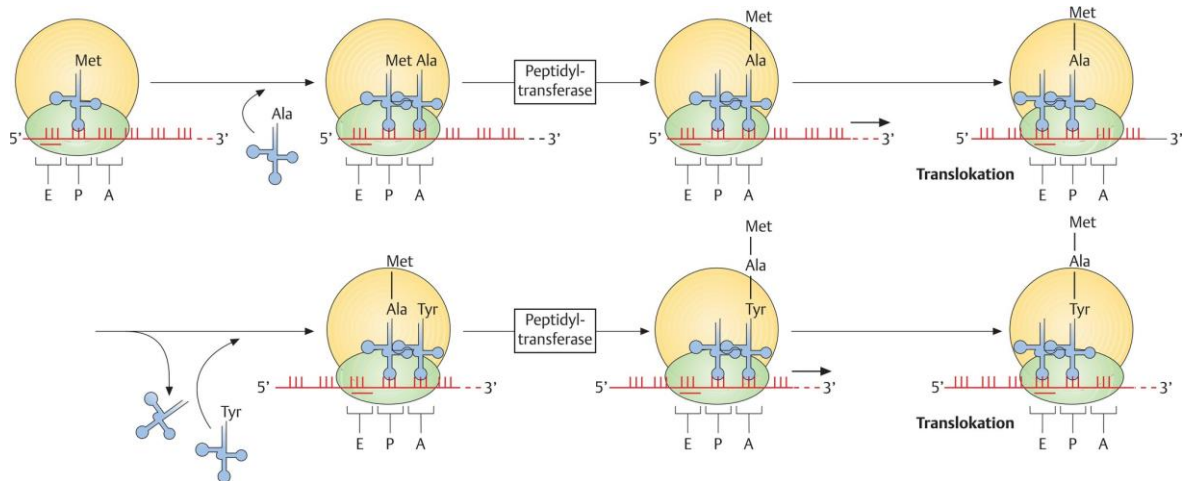


Abbildung 8: Elongation der Translation.

(1) Murken, Jan; Grimm, Tiemo; Holinski-Feder, Elke; Zerres K. Taschenlehrbuch Humangenetik. 9th ed. Thieme; 2017.

Bei der Termination erreicht das Ribosom ein Stopp-Codon. Für diese Sequenz gibt es keine passenden tRNA-Moleküle und folglich bleibt der A-Bereich leer. Die Peptidyltransferase wird dann durch Release-Faktoren blockiert, wodurch dann schließlich das Ribosom zerfällt und das Protein freigesetzt wird. (1–3)

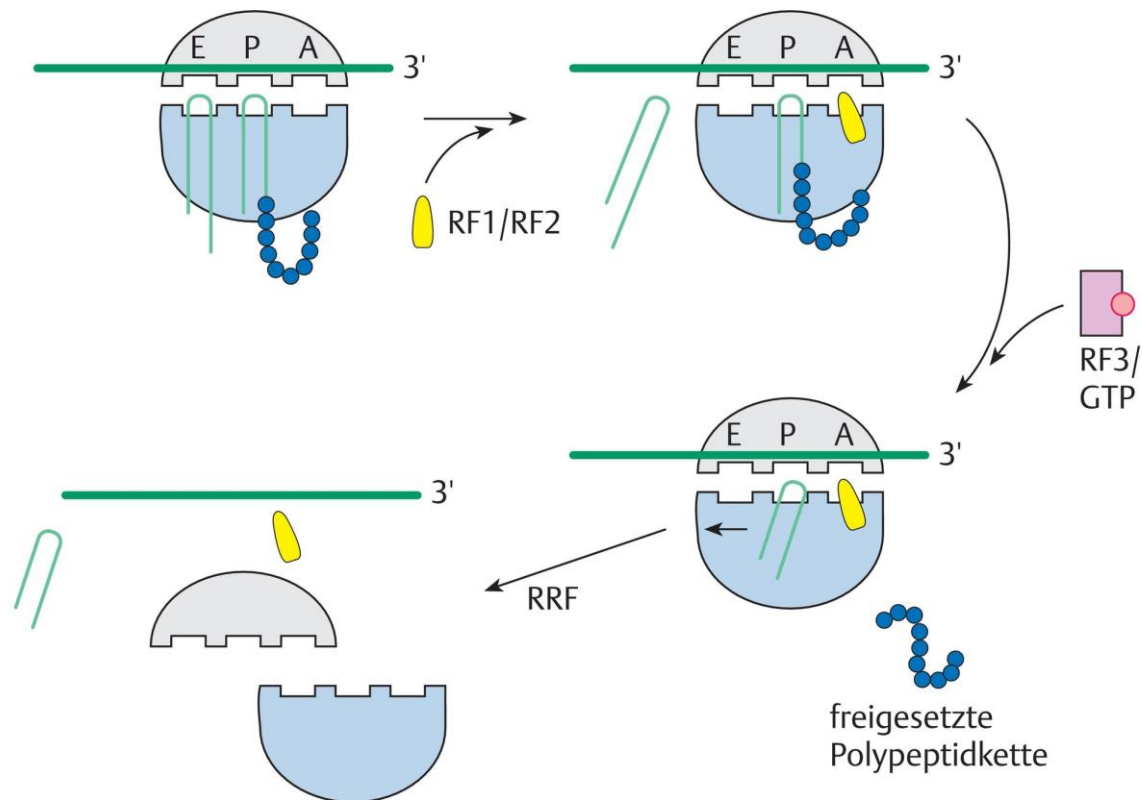


Abbildung 9: Termination der Translation.

(3) Nordheim, Alfred; Knippers R. Molekulare Genetik. 11th ed. Thieme; 2018.

Damit die tRNA die richtige Aminosäure transportiert, muss sie erst mit der richtigen Aminosäure beladen werden, wofür die Aminoacyl-tRNA-Synthetasen zuständig sind. Sie weisen zwei Bindungsstellen auf: An die eine lagert sich die tRNA an und an die andere die Aminosäure. (1,3) Die Carbonsäuregruppe der Aminosäure wird dann mit der OH-Gruppe der Ribose aus der tRNA verestert. Die freiwerdende Energie wird dann für die Peptidbindung genutzt. Die Aminoacyl-tRNA-Synthetasen ist dabei spezifisch für eine Aminosäure, wobei sie jedoch spezifisch für mehrere tRNAs sein kann. (1,3)

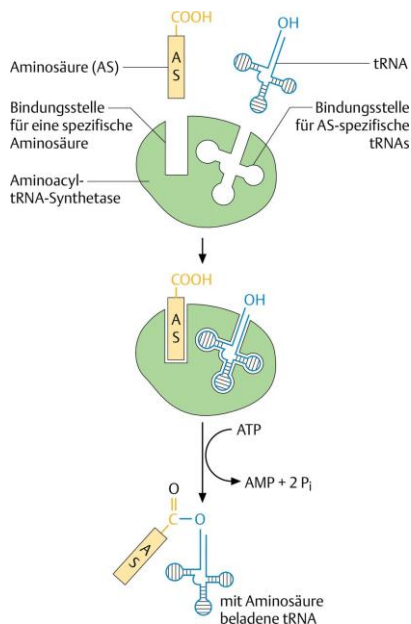


Abbildung 10: Verknüpfung der Aminosäure mit der tRNA.

(1) Murken, Jan; Grimm, Tiemo; Holinski-Feder, Elke; Zerres K. Taschenlehrbuch Humangenetik. 9th ed. Thieme; 2017.

3.3. Regulation der Translation

Die Translation kann reguliert werden, indem der Transport der mRNA aus dem Zellkern in das Zytoplasma kontrolliert wird, da die Translation nur stattfinden kann, wenn die mRNA den Zellkern verlässt. (1,3) Auch die Ribosomenanzahl spielt dabei eine wichtige Rolle. Denn je mehr Ribosomen an der mRNA andocken, desto mehr Proteine können synthetisiert werden. (1,3) Die Lokalisation der mRNA kann ebenfalls einen Einfluss darauf haben, dass die Proteine an einer bestimmten Stelle im Zytoplasma entstehen. Bestandteile des Zytoskeletts steuern dabei den Transport der mRNA aus dem Zellkern und fixieren diese am Zielpunkt des Zytoplasmas. (1,3)

Weiters gibt es „Untranslatierte Regionen“ (UTRs/Untranslated Regions). Es handelt sich dabei um regulatorische Sequenzen am 3'- und 5'-Ende. (1,3,5,6)

In 5'-UTR befinden sich kurze ORFs. (Open Reading Frame). Ein ORF ist ein Bereich zwischen dem Start- und Stoppcodon. Durch diese kurzen ORFs kann die Translation zwar

beginnen, jedoch endet sie vorzeitig. (1,3,5,6) Am 5'-UTR entstehen auch stabile Sekundärstrukturen, die als „Stem-Loops“ bezeichnet werden. (1,3) An diesen Stem-Loops können regulatorische Proteine binden und die Translation somit blockieren. Am 5'-UTR befinden sich sogenannte IRES (Internal Ribosome Entry Sites) in der Nähe des Startcodons. (1,3) Diese ermöglichen den Translationsstart unabhängig von der CAP-Struktur. Am 3'-UTR befindet ein sogenanntes zytoplasmatisches Polyadenylierungselement, über welches spezifische Proteine binden können und es zu einer Adenylierung kommt. (1,3) Dies verleiht der mRNA Stabilität, wodurch die Translation ausgelöst wird. Am 3'-UTR gibt es ebenfalls Stem-loops, an welchen auch Proteine binden können, was dann in weiterer Folge zu einer Stabilisierung der mRNA führt und diese vor Abbau geschützt wird. (1,3)

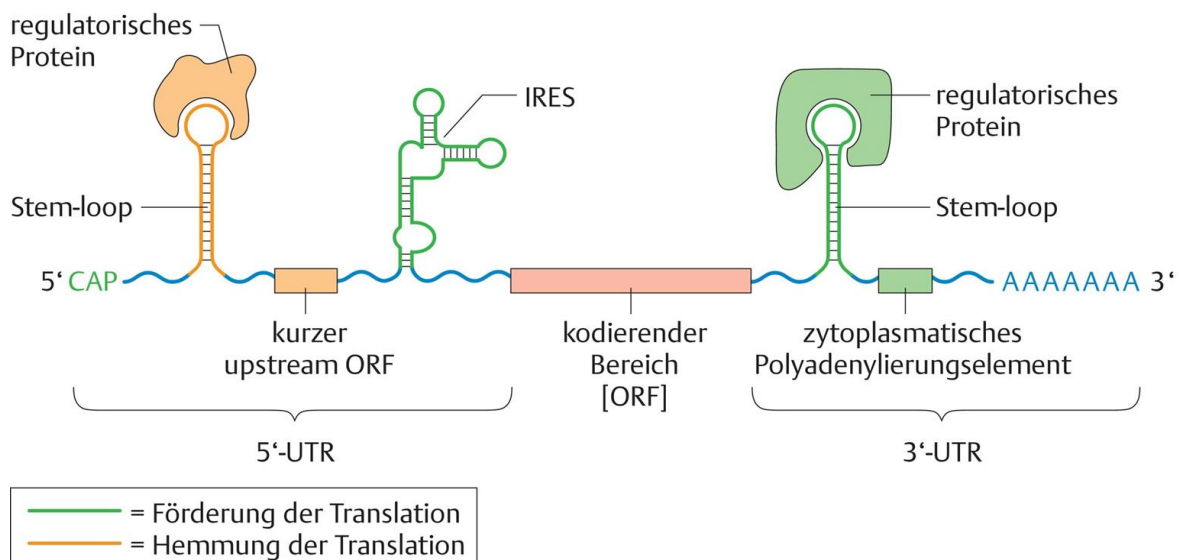


Abbildung 11: Fördernde und hemmende mRNA-Sequenzen.

(1)Murken, Jan; Grimm,Tiemo; Holinski-Feder, Elke; Zerres K. Taschenlehrbuch Humangenetik. 9th ed. Thieme; 2017.

3.4. Modifikation von Proteinen

Viele Proteine sind nach der Translation noch nicht funktionsfähig. Sie werden mit funktionellen Gruppen verknüpft, wodurch sie erst zu reifen Proteinen reifen.

Es kommt dabei zu: (1,3,4)

- Acetylierung/Methylierung: Methyltransferasen hängen Acetyl/Methylgruppen an die Aminosäure Arginin. Dieser Prozess kommt z.B. oft bei Histonen vor. Es handelt sich

dabei um Proteine, die für die „Verpackung“ der DNA und die Expression mancher Gene zuständig sind. Je nach Lage der Acetyl/Methylgruppen entsteht ein Signal für das An- oder Abschalten eines Gens. (1,3)

- Phosphorylierung: Proteine werden durch die Proteinkinase an Serin-, Threonin- oder Tyrosinresten des Proteins phosphoryliert, wodurch am Protein ein neuer Funktionszustand entsteht. (1,3)

- Acylierung: Es werden Fettsäuren an das Protein verknüpft, wodurch ein Lipoprotein entsteht, womit sie dann als Membrananker fungieren.

- Adenylierung/Uridylierung: Es kommt zur Addition von AMP und UMP. Dadurch wird die Aktivität der Proteine reguliert.

- Hydroxylierung: OH-Gruppen werden an Prolin- und Lysinreste angehängt.

- Jodierung: An Schilddrüsenhormone wird Jod an Tyrosin gebunden, wodurch die Schilddrüsenhormone erst aktiv werden.

- Sulfatierung: Es werden Sulfatgruppen an Tyrosin angehängt, wodurch schwefelhaltige Glykoproteine und Proteoglykane hergestellt werden können. (1,3)

3.5. Transport von Proteinen

Manche gebildete Proteine verbleiben in der Zelle und andere werden aus der Zelle transportiert. Das sind z.B. Membranproteine oder Proteine für Lysosomen. Diese Proteine müssen aber vorher an den Ribosomen des endoplasmatischen Retikulums (ER) gebildet werden. Der Transport in der Zelle wird dabei von Signalsequenzen gesteuert.

Das Protein besitzt eine Signalpeptidsequenz, woran ein Signalerkennungspartikel (SRP) bindet, wodurch die Translation vorerst gestoppt wird. (1,3) Die SRP binden dann an den SRP-Rezeptor, welcher sich in der Membran des ER befindet. Das gebildete Protein gelangt dann in das Lumen des ER und das SRP löst sich ab. Schließlich wird die Signalsequenz von der Signalpeptidase abgespalten. (1,3)

Im ER können Proteine auch in die Membran eingelagert werden, wo es auch zur Glykosylierung kommt. Bei der N-Glykosylierung wird ein aus 14 Zuckermolekülen bestehender „Kohlenhydratbaum“ an die Asparginseitenkette des Proteins angefügt. (1,3) Das Protein kann evtl. noch weiter glykosyliert werden. Die O-Glykosylierung erfolgt dann im Golgi-Apparat und schließlich können auch Disulfidbrücken zwischen Cysteinseitenketten gebildet werden. (1,3)

Eine weitere wichtige Funktion ist die Faltung der Proteine, welche die Chaperonen durchführen. Sie unterstützen energetisch günstigere Faltungswege, wodurch eine Tertiärstruktur am Protein entsteht. (1,3)

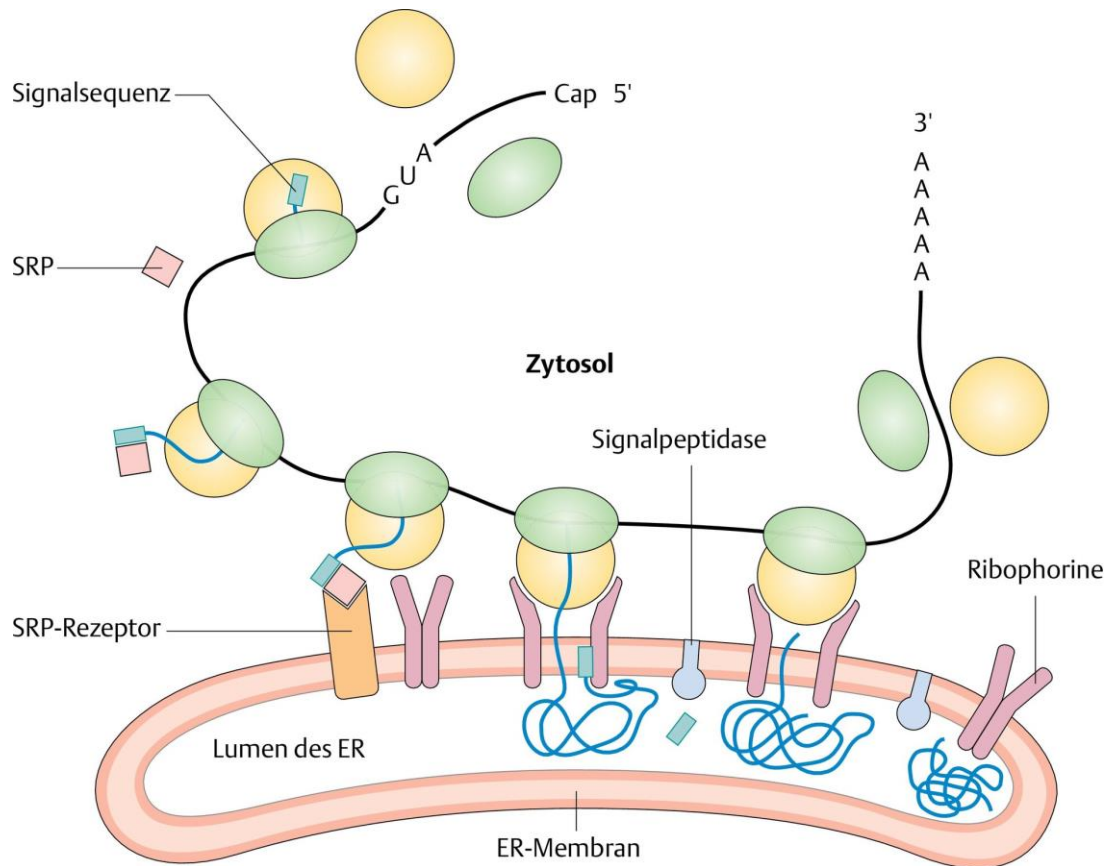


Abbildung 12: Transport des Proteins zum ER

(1) Murken, Jan; Grimm, Tiemo; Holinski-Feder, Elke; Zerres K. Taschenlehrbuch Humangenetik. 9th ed. Thieme; 2017.

3.6. Initiierung der Proteinbiosynthese

Es gibt jedoch auch einen 7G-Cap-abhängigen Weg der Initiierung der Proteinbiosynthese. Daran sind 80S-Ribosom mit einer Boten-RNA (mRNA) und einer Initiator-Methionyl-Transfer-RNA (Met-tRNA_i) beteiligt. Mindestens 12 spezielle Proteine, die so genannten eukaryotischen Initiationsfaktoren (eIFs), regulieren diesen Prozess. (3,6)

Dieser Prozess besteht dabei aus folgenden Schritten:

1. Aktivierung von eIF2 durch eIF2B. Es entsteht dabei ein ternärer Komplex (TC) aus eIF2-GTP und Met-tRNA_i, was die Initiierung der Translation ermöglicht.

2. mRNA-Rekrutierung und Scanning. Es erfolgt eine Bindung von eIF4F an die m7G-Kappe der mRNA. Danach wird 43S-PIC entlang der mRNA gescannt.
3. AUG-Erkennung: Nach dem Scannen erkennt PIC das AUG-Codon. Es kommt dann zu Konformationsänderungen im PIC und der Bildung des 80S-Ribosoms.
4. eIF2-GTP-Hydrolyse: eIF2-GDP wird aus dem 48S-Komplex freigesetzt.
5. Verbindung der 60S-Untereinheiten: 60S-Untereinheit wird mit dem 48S-Komplex verbunden. Es entsteht das 80S-Ribosom und dadurch beginnt die Elongationsphase der Translation. (1,3,6)

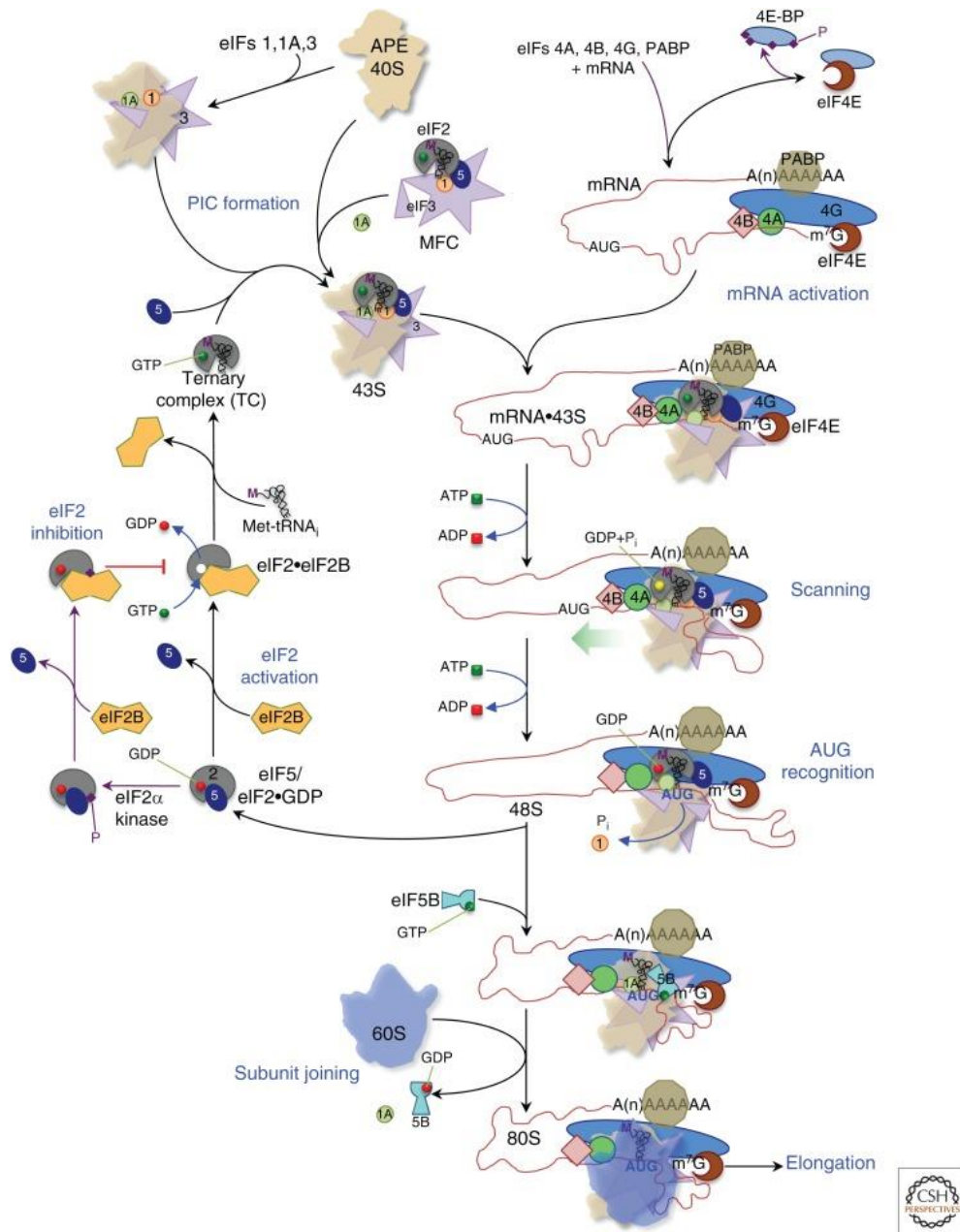


Abbildung 13: Grobe Darstellung der Translationsinitiation.

(6) Merrick WC, Pavitt GD. Protein Synthesis Initiation in Eukaryotic Cells. Cold Spring Harb Perspect Biol [Internet].

3.6.1. mRNA-Rekrutierung und Scanning

Bei der mRNA-Rekrutierung spielen eIF4A, eIF4B, eIF4E und eIF4G eine wichtige Rolle. eIF4E ist dabei für die m7G-Kappenerkennung zuständig. (6) eIF4E-bindende Proteine (4E-BPs) begrenzen dabei den Zugang zu eIF4E zu eIF4G. 4E-BPs binden dabei an eIF4E

durch Phosphorylierung, wodurch sich die Struktur des Bindungsproteins verändert, so dass es eIF4E nicht mehr binden kann. Ohne die Bindung von 4E-BP kommt es dann zu einer Interaktion zwischen eIF4E und eIF4G. Dabei erhöht eIF4G die Affinität von eIF4E für die m7G-Kappe. (6)

An eIF4G können viele Translationsfaktoren und mRNA binden. Außerdem kann es den eIF4F/mRNA/PABP-Komplex auch über eIF3 mit dem 43S-PIC verbinden. (6)

Dann ist noch eIF4A zu erwähnen. Zu den charakteristischen Aktivitäten von eIF4A gehören: ATP-abhängige Retention von RNA auf Nitrocellulose-Filtern und die RNA-abhängige ATP-Hydrolyse. Der eIF4F-Komplex kann auch diese Aufgaben erfüllen, wobei seine Aktivität jedoch höher ist. Durch diese Aktivierungssteigerung steigt die Bindungsfähigkeit und die Effizienz. eIF4B steigert dabei die Aktivität von eIF4A und eIF4F. (6)

Damit ein RNA-Einzelstrang in den mRNA-Kanal auf dem 43S-PIC geladen werden kann, muss die Sekundärstruktur von der mRNA reduziert und das Protein von der RNA getrennt werden, was von eIF4A ausgeführt wird. (6) Die Aktivierung der mRNA erfolgt, indem die m7G-Kappe durch eIF4F erkannt und ein RNA-Einzelstrang erzeugt wird. Die 7G-Kappe wird dabei durch die eIF4E-Untereinheit des eIF4F erkannt. Danach fördert auch eIF4B ATP-abhängig den Abbau der RNA-Sekundärstruktur und möglicher Proteine. (6)

eIF3 fördert die Formation des 43S-PIC. Dieser ist an der mRNA-Rekrutierung beteiligt und stabilisiert die gebundene mRNA am Eintritts- und Austrittskanal. (6) Kürzlich wurden m7G-Cap-interagierende Domänen in eIF3d und in eIF3l identifiziert, die eine Rolle beim Übergang einer eIF4E-gebundenen m7G-Cap-RNA zu einer m7G-Cap-RNA spielen könnten, wodurch es später dann zu einer Freisetzung von eIF4E kommt. (6)

eIF3j bindet an das 40S-Dekodierungszentrum und hat Kontakt zu eIF1A.

Die mRNA-Bindung an 40S-Komplexe werden dabei durch eIF3j gehindert, wenn TC nicht vorhanden ist. Somit erleichtern Initiationsfaktoren, tRNA und das 40S-Ribosom die mRNA-Rekrutierung an das 48S-PIC. (6)

Beim Scanning ist ATP notwendig, damit eIF4A 48S-Komplexe am Startcodon bilden kann. Es wird angenommen, dass die Translation der mRNA vorübergehend umfangreiche Sekundärstrukturen und RNA-assoziierte Proteine aus dem 5'-Leader und dem ORF entfernt. So werden am Ende 40S- und 60S-Untereinheiten freigesetzt, um erneut zu initiieren. (6) Kinetisch wird die Wiederverwendung von Ribosomen zur wiederholten Translation derselben mRNA wahrscheinlich durch das sogenannte "Closed-Loop-Modell"

unterstützt, bei dem PABP und eIF4G miteinander interagieren, um die mRNA zu zirkulieren. (6)

Die ribosomalen Untereinheiten werden in der Nähe des 5'-Endes der mRNA freigesetzt, was nachfolgende Initiationsereignisse auf effizientere Weise erleichtert.

Man geht davon aus, dass Helikasen an vielen Initiationen teilnehmen. Somit sind sie wichtig für die optimale Initiation der mRNA mit 5'UTRs. (6)

3.6.2. AUG-Erkennung

AUG-Erkennung führt zu Konformationsänderungen im PIC. Die Sequenz GCCPuCCAUGG (Kozak-Konsensussequenz) fördert die AUG-Erkennung. Das Purin-Nukleotid A oder G an der Position -3 und das G an der Position +4 sind am wichtigsten. (3,6) Durch einen Prozess namens „Leaky Scanning“ können gewisse AUGs umgangen werden. Die mRNAs nutzen dabei Leaky Scanning, um bestimmte Expressionsniveaus zu regulieren. Alternativ kann das Leaky Scanning eine NTD-Signalsequenz ausschließen, die den Bestimmungsort des endgültigen Proteins verändern kann. (6)

So kann das Leaky Scanning eines vorgelagerten ORFs den Fluss der Ribosomen zum nachgelagerten ORF regulieren. Die mRNAs mit langen Leadern können dabei effizienter translatiert werden. (6) In der Nähe der m7G-Kappe können AUG-Codons effizient genutzt werden, wenn eIF1 von den Reaktionen ausgeschlossen wurde. Eine mögliche Ausnahme ist der Translationsinitiator der kurzen 5'UTR (TISU)-Sequenz SAASAUGGCGGC (S =G oder C) in mRNAs, die für Initiationsereignisse in der Nähe der m7G-Kappe einen permissiven Effekt hat. (6) Um ein AUG-Initiationscodon zu erkennen, muss das Met-tRNAi-Antikodon innerhalb des scannenden PIC eine Basenpaarung mit der mRNA eingehen und diese Interaktion an die assoziierten Faktoren im PIC signalisieren. (1,3,6) Das PIC wird von einer "offenen" in eine "geschlossene" Konformation übergeführt, wodurch eIF1, eIF2-GDP und eIF5 aus dem PIC freigesetzt werden.

Es entsteht eine PIC-Anordnung, um die 60S-Untereinheit zu rekrutieren. Somit sind eIF1, eIF1A und eIF5 zusammen mit eIF2 an der strengen AUG-Erkennung beteiligt. (6) Im scannenden PIC befindet sich eIF1 in der Nähe der P-Stelle. Dadurch wird eine vollständige Met-tRNAi-Anticodon-AUG-Paarung verhindert. In der offenen Scanning-Konformation dagegen verbindet die eIF2 β -Untereinheit eIF1 und eIF1A mit Met-tRNAi,

die an den 40S-Kopf gebunden ist. So könnte die Bindung zwischen eIF1, eIF2 β und dem Met-tRNA_i-Anticodonstamm die Scanning-Konformation stabilisieren. (6)

Danach geht das Met-tRNA_i erneut eine Codon-Anticodon-Paarung mit der mRNA ein. Der aminoternale Schwanz (NTT) von eIF1A stabilisiert dabei den Codon-Anticodon-Duplex. Das eIF2 α bindet das konservierte mRNA-Nukleotid an der -3-Position mit Hilfe von Arg54. Dieses befindet sich dabei in der Nähe des regulatorischen Ser51-Rests. Die Bindung des eIF2 β vom tRNA-Akzeptorstamm und vom eIF1A wird aufgelöst. Das eIF1 ist somit teilweise verdrängt, wodurch die Codon-Anticodon-Paarung zwischen Met-tRNA_i und dem AUG-Codon der mRNA ermöglicht wird. (6)

eIF5 ist ebenfalls wichtig bei der AUG-Erkennung. Es hält zusammen mit eIF1A das eIF1 im offenen scannenden-PIC. Außerdem koordinieren eIF5-eIF3c-Wechselwirkungen die Umlagerungen. (6) Die 40S ribosomalen Proteine unterstützen die AUG-Codon-Erkennung, indem sie die mRNA, Met-tRNA_i und Translationsfaktoren kontaktieren. Rps5/uS7 befindet sich dabei am 40S-mRNA-Ausgangskanal und interagiert mit TC- und AUG-3/-4-Kontextnukleotiden. Mutationen in uS7 beeinträchtigen dabei die AUG-Erkennung. (6)

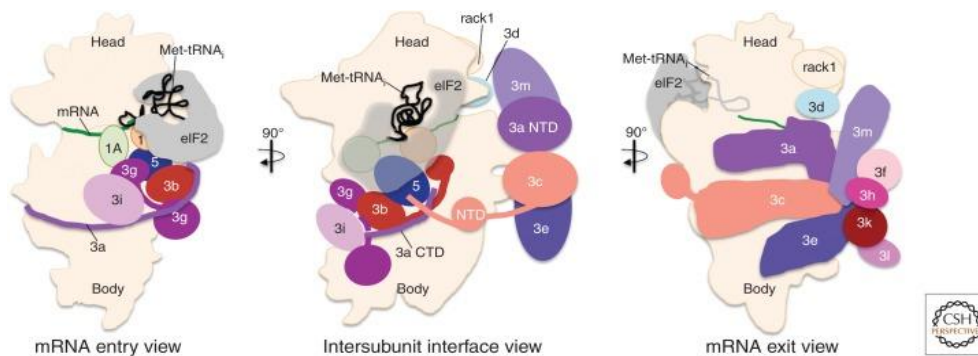


Abbildung 14 PIC während der AUG-Erkennung.

(6) Merrick WC, Pavitt GD. Protein Synthesis Initiation in Eukaryotic Cells. Cold Spring Harb Perspect Biol [Internet].

3.6.3. eIF2-GTP-Hydrolyse

Die Hydrolyse von eIF2-gebundenem GTP wird durch den Arg15-Rest innerhalb der eIF5-NTD stimuliert. Die Hydrolyse findet während des Scannens statt. Die Freisetzung von Pi dagegen findet nur bei der AUG-Erkennung statt. Dabei entsteht eIF2-GDP. (3,6) Der carboxyterminale Schwanz (CTT) von eIF1A bindet an eIF5-NTD bei der AUG-

Erkennung. Diese Bewegung ist mit der Dissoziation von eIF1 vom PIC und mit der Pi-Freisetzung von eIF2 gekoppelt. (6)

Danach hat das eIF2-GDP eine geringe Affinität zu Met-tRNA_i. Folglich wird eIF2-GDP aus dem 48S-Komplex freigesetzt. eIF5 und eIF2 treten auch aus, wodurch die vorzeitige Freisetzung von GDP verhindert wird. Das eIF1A bleibt jedoch am Ribosom gebunden, um die 60S-Bindung zu stimulieren. (6)

3.6.4. Verbindung der 60S-Untereinheiten

Hohe Mg²⁺-Konzentrationen stärken die Bindung der ribosomalen 40S- und 60S-Untereinheiten aneinander. (3,6) Die Verwendung von GDPNP (5'-Guanylylimidodiphosphat) können dabei die Bildung eines Initiationskomplexes auf der Ebene eines 48S-Komplexes blockieren. Die Freisetzung von eIF2 aus der 40S-Untereinheit ist somit für die 60S-Verbindung nötig. Dadurch kann eIF5B-GTP an die 40S-Oberfläche binden. Dies wird durch das Zurückhalten von 40S-gebundenem eIF1A ermöglicht. eIF1A-CTT interagiert dabei mit der Domäne IV von eIF5B. Die 60S-Untereinheit-Rekrutierung und die Met-tRNA_i-AUG-Interaktionen an der P-Stelle werden dadurch ermöglicht. (6)

Das eIF5B (als GDPNP-Komplex) befindet sich auf dem 80S-Ribosom. Der Kontakt zwischen der eIF5B-Domäne IV bringt die Met-tRNA_i in die P/I-Konformation. Dies bringt die Met-tRNA_i mittels Hydrolyse des GTP in die P-Position. (6)

Beim 80S-gebundenem eIF5B sind die Domänen III und IV um 60°-65° gegenüber dem freien eIF5B gedreht. Die Hydrolyse von GTP durch eIF5B führt zu seiner Entfernung vom 80S-Ribosom. eIF5B-GDP-Freisetzung ist dabei an die Entfernung von eIF1A gekoppelt. Das 80S-Ribosom kann dann an der Elongationsphase der Proteinsynthese teilnehmen. Met-tRNA_i ist nun in der P-Stelle und die A-Stelle ist frei. (6)

3.6.5. Alternative Initiationsereignisse

Ein kleiner Prozentsatz von mRNAs werden anders translatiert. Die Expression dieser mRNAs kann entweder zelltypspezifisch oder unter Stressbedingungen sein. Diese Mechanismen haben jedoch eine geringe Auswirkung auf die Gesamtexpression. Es gibt hierfür zwei Systeme. Die eine ist die durch interne Ribosomeneintrittsstellen (IRES)

geförderte Initiation und die andere ist die regulierte Reinitiation bei GCN4/ATF4 und verwandten mRNAs mit mehreren stromaufwärts liegenden ORFs. (6) GCN4/ATF4 und andere mRNAs nutzen diesen Scanning-Mechanismus. IRES dagegen nutzt eine alternative 40S-Rekrutierungsstrategie. Ein weiterer Mechanismus ist TISU. Das ist eine alternative 5'-Sequenz. Sie fördert die Initiation am AUG-Codon am 5'-Ende. Außerdem fördert TISU die m⁶-Methylierung von 5'-UTR-Adeninresten. (6) eIF2A ist wichtig bei der Initiierung der Translation für Peptide der Klasse I des Haupthistokompatibilitätskomplexes (MHC). Dies ist bei Stressreaktion, Tumorprogression und bei viralen Replikationen wichtig. eIF2D, eIF5B oder MCT-1/DENR sind wichtig für die Bindung von Initiator-tRNA an Ribosomen. (6) Es gibt auch Initiationen an CUG-Leucin-Codons, die unabhängig von eIF2 sind. So können Zellen eine an Leucin gebundene Elongator-Transfer-RNA (Leu-tRNA) verwenden, wodurch die Translation an kryptischen CUG-Startcodons in einer eIF2A-abhängigen Weise initiiert wird. (6) Die Initiierung der Proteinsynthese durch alternative Proteine wird durch eIF2-Kinasen und die Phosphorylierung von Serin 51 der α -Untereinheit des eIF2 gefördert. Dadurch sinkt die Konzentration von ternären Komplexen. (6)

3.6.6. Regulierung des 80S-Initiationsweges

Eine Änderung der Konzentration der aktiven Initiationsfaktoren kann die Gesamtproteinmenge und die mRNA-Selektivität beeinflussen. Somit ergibt sich, dass die meisten Initiationsfaktoren weniger häufig vorhanden sind als die Anzahl der Ribosomen (Ausnahme eIF4A). (6)

Die eIF2B-Spiegel sind niedriger als die von eIF2 und eIF5. Folglich ist der Nukleotidaustausch ein regulierter Schritt der Initiation. (6) Die Konzentration der "zusätzlichen" RNA-Helikasen, die den Initiationsprozess unterstützen könnten, beträgt etwa ein Fünftel der Konzentration von eIF4A. (6)

Die Konzentration der 4E-BP-Regulatoren reicht dabei aus, um die eIF4F-abhängige Proteinsynthese vollständig abzuschalten. Die Konzentration des eIF4A-Regulators Pdc4 in HeLa-Zellen ist dagegen hierfür nicht ausreichend. (6)

Die posttranslationale Modifikation kann die Aktivität von Initiationsfaktoren steigern. Die wichtigsten Schritte bei der Initiation ist die Phosphorylierung von eIF2 (Serin 51 der α -Untereinheit) und die De-Phosphorylierung von 4E-BPs. (6)

4. Die mRNA-Impfstoffe

4.1. Einleitung

Mit der mRNA können verschiedenste Arten von Proteinen exprimiert werden. Die mRNA-Sequenz kann dabei leicht modifiziert werden. Des Weiteren sind die mRNA-Impfstoffproduktions- und Reinigungsprozesse recht ähnlich, wodurch die mRNA-Impfstoffe standardisiert hergestellt werden können. (5) Auch die Verwendung der In-vitro-Transkription erleichtert die Herstellung von mRNA-Impfstoffen, was sie zeitlich wirtschaftlich attraktiver macht. (5)

Die mRNA braucht auch keine Adjuvantien. Sie kann selbst adaptive Immunreaktionen durch die Sekretion von z.B. $\text{TNF}\alpha$ und $\text{IFN-}\alpha$ aktivieren. (5) Auch eine Kontamination durch Proteine und Viren kann durch eine In-vivo-Expression vermieden werden. Expressionsaktivität und die In-vivo-Halbwertszeit der mRNA können dabei durch die Modifizierung der mRNA-Sequenz reguliert werden. (5)

Ein Vorteil gegenüber den DNA-Impfstoffen ist, dass mRNA-Impfstoffe Zielproteine effektiver exprimieren, da die Zielproteine im Zytoplasma translatiert werden. (5) Zudem ist die Wahrscheinlichkeit gering, dass die mRNA in die DNA des Wirts eingebaut wird. Wie bereits erwähnt ist die mRNA anders aufgebaut als die DNA. Sie weist zudem keine CpG-Inseln auf. Schließlich kann die mRNA leicht abgebaut werden und ist somit nicht belastend für den Wirt. (5)

4.2. Modifikation der mRNA

Für die mRNA-Synthese verwendet man die In-vitro-Transkriptionstechnologie mit T3-, T7- oder SP6-RNA-Polymerase und eine lineare DNA. 5'-Cap, 5'-UTR, ORF, 3'-UTR und die Poly(A)-Schwanzstruktur verleihen dabei der mRNA Stabilität und erhöhen die Expressionsfähigkeit. Es entstehen dabei zielgerichtete mRNA, nicht zielgerichtete RNA, Nukleotide, Oligodeoxynukleotide und Proteine. (4,5)

4.2.1. Fünf-Prime-Cap (5' cap)

Eukaryotische mRNAs besitzen eine 7-Methylguanosa-Kappe (m⁷GpppN-Struktur) am 5'-Ende. Diese verbindet sich während der In-vitro-Transkription über eine 5'/5'-Triphosphatbrücke (ppp) mit dem ersten RNA-Nukleotid. 5'-Cap eliminiert dagegen freie Phosphatgruppen in der mRNA-Sequenz. (4,5,7,8) Dadurch wird die mRNA stabilisiert und die Translationseffizienz wird durch Bindung an den eukaryotischen Translationsinitiationsfaktor 4E (eIF4E) gesteigert. (4–7) Deswegen wird diese mRNA-Kappung für die Modifikation der mRNA angewendet. Die Kappung der mRNA kann enzymatisch oder chemisch erfolgen. (4,5,7)

Bei der enzymatischen Methode werden Vaccinia virus Capping Enzyme (VCE) verwendet. VCE besteht aus den Untereinheiten D1 und D12. D1 fügt die Cap-0-Strukturen hinzu und D12 dagegen ist an der Aktivierung von D1 beteiligt. (4,8)

Beim chemischen „Capping“ werden Cap-Analoga während der Transkription hinzugefügt. Diese Cap-Analoga können jedoch auch die Translationseffizienz reduzieren, da sie umgekehrt in die mRNA-Sequenz eingebaut werden können. Es kommt dann zu falscher Methylierung der mRNA. Eine freie Phosphatgruppe befindet sich dabei an der 5' Position. All dies reduziert die Translationseffizienz. (6,9) Aus diesem Grund wurden Anti-Reverse-Cap-Analoga (ARCA) entwickelt. Sie sind so an der C2- oder C3-Position modifiziert, dass Methylgruppen während der Transkription an der richtigen Stelle mit den Hydroxylgruppen reagieren. (4,5,10–12) Beim ARCA ist die C3-Position methyliert. Des Weiteren steigert eine Phosphorothioat-Modifikation die Affinität zu eIF4E. Andererseits senkt sie die Anfälligkeit für Decapping-Enzyme. So können z.B. β-S-ARCA die Stabilität der mRNA in dendritischen Zellen (DC) erhöhen. (4,5,10–12) Es gibt auch sog. "2S-Analoga", die eine bessere Funktion aufweisen. Diese besteht aus einer 1,2-Dithiodiphosphat-Modifikation, ARCA, und einer verlängerten Polyphosphatkette. (4,5,10–12) Schließlich gibt es noch eine co-transkriptionale Capping-Methode namens "CleanCap", die einen initiierenden Cap-Trimer nutzt und dadurch eine natürlich vorkommende 5'-Cap-Struktur (Cap-1) erhält. (4,5) Dies ist wichtig, da unverkappede mRNA von PRR (Pattern Recognition Receptor) erkannt werden kann und zu Typ I Interferon-Ausschüttung führt, was die Translation hemmt. (4) Die Cap1-Struktur kann durch Guanylyltransferase, 2'-O-Methyltransferasen oder durch die co-transkriptionelle CleanCap™-Technologie hinzugefügt werden. Das angeborene Immunsystem sollte weiter

vermieden werden. Dazu sollten verkappte mRNAs mit Phosphatasen behandelt werden, um nicht verkapptes Phosphat zu entfernen und so die Erkennung durch PRR und damit einhergehende Zerstörung der mRNA-Translation zu verhindern. (4,5)

4.2.2. Regulierung der Untranslatierten Regionen (UTRs) und ORFs

Die Optimierung der UTRs wird ebenfalls zur Erhöhung der mRNA-Stabilität und damit einhergehender Translationseffizienz genutzt. Dabei wird die mRNA-Expressionsmenge in vivo erhöht. (4,5)

3'UTR enthält sehr viele instabile Sequenzen. Deren Abwendung bzw. der Einbau stabiler Elemente in die 3'UTR würde die mRNA stabilisieren. So können z.B. zwei 3'UTRs in Reihe verbunden und dadurch die Translationseffizienz gesteigert werden. (4,5) Zudem könnte durch das Hinzufügen von AU/GU-angereicherten Sequenzen die mRNA-Stabilität gesteigert werden. (4,5,7,13,14) Auch am 5'UTR kann man die mRNA-Stabilität durch das Einfügen von GCC-(A/G)-CCAUGG erhöhen, weil dadurch der Translationsstart verbessert wird. (4,5,15) Am 5'UTR gibt es auch eine Sequenz, die identisch mit der stromaufwärts gelegenen Sequenz des ORF ist. Diese muss vermieden werden, da sie einen Fehlstart während der mRNA-Translation auslösen kann. Zudem muss AUC und CUG am 5'UTR vermieden werden, da diese Sequenzen im ORF störend auf die Translation wirken. (4,16,17) Kürzere 5'UTR erweisen sich dabei nützlicher für die Translation als längere. (4,8) Eine zu stabile Sekundärstruktur des 5'UTR würde jedoch die Bindung an den Ribosomen und somit auch die Translation hindern. (4,5,7,18)

Auch die ORFs müssen optimiert werden. Zunächst müssen geeignete Codons aus dem ORF gewählt werden. Die Translationsrate ist ebenfalls wichtig. So sollte die mRNA mit Cytosin und Guanin angereichert werden. Uridin sollte dabei möglichst vermieden werden, da Uridin von RIG-I erkannt werden und die Proteinexpression gehindert werden kann. (4,8) So kann man durch Pseudouridin, 1-Methylpseudouridin und 5-Methylcytidin das natürliche Uridin und Cytidin ersetzen. Dadurch kommt es zu einer verstärkten Antigenexpression. (4) Manche Proteine brauchen jedoch eine geringere Translationsrate, um korrekt gefaltet zu werden. (4,5)

4.2.3. Synthese der Poly(A)-Sequenz

Die Poly(A)-Sequenz verbessert die Translationseffizienz, indem es die RNA vor enzymatischem Abbau schützt. (4,5,8,19) Das Poly(A)-bindende Protein (PABP) kann über Translationsinitiationsfaktoren (eIF4G und eIF4E) an das 5`Cap binden, was ebenfalls der mRNA Stabilität verleiht. (4,5,20) Es gibt zwei Wege die Poly(A)-Struktur zu synthetisieren. Eine Möglichkeit ist es eine DNA-Vorlage einer bestimmten Sequenzlänge mit Poly(A)-Strukturinformationen In-vitro zu transkribieren. Man kann auch eine rekombinante Poly(A)-Polymerase anwenden, um nach einer Transkription Poly(A)-Strukturen mittels einer enzymatischer Polyadenylierung hinzuzufügen, wodurch eine Mischung von Poly(A)-Strukturen unterschiedlicher Länge entsteht. (4,5) Zudem sollte der Poly(A)-Schwanz mindestens 20 % Cytidin enthalten. Dies würde die mRNA vor Deacetylierung schützen. (8)

PABP kann jedoch auch hemmend auf die Translation wirken. Somit kann die Poly(A)-Sequenzlängen unterschiedlich die Effizienz der mRNA-Translation beeinflussen. (4,5) Es gibt jedoch widersprüchliche Meinungen bezüglich der Länge der Poly(A)-Sequenz. Einerseits wurde festgestellt, dass in DCs die optimale Länge der Poly(A)-Sequenz 120 bis 150 Nukleotide betrage. In menschlichen T-Zellen betrage diese sogar über 300 Nukleotide. (4,5) Andere Studien ergaben jedoch, dass mRNAs mit kurzen Poly(A)-Sequenzen eine höhere Translationseffizienz aufweisen. (4,5,21)

4.2.4. Reinigung der mRNA

Es gibt Elemente, welche die mRNA „verunreinigen“ und somit auch die Translation hemmen. Diese sind kurze RNAs und dsRNA (doppelsträngige RNA). Kurze mRNA entsteht aus fehlgeschlagenen Initiationsereignis. Die dsRNA entsteht durch selbstkomplementäre 3'-Verlängerung. (4) Diese Verunreinigungen aktivieren PPRs, was das angeborene Immunsystem stimuliert und somit die Translation blockiert. (4) Aus diesem Grund muss die mRNA von diesen Elementen bereinigt werden, was mit Hilfe der HPLC (high-pressure liquid chromatography, Hochdruckflüssigkeitschromatographie) erreicht werden kann. Jedoch weist diese Methode eine Ausbeute von unter 50% auf und ist zudem sehr teuer. (4) Eine günstigere und erfolgreichere Methode (>90%) stellt die FPLC (fast protein liquid chromatography) dar. Schließlich gibt es noch die

Festphasensynthese, mit der dsRNA-Verunreinigungen vollständig beseitigt werden können. (4,22)

4.3. Immunogene Regulierung von mRNA

Die mRNA weist einen selbstadjuvanten Effekt auf. Sie wird von Antigen-präsentierenden Zellen (APCs) erkannt und danach werden Mustererkennungsrezeptoren (PRRs) wie z.B. die Toll-like-Rezeptor 3 (TLR3), TLR7 und TLR8 aktiviert. (4,5,23) Bei Subunit-Impfstoffen müssen jedoch Adjuvantien hinzugefügt werden, da diese PRR nicht aktivieren können. (4,5)

Die doppelsträngige RNA (dsRNA) bindet an RLRs (Retinoic-acid-inducible gene I like receptors), wodurch die APCs reifen. In weiterer Folge kommt es zur Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen und die Sekretion von Typ-I-Interferon (IFN). Es kommt dann zur antigenspezifischen humoralen und zellulären Immunantwort. (4,5,24) DC können dabei durch einzelsträngige RNA (ssRNA) über TLR7- und TLR8 aktiviert werden. Auch die dsRNA-Kontaminanten lösen über die TLR3-Erkennung eine Immunaktivierung aus. (4,5,25)

Eine übermäßige Immunreaktion führt jedoch zu einer erhöhten Ausschüttung von Typ-I-IFN und anderen Interferonen. Dies wirkt hemmend auf die Translation und führt dann zum Abbau der RNA, einer geringeren Aktivierung von CD8⁺ T-Zellen und schließlich zu einer Beendigung der Immunreaktion. (4,5,26,27)

Die Wirkung von Typ-I-Interferon auf die Anti-Tumor-Therapie ist somit widersprüchlich. So ergaben andere Studien, dass Typ-I-Interferon erforderlich ist für eine effektive Anti-Tumor-Therapie. Mit Typ-I-Interferon wurde eine bessere MHC-Klasse-I-Präsentation in APCs beobachtet als ohne Adjuvans. (4)

Auch dsRNA-Verunreinigungen haben einen Einfluss auf die Immunantwort.

dsRNA-Verunreinigungen können dabei die Typ-I-IFN-Produktion fördern. Eine Reinigung der *in vitro* synthetisierten mRNA könnte also die Typ-I-IFN-Immuntantwort von mRNA-Impfstoffen reduzieren und die mRNA-Translationseffizienz erhöhen.

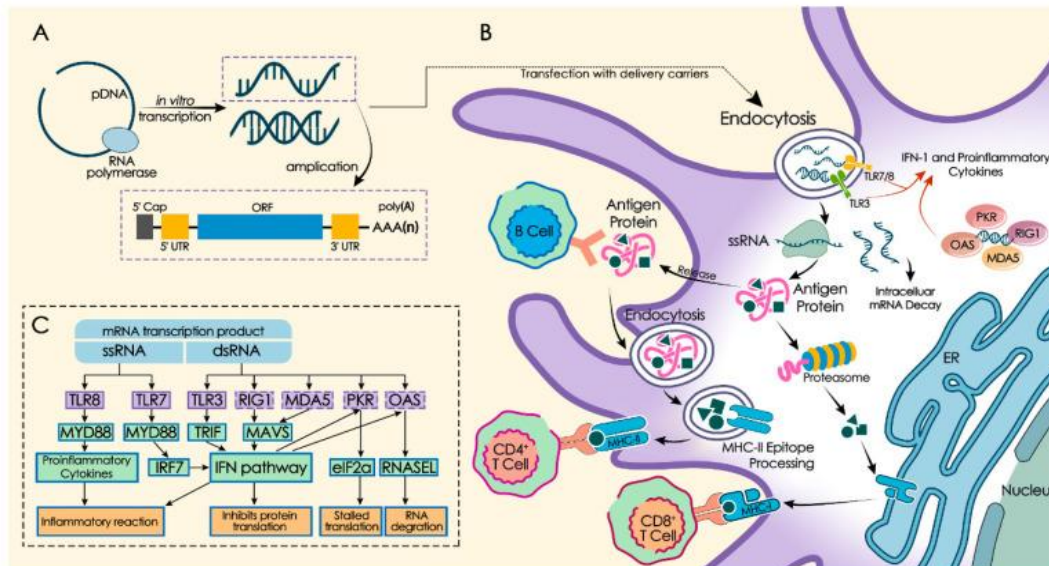


Abbildung 15: Auslösung der Immunantwort durch die mRNA.

(5) Xu S, Yang K, Li R, Zhang L. mRNA Vaccine Era-Mechanisms, Drug Platform and Clinical Prospection. Int J Mol Sci [Internet].

4.3.1. Regulierung der selbstadjuvanten Eigenschaft mittels mRNA-Sequenz

Die ssRNA kann als PAMP (pathogen-associated molecular pattern) wirken. Dadurch werden Typ-I-IFN produziert, welche die IFN-stimulierten Genen (ISGs) induzieren und sich somit hemmend auf die Translation auswirken.

Somit hat die mRNA-Sequenz einen Einfluss auf die Immunantwort. (4,5,19)

Auch PRRs können Cap0 (m7GpppN)-gekapselte oder nicht gekapselte mRNA erkennen und deren Translation hemmen. Es gibt dabei drei Formen die verkappte mRNA zu erkennen: Darunter sind die Cap0-verkappte, Cap1 (m7GpppNmN)-verkappte und nicht verkappte mRNA. Nur die Cap1-verkappte mRNA wird nach der Erkennung durch PRRs translatiert. (4,5,28)

Die Modifikation der ORF-Region hat somit Einfluss auf die PRR-Erkennung, womit man auch das Translationsniveau der mRNA erhöhen kann. (4,5,19)

Es gibt dabei ein Protein namens 2'-5'-Oligoadenylat-Synthetase (OAS), welches durch Typ-I-IFN induziert wird. Die mRNA kann von diesem Protein erkannt werden. Pseudouridinmodifizierte mRNA weist im Vergleich zu unmodifizierter mRNA eine geringere OAS-Aktivierung auf. Dadurch wird pseudouridinmodifizierte mRNA weniger abgebaut und ihre Translation läuft effizienter ab. (4,5,29) Dieses Uracil-Analogon wird auch am häufigsten für die mRNA-Modifikation verwendet. Es können auch 5-Methyl-Cytidin und 2-Thiouridin für die Modifizierung der mRNA-Sequenz verwendet werden. Sie verringern die Erkennungsrate von PRRs und steigern die Stabilität der mRNA. (5,29)

4.3.2. Einfluss von Adjuvantien auf die mRNA-Immunogenität

Damit mRNA-Impfstoffe ihre Wirkung besser entfalten können, müssen Adjuvantien hinzugefügt werden. Die herkömmlichen Adjuvantien sind MF59 (von Novartis) und eine kationische Nanoemulsion (CNE). Sie konnten den immunogenen (Fähigkeit eines Antigens eine Immunantwort auszulösen) Effekt der mRNA-Impfstoffe wesentlich verbessern. (5,29) Die adjuvante Eigenschaft von TriMix wird dadurch verursacht, dass dieser aus mRNAs besteht, die für drei Immunaktivatorproteine kodieren. Diese sind CD70, CD40-Ligand (CD40L) und konstitutiv aktives TLR4. Dadurch kann TriMix-mRNA die Immunogenität von nackter, unmodifizierter, ungereinigter mRNA erhöhen und somit auch die Reifung von DCs fördern und die zytotoxische T-Lymphozyten-Reaktion fördern. (4,5,30) Sie können auch intratumoral verabreicht werden, um so das Tumor-Microenvironment zu verändern. Man könnte damit auch unter Umständen eine systemische Antitumor-Immunität erzeugen. (4,30)

Einige mRNA-Transportvehikel, wie kationische Lipide und Protamin haben ebenfalls eine adjuvante Wirkung und können somit die Wirksamkeit der mRNA-Impfstoffe steigern. Als Beispiel ist das kationische Lipid 1,2-Dioleoyl-3-Trimethylammonium-Propan/1,2-Dioleoyl-sn-Glycero-3-Phosphoethanolamin/1,2-Di-O-octadecenyl-3-trimethylammoniumpropan (DOTAP/DOPE/DOTMA) zu nennen. DOTAP und DOTMA sind im physiologischen pH positiv geladen. Sie können die anionische mRNA gering kondensieren. (4) Diese können die Sekretion proinflammatorischer Zytokine und Typ-I-IFN fördern. (4,5,31) Mit der Kombination aus DOTMA/DOTAP und DOPE können Lipoplexe gebildet werden. Man kann deren Verhältnis so zueinander abstimmen, dass sie selektiv auf APCs der Milz abzielen. (4) In Mäusen wurde zudem ein großer Anstieg an

Monozyten in den Lymphknoten beobachtet. mRNA- und Protaminkomplexe können dagegen als Gefahrensignal fungieren, indem sie über TLR7 und TLR8 eine T-Helferzellen-(Th1)-Reaktionen auslösen, was man in der RNActive®-Technologie ausnutzt. (5,23) So nutzt CureVac für ihre mRNA-Impfstoffentwicklung gemeinsam verabreichte RNA und Protaminkomplexe als Adjuvans (um Th1-T Zellantworten auszulösen) und nackte, unmodifizierte und sequenzoptimierte mRNA als Antigen. (5) Schließlich können STING-Agonisten (Stimulator of Interferon Genes) eingesetzt werden. Mit ihnen wurde eine bessere Antitumorreaktionen erzielt, da sie eine intensivere und längere CD8+ T-Zellen-Antwort hervorrufen können. (4)

4.4. Das mRNA-Transportsystem

Damit spezifische Antigene exprimiert werden können, muss die mRNA in das Zytoplasma des Wirtes gelangen, was jedoch aus folgenden Gründen verhindert wird:

- 1) Das mRNA-Molekül ist zu groß, um durch die Zellmembran diffundieren zu können.
- 2) Die Zellmembran und die mRNA-Moleküle sind negativ geladen.
- 3) Die mRNA-Moleküle werden extrazellulär durch Ribonukleasen abgebaut. Somit müssen für eine genügende Translationsrate mRNA-Verabreichungsmethoden und mRNA-Verabreichungsvehikel angewendet werden. (5)

4.4.1. Die mRNA-Übertragung

Die mRNA kann subkutan, intradermal, intranodulär, intramuskulär, intravenös und intratumoral verabreicht werden. (4,5,32) Die Injektion nackter mRNA löst zwar eine schwache Immunantwort aus, jedoch wird diese Verabreichungsform für die Behandlung/Vorbeugung von Infektionskrankheiten angewendet.

Die Übertragung der mRNA erfolgt durch Elektroporation, Genkanone oder Mikronadeln. Die Elektroporation kann unnötige Immunreaktionen vermeiden, da es sich um eine Rezeptorunabhängige Mediation handelt. Zudem gibt es bei dieser Methode einen adjuvanten Effekt, wodurch proinflammatorische Zellen rekrutiert werden und Zytokine produziert werden. (5)

Bei der „Gene-Gun-Methode“ wird komprimiertes Heliumgas verwendet, um die mRNA in die Wirtszellen einzuschleusen. Die mRNA ist dabei auf der Oberfläche von

Goldpartikeln aufgebracht. So konnte man die mRNA mit Hilfe einer „Genpistole“ in die Zielzellen befördern. Diese Methode kann jedoch zu abnormalem Zelltod führen, weswegen diese Methode bei Menschen nur mehr selten verwendet wird. (5,33)

4.4.2. DCs als Transportsystem

DCs können als antigenpräsentierende Zellen (APC) verwendet werden. Sie besitzen die Fähigkeit Antigene über den major histocompatibility complex (MHC) an CD4+, CD8+ T-Zellen zu präsentieren, was eine zelluläre Immunität auslöst. Auch die humorale Immunantwort kann ausgelöst werden, indem Antigene an B-Zellen präsentiert werden. (4,5,34)

Dadurch können DCs als mRNA-Transportvehikel verwendet werden. Dabei wird die mRNA in vitro in die DCs transferiert. Die verarbeiteten DCs werden dann in den Wirtskörper eingebracht, wo es dann zu einer antigenspezifischen Immunantwort kommt. (4,5,35)

Die Auslösung dieser zellulären Immunantwort kann man auch für die Krebsbehandlung nutzen.

Allerdings ist die mRNA-Übertragungsrates bei alleiniger DC-Endozytose gering, weswegen zusätzlich die Elektroporation zum Einsatz kommt. Diese Prozedur ist jedoch zeit- und kostenaufwändig, wobei vor allem der In-vitro-Präparationsprozess sehr zeitaufwändig ist, weswegen die Immunreaktion seine Wirkung verlieren kann. (5)

4.4.3. Peptide als mRNA-Träger und Immunaktivatoren

Protamin kann als mRNA-Träger und als Immunaktivator zum Einsatz kommen. Es handelt sich dabei um ein alkalisches kationisches Protein mit harzähnlicher Struktur. Es kann mit der mRNA einen Protamin-mRNA-Komplexpartikel eingehen. Zwischen dem Protamin und der mRNA kommt es dann zu elektrostatischer Wechselwirkung, wodurch die mRNA vor dem Abbau durch Serum-RNAsen geschützt wird. (4,5,23) Protamin-mRNA-Komplexe können auch als Adjuvans fungieren, denn dieser Komplex kann eine Immunreaktion in DCs, Monozyten, B-Zellen, natürlichen Killerzellen und Neutrophilen hervorrufen. Es werden dabei TLR7/8 aktiviert, was eine Immunreaktion vom Th1-Typ auslöst. (4,5,36) So konnte man bereits 1961 mit Protamin als Trägermaterial mit einem

mRNA-Tumorimpfstoff ein Anti-Tumoröser Effekt erzielt werden. (5) Das Massenverhältnis von Protamin zu mRNA ist ebenfalls wichtig. Bei einem Massenverhältnis von Protamin zur mRNA von 1:2 wird eine starke Immunantwort mit hohen Zytokinspiegeln hervorgerufen. Im Gegenzug ist hier jedoch die Proteinexpression sehr stark gehemmt. Bei einem Massenverhältnis von 1:4 steigt dagegen die Proteinexpression und der Zytokinspiegel sinkt. (5) Aus diesem Grund muss das Protamin optimiert werden, damit es als mRNA-Transporter und Immunaktivator dienen kann. So werden bei RActive®-Vakzinen Protamin-mRNA-Komplexe (50%) mit nackter Antigenkodierender mRNA (50%) kombiniert. Alternativ kann es durch ähnliche Proteine ersetzt werden. (4,5)

Es gibt sogenannte kationische zelldurchdringende Peptide (cell-penetrating peptides/CPPs). Diese CPPs können einen Komplex mit der RNA bilden. Wahrscheinlich führen CPPs zu einer Anhäufung von negativ geladenen Glykosaminoglykanen auf der Zelloberfläche. Zudem wird die Aufnahme von kleinen Vesikeln erleichtert. (4) Als Beispiel ist das RALA-Peptid zu nennen. Es ist ein amphipathisches Arginin-reiches CPP. Es enthält positiv geladene Argininreste an einem Ende und neutrale Leucinreste am anderen.

Peptid-kondensierten mRNA-Komplexe würden dabei den mRNA-Transport und die Expression der mRNA in DCs fördern. Solche ex-vivo beladenen DCs würden zytolytische T-Zell-Reaktionen auslösen. (4) Es gibt auch ein Fusionspeptid. Dabei ist ein D-Aminosäure-basiertes verkürztes Protamin mit einem kurzen CPP namens Xentry fusioniert. Mit diesem Fusionspeptid ist es möglich, eine CFTR-mRNA (cystic-fibrosis transmembrane regulator) in verschiedene menschliche Epithelzellen zu befördern. (4) Weitere Beispiele sind DOTAP/DP7-C-Liposomen, mit denen die mRNA effektiv in DCs verabreicht werden. (4) Schließlich gibt es noch negativ geladene GALA-Peptide, welche als Liganden dienen. Sie binden an LNPs (Lipid-Nanopartikel), wodurch die Zellpenetration von mRNA verstärkt wird. (4)

4.4.4. Lipide als Verabreichungssystem

Kationische Liposome können mit negativ geladenen Nukleinsäuren Bindungen eingehen und elektrostatische Komplexe bilden, wodurch die mRNA-Abgabe verbessert wird.

(4,5,37) Der kationische Lipid-mRNA-Komplex kann mit anderen Substanzen einen 80-200 nm großen LNP bilden. Dieser besteht aus ionisierbaren kationischen Lipiden, natürlichen Phospholipiden, Cholesterin und Polyethylenglykol (PEG). (4,5,33) Das LNP besitzt eine amphiphile Struktur, welche aus einem hydrophilen Amin, Kohlenwasserstoffketten und einem Linker besteht. Der Linker kann dabei die Kopfgruppen mit den Kohlenwasserstoffketten verbinden. (4) Das PEG verlängert dabei die Halbwertszeit und das Cholesterin stabilisiert den LNP. Das ionisierbare kationische Lipid fördert dagegen die autonome Aggregation der mRNAs zu einem etwa 100 nm großen Partikel und setzt die mRNAs durch Ionisierung im Zytoplasma frei. (5,38) Währenddessen formen natürliche Phospholipide und Nanopartikel die Bildung der Lipid-Doppelschichtstruktur. (5,38) Die mRNA befindet sich dabei im Kern des LNP, wodurch sie vor einem Abbau geschützt ist. Sie gelangt durch Endozytose in die Wirtszellen, da LNP lipophile Eigenschaften besitzt und dadurch mit der Wirtszellmembran verschmelzen kann. Somit bewirkt der Einsatz von LNP eine höhere mRNA-Expression und eine stärkere Immunreaktion in CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen. (5,33)

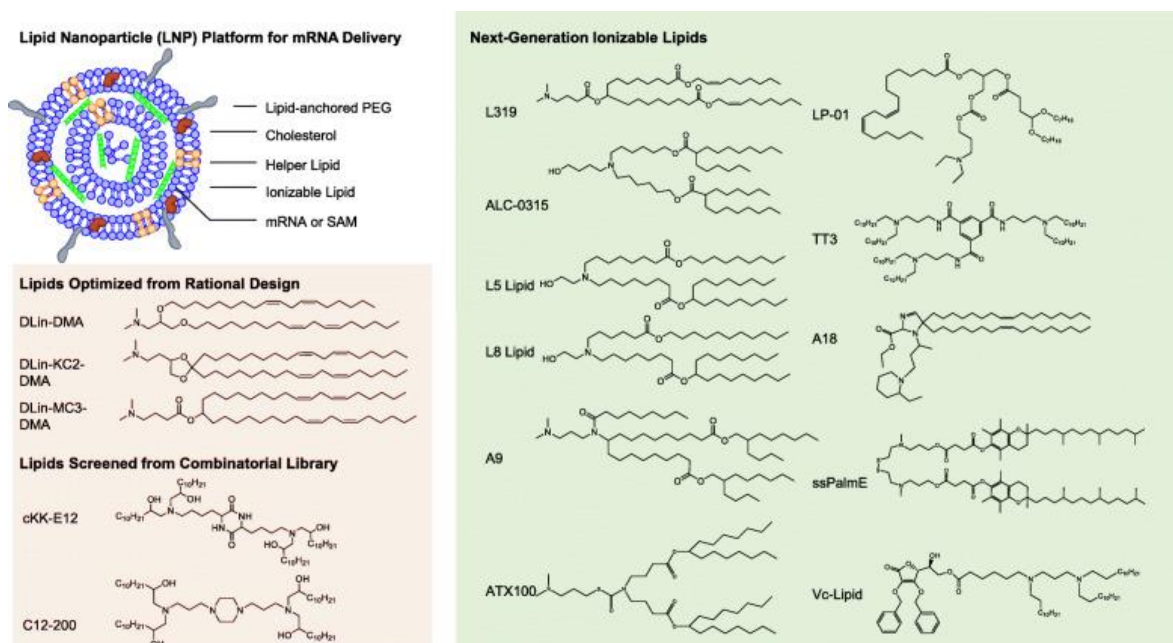


Abbildung 16: Aufbau eines LNP.

(4) Miao L, Zhang Y, Huang L. mRNA vaccine for cancer immunotherapy. Mol Cancer

Je nach Verabreichungsform kann die Immunstimulation unterschiedlich sein. So kann die LNP-mRNA subkutan, intramuskulär, intravenös, intraperitoneal, tracheal und intradermal injiziert werden. (5) Mit der richtigen Dosierung kann die Expression von Genprodukten

bewirkt werden. Eine Änderung des Ionisierungszustands der Lipide und des pH-Wertes in der Umgebung kann allerdings dazu führen, dass die mRNA aus dem Komplex entweicht. (5,39) So kommt es bei niedrigem pH zu Protonierung der freien Amine, wodurch es zu elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen den positiv geladenen Lipiden und der negativ geladenen mRNA kommt. Durch diese Interaktion wird diese besser verkapselt. Außerdem kommt es im sauren Milieu zu einer besseren Freisetzung der mRNA aus dem LNP. (4) Auch Phospholipide spielen hierbei eine wichtige Rolle. Wichtige Vertreter davon sind 1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamin (DOPE) oder 1,2-Distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholin (DSPC). Diese Phospholipide und Cholesterin erhöhen die Stabilität der Lipiddoppelschicht, wodurch die mRNA aus dem Endosom besser entweicht. PEG verhindert dabei die Partikelaggregation und verringert die Makrophagen-vermittelte Clearance. (4,8,40)

Einerseits müssen die LNPs so konstruiert sein, dass die mRNA vor extrazellulären RNAsen geschützt ist, damit eine effektive Translation, Antigenpräsentation und letztendlich Immunantwort zustande kommt und andererseits sollten die Lipidkomponenten metabolisierbar sein, um die systemische Toxizität zu verringern. (4) Weiters können auch Linker und Alkylketten in ihrer Säurestärke beeinflussen, um eine bessere Wirksamkeit zu erzielen. Denn die Säuredissoziationskonstante (pKa) der ionisierbaren Aminogruppe korreliert stark mit der Immunogenität der mRNA und somit auch mit der Wirksamkeit. So beträgt der optimale pKa-Wert für die i.v.-Verabreichung der mRNA 6,2-6,5 und für die i.m.-Injektion 6,6-6,9. (4,41) Hierfür muss die Kopfgruppe des ionisierbaren Lipids mindestens ein tertiäres Amin oder zwei voneinander getrennte Aminogruppen enthalten. Diese gering saure Kopfgruppe hat jedoch den Nachteil, dass der Impfstoff bei niedriger Temperatur gelagert werden muss. (4,41)

Dabei sollte das Lipid nach der Protonierung Kegelförmig sein, womit ebenfalls die endosomale Entweichung gefördert wird. Zudem kann das Hinzufügen von Doppelbindungen in Kohlenwasserstoff-Alkylketten die Fusogenität des Lipids und somit auch das endosomale Entweichen verbessern. Auch die Erhöhung des Grades an Ungesättigtheit (einschließlich der Alkynylgruppe) kann diese Faktoren verbessern. (4) Dafür ist die Länge der Alkylkette ausschlaggebend. So sind Lipide mit einer Länge von 12-14 Kohlenstoffatomen optimal für die Fusogenität. Auch Linker mit hoher Steifigkeit können eine bessere Translationseffizienz aufweisen. (4)

Eine Verbesserung der Übertragung kann jedoch zu erhöhten Zytokinspiegeln führen. So kann man die Fusogenität auch mit einer Esterbindung erhalten. Durch die Estergruppe

behält das Lipid seine Kegelform, wodurch die mRNA leichter freigesetzt wird. (4,42) Esterbindungen haben zudem den Vorteil, dass Biomaterialien besser abgebaut werden können. Sie können nämlich durch die Enzyme Esterase oder Lipase in hydrophile Nebenprodukte (Carbonsäure und Alkohol) gespalten werden, welche dann leicht metabolisiert werden können. (4,42) Die Esterbindungen können allerdings auch vorzeitig durch die Enzyme Esterase bzw. Lipase gespalten werden. Es wurde auch beobachtet, dass durch das Heranrücken des primären Esters an die Stickstoffgruppe die Übertragungseffizienz geringer wird. (4,42) Auch der Einbau von DOPE in LNP steigert die mRNA-Expression. Schließlich erwies sich die Kombinationen eines proteinbindenden ionisierbaren Lipids mit einem Lipid von hoher Fusogenität fördernd auf die mRNA-Expression. (4,43)

Um die Anlieferung von LNPs an APCs zu verbessern, werden sogenannte Targeting-Liganden hinzugefügt wie zum Beispiel Mannose-Cholesterin-Konjugate. Diese werden zusammen mit PEG an LNPs hinzugefügt, was zur Folge hat, dass die Aufnahme der Partikel in DCs durch den Mannose-Rezeptor CD206 verbessert werden würde. (4,8,44) Das Problem dabei ist die mangelnde Freisetzung von mRNA aus dem endosomalen Kompartiment. Denn nur 2% der mRNA würden aus dem Endosom in das Zytosol entweichen, was zusätzlich noch an ein enges Zeitfenster gebunden ist. Die LNPs müssen sich in frühen reifen Endosomen befinden. (4)

4.4.5. Polymer-basiertes Verabreichungssystem

Als mRNA-Transportvektoren werden kationische Polymere verwendet. Am häufigsten werden Polyethylenimin (PEI) und Polybetaaminoester (PBAE) eingesetzt. (4,5)

PEI ist ein kationisches, wasserlösliches Polymer mit dendritischer, linearer oder verzweigter Struktur. Dessen Aufgabe ist die DNA/mRNA-Übertragung. Es hat jedoch wegen seiner hohen Ladungsdichte und seines hohen Molekulargewichts zytotoxische Eigenschaften und ist zudem schlecht biologisch abbaubar. (4,5,45) Deswegen werden PEIs mit geringem Molekulargewicht mit Fettketten modifiziert, wodurch die Toxizität verringert werden kann. (4,5,45)

Auch PBAE kann für die mRNA-Übertragung eingesetzt werden. Es kann eine höhere mRNA-Übertragung in vitro erreicht werden, wenn kein Serumprotein im System vorhanden ist. So werden PBAE und Lipide kombiniert, um die Serumstabilität zu

verbessern. (5) 2016 wurde ein polymerbasiertes Verabreichungssystem entwickelt. In ihm wurden PBAEs und Lipid-PEG zusammen kombiniert. Dies wies eine hohe Serumstabilität und mRNA-Verabreichungseffizienz auf. (4,5,46) So kann man hyperverzweigte PBAEs verwenden, um mRNA i.v. und per inhalationem zum Lungenendothel zu befördern. Allerdings enthalten Polymerbasierte Verabreichungssysteme eine gewisse Toxizität, geringere Reinheit und eine geringere Clearance-Rate im Vergleich zu synthetischen LNPs. (4,5,46)

Auch Polysaccharide werden häufig in diesem Zusammenhang verwendet und werden aus der bakteriellen Zellwand gewonnen. Polysaccharide bilden eine flexible Kern-Schale-Struktur, durch welche die mRNA eingekapselt wird und die DCs aktiviert werden. (4,47) Weiters können auch Dendrimere verwendet werden. Das sind Dendrimere auf Basis von Polyamidoamin (PAMAM) oder Polypropylenimin. Mit Hilfe von PAMAM kann siRNA an Lungenendothelien systemisch verabreicht werden. (4) Mit PAMAM kann man auch Polymer-Lipid-Hybrid-Nanopartikel herstellen. Damit kann man Phosphat- und Tensin-Homolog-mRNA in vivo verabreichen. Man kann zudem diese dafür nutzen, um mRNA-Impfstoffe zusammen mit einem fettsäuremodifizierten TLR7/8-Agonisten zu verabreichen. Dies löst eine starke Antitumor-Immunantwort aus. (4)

Es gibt auch Aminopolyester (APEs). Diese wird durch Ringöffnungspolymerisation verschiedener Lactone synthetisiert. Sie zeichnen sich dabei durch eine geringere Toxizität und eine gewebespezifische Abgabe von mRNA an die Organe aus. (4,48) Auch pABOL (Poly(CBA-co-4-amino-1-butanol)) wurde verwendet werden, um SAM (selbst-amplifizierende mRNA-Impfstoffe) in z.B. Mäuse einzubringen. (4,49)

Schließlich wurden noch eine Bibliothek von ladungsändernden freisetzbaren Transportern sog. CARTs (charge-altering releasable transports) erstellt. Diese CARTs würden die Übertragung der mRNA in die Lymphozyten (v.a. T-Zellen) erleichtern. Bei diesen CARTs werden Poly(carbonat)- β -(α -Aminoester) verwendet. Das kationische Poly- α -aminoester-Grundgerüst wird dabei in kleine Moleküle umgewandelt und das fördert die mRNA-Freisetzung und vermeidet Verträglichkeitsprobleme. (4,50)

4.4.6. CNE, LCP und LPR als Verabreichungsform

CNE kann für die Verkapselung von SAM genutzt werden. mRNA-CNE-Impfstoffe erwiesen sich dabei als immunogen und gut verträglich. (4,51) Man kann auch DOTAP-

haltige Liposome als Hülle für die Verkapselung verwenden. So gibt es ein Lipid/Calcium/Phosphat (LCP)-System, welches Calciumphosphat als Kern für die mRNA-Kondensation beinhaltet. Als Hülle fungiert dabei ein mit PEG versehenes DOTAP/DOPE-Liposom. (4,52) Dann gibt es noch Lipid-Polymer-RNA-Lipopolyplexe (LPR), welche an DCs binden und damit eine Entzündungsreaktion auslösen. Ein weiteres Beispiel für LPR ist das 1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-Ethylphosphocholin/1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphatidyl-ethanolamin/1,2-Distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamin-N-[amino(polyethylenglycol)-2000. Mit dieser (DOPC/DOPE/DSPE-PEG)-Lipidhülle kann man mRNA in DC befördern, was eine starke Antigenantwort auslöst. (4,53,54)

4.4.7. Injektion von mRNA-Impfstoffen

Am häufigsten werden mRNA-Impfstoffe i.m. s.c. oder i.c verabreicht. In klinischen Studien werden die s.c.- und i.m.-Injektionen am häufigsten verwendet. (4)

Die intramuskuläre Verabreichung hat dabei folgende Vorteile:

1. einfache Dosierung
2. flexibles Injektionsvolumen
3. geringe Wahrscheinlichkeit für unerwünschte Reaktionen an der Injektionsstelle.

Weiters lösen die s.c- und i.m.-Verabreichung am wahrscheinlichsten eine effektive Immunantwort aus. Zwischen den beiden Applikationsformen gibt es keinen signifikanten Unterschied in der Stärke der antigenspezifischen Immunantwort, obwohl die Immunantwort von der Injektionsstelle abhängt. Das Antigen kann dabei je nach Verabreichungsform auch zu verschiedenen Lymphknoten transportiert werden. (4,55) Der Verabreichungsweg hat jedoch sehr wohl einen Einfluss auf die Expressionsrate, die angeborene Immunantwort und somit auch auf die Intensität der Immunantwort. Man hat die Halbwertszeit (HWZ) der Translation je nach Verabreichungsform von mRNA-LNPs untersucht. Die HWZ von i.m. und i.c. beträgt mehr als 20 Stunden und war somit auch die längste. Die HWZ bei s.c. betrug 15 Stunden und bei i.v. 7 Stunden. (4,56) Bei s.c. und i.m. war jedoch ein höheres Proteinexpressionsniveau als i.c.. Es ist wahrscheinlich, dass i.v.-Injektion eine günstige CD8⁺ T-Zell-Antwort fördern und somit ungünstige Auswirkungen der angeborenen Immunität umgehen können. Dabei darf man jedoch nicht die systemische Wirkung der i.v.-Injektion außer Acht lassen. (4,56) Es gibt auch Immuntherapien, die auf IVT-mRNA basieren. Diese kodieren Immunstimulanzien, welche als Adjuvantien

zusammen mit Krebsimpfstoffen verabreicht werden. Die Injektion erfolgt intratumoral bzw. intranodal. Dadurch wird die suppressive Mikroumgebung des Tumors verändert. (4,57)

4.5. mRNA als Wirkstoffplattform

Man kann mRNA-Impfstoffe nach ihrer Konstruktion und Replikationsfähigkeit einteilen. So gibt es SAM und nicht-replizierende mRNA-Impfstoffe. (5)

SAM-Impfstoffe werden aus einem Alphavirus-Genom entwickelt. Sie sind etwa 9~10 kb lang und weisen selbstreplizierende Eigenschaften auf, wodurch nur eine geringe Dosis dieses Impfstoffes nötig ist, um eine große Menge an Antigenen bilden zu können und eine lange Wirkdauer zu erreichen. (4,5,8,58) Dies ist ein klarer Vorteil gegenüber nicht-replizierenden mRNA-Impfstoffplattformen. So führt eine i.m.-Injektion von SAM zu einer zehnfachen Antigenexpression gegenüber der nicht-replizierenden mRNA-Impfstoffen. Auch die Länge von der Expression wurde von zwei auf zehn Tage verlängert. (4)

Die Impfung mit SAM-Impfstoffen kann wegen ihrer PAMP eine Infektion mit Krankheitserregern simulieren. Sie besitzen allerdings auch die Fähigkeit Antigenkodierende Sequenz einzuschränken. Allerdings können SAM-Impfstoffe

Immunreaktionen gegen RNA-Replikationsfaktoren auslösen, was die Wirksamkeit verringert. (5,59) SAM kann auch in viralen Replikationspartikeln (VRP) verpackt sein.

(4,60) Diese VRP-Strukturproteine können jedoch auch eine unspezifische Immunantwort auslösen. Man wirkt dem entgegen, indem man die Hüllproteine des VPR als

„defekt“ kodiert, wodurch sich die RNA dann weiter vervielfältigen. (4) Weiters muss das SAM in die Zelle gelangen, was problematisch ist, da SAM negativ geladen und sehr groß ist. (4) Deswegen wird das kationische Polymer Polyethylimin verwendet. Damit könnte man eine 64-fach geringere Dosis des SAM für die gleiche Immunantwort wie nicht

replizierte mRNA auslösen. (4) Dieses Polymer hat jedoch auch einen toxischen Effekt. Um diesen zu verringern, wurde das Polymer „pABOL“ entwickelt. (4,49) So erhöht

pABOL die Proteinexpression nach intramuskulärer bzw. intradermaler Injektion. (4,49) Weiters können LNP angewendet werden, um SAM vor enzymatischem Abbau zu schützen.

Für die Verkapselung der SAM ist CNE auch eine gute Möglichkeit. Die mRNA-CNE-

Impfstoffe erwiesen sich dabei als immunogen und gut verträglich. Das SAM muss dabei in zwei kleinere Transkripte geteilt werden. Dies erhöhe die Proteinexpression im

Vergleich zum ganzen Stück. (4,61,62) Nicht-replizierende mRNA-Impfstoffe haben die vollständige Struktur der reifen mRNA, das für das gewünschte Antigen kodiert. Deren Länge beträgt nur etwa 2-3 kb. Dadurch gibt es keine Einschränkung für die Trägerkapazität des Antigens. (5,45) Die Immunreaktionen könnten dadurch besser kontrolliert werden. Die Lagerung bzw. die Synthese fällt dadurch ebenfalls günstiger aus. So konnte man 1996 eine Anti-Tumor-Immunantwort durch DCs mit verbesserter Fähigkeit zur Antigenpräsentation nachweisen. (5)

Ein weiterer Vektor der mRNA ist die circRNA (kreisförmige RNA). Sie ist aufgrund ihrer ringförmig kovalenten Struktur besonders stabil. Sie sind zudem bei der Tumorsuppression besonders effektiv. Ein möglicher Wirkmechanismus könnte die Initiierung einer antitumoralen Immunität sein. Schließlich gibt es noch die Möglichkeit dsRNA mit einzelsträngiger mRNA zu hybridisieren. Es entsteht dabei eine dendritische Struktur, welche sowohl als Antigenexpressionsträger als auch als Immunadjuvans dient. Man kann dabei durch die Länge, Sequenz und Menge der dsRNA Einfluss auf die Immunstimulation nehmen. (8)

5. mRNA-Impfstoffe in der Krebstherapie

Mit mRNA-Impfstoffen ist es möglich aggressive bzw. metastasierende Tumore zu behandeln, wie zum Beispiel nicht-kleinzelligen Lungenkrebs (NSCLC), kolorektales Karzinom (CRC), Melanom oder das Glioblastom. (4)

Die Ziele der mRNA-Impfstoffe sind Tumor-assoziierte Antigene und Neo-Epitope (kleine Peptide, die von tumorspezifischen somatischen Mutationen abgeleitet sind, auf der Oberfläche von Krebszellen exprimiert sind und von T-Zellen erkannt werden können).

Dabei versucht man eine zelluläre Immunantwort auszulösen. (4,5,63)

Man nutzt das Konzept des "Mutanoms". Man kartiert dabei somatische Mutationen in den einzelnen Tumoren und nutzt dies für eine personalisierte Impfstherapie, womit dann mRNA-Mutanom-Impfstoffe hergestellt werden. (5,63) Mutanome und Neo-Epitope müssen zunächst identifiziert werden. So können dann mRNA-Impfstoffe individuell an die Patient*innen angepasst werden und in weitere Folge können diese dann eine robuste T-Zell-Reaktionen gegen den vom Impfstoff kodierte Neo-Epitope hervorrufen. (5) Damit ein vollständiges Ansprechen auf die Impfung erreicht wird, muss das Protein PD-1 "programmed cell death protein 1" blockiert werden. (5) Des Weiteren wurde eine Co-

Übertragung von mRNA untersucht, welche die von DCs-mRNA-Krebsimpfstoffen ausgelöste Immunantworten verstärken. Dabei stellte man fest, dass ein sog. „Trimix“ die DC-Aktivierung, die Verschiebung des Phänotyps der CD4+ T-Zellen und die Reaktion der zytotoxischen T-Lymphozyten fördern kann. (5,29)

So wurde bei fortgeschrittenem Melanom eine Impfung mit DC-basierter mRNA angewendet. Diese kodiert TriMix und Tumorantigene. Diese DC-basierter mRNA wurde mit Ipilimumab kombiniert. Sie induzierte erfolgreich eine starke tumorassoziierte Antigen-spezifische CD8+ T-Zell-Antwort. (5)

Auch wurden CAR-T-Zellen (Chimeric antigen receptor) entwickelt. Sie sind auf das regulierte Tight Junction-Protein Claudin 6 (CLDN6) spezialisiert. Der CLDN6-kodierenden RNA-Impfstoff stimuliert dabei die CAR-T-Zellen und fördert die Regression großer solider Tumore. (5,64)

Eine weitere Möglichkeit ist ein mRNA-basierter Krebsimpfstoff, der virale Antigene kodiert. Diese wirken therapeutisch, indem sie das Immunsystem stimulieren, Zellen anzugreifen, die virale Antigene des HPV, HBV, EBV und HIV exprimieren. Diese Viren können nämlich Gebärmutterhals-, Leber- und Nasopharynxkarzinome verursachen. Diese mRNA-Impfstoffe befinden sich noch in präklinischen Studien. Die Viren können jedoch mutieren und eine Immuntoleranz entwickeln, was diese Impfstoffentwicklung erschwert. (8)

Es gibt dabei verschiedene Wege den Impfstoff zu verabreichen. So wurde ein RNA-Lipoplex-Impfstoff gegen Melanome entwickelt. Dieser wird intravenös verabreicht. Die mRNA wird dabei an APCs geliefert. Es kommt dann zur Antigenpräsentation. (5,65) Die Impfstoffe können auch intratumoral oder intraperitoneal verabreicht werden. So wurde die intraperitoneale Druck-Aerosol-Chemotherapie (PIPAC) entwickelt. (5,66)

Schließlich wurde auch die Trägeranalyse optimiert. Man untersuchte, welche ionisierbare lipidähnliche Materialien sich als mRNA-Transportmittel eignen. So wurde eine Bibliothek mit ionisierbaren lipidähnlichen Materialien erstellt. Der Screening-Standard erleichterte die In-vivo-mRNA-Transporte und gewährleistete eine effektive und spezifische Immunaktivierung. (5)

5.1. Für Immunstimulantien kodierende mRNA

Als Immunstimulantien kommen meistens Chemokine oder Zytokine in Frage. Diese aktivieren APCs und aktivieren somit auch die T-Zell-vermittelte Immunantwort, wodurch sie Einfluss auf das Tumormikroumfeld nehmen. (4,8) Diese Immunstimulantien wurden durch die mRNA kodiert. Sie können dabei intratumoral, intranodal, i.v. und i.c. verabreicht werden. Sie werden dabei entweder als Monotherapie oder als Kombinationstherapie verabreicht. (4) Als Kombinationstherapie kommen PD-1/PD-L1-Antikörpern oder andere Krebsimpfstoffe in Frage. So gibt es die eTheRNA-Immuntherapie. Man benutzt dabei ein TriMix. Dieses mRNA-basierte Adjuvans enthält drei nackte mRNA-Moleküle. Sie kodieren für CD70 (Aktivierung von CD8⁺ T-Zellen), CD40-Ligand (Aktivierung von CD4⁺ T-Zellen) und konstitutiv aktiven TLR4 (caTLR4) zur Antigenpräsentation mittels DCs. So sei die nackte TriMix-mRNA und die mit ex-vivo-DC beladene TriMix-mRNA als gut verträglich und immunogen eingestuft. (4,67) Sowohl die für TAAs kodierende mRNA als auch die TriMix-mRNA stimulieren die Reifung von APCs und fördern die Funktion der T-Zellen. TriMix mRNA und TAA-mRNA können zusammen verabreicht werden. Dieses Produkt heißt „TriMixDC-MEL“. Eine Kombination mit dem CTLA (zytotoxische T-Lymphozyten-Antigen) blockierenden monoklonalen Antikörper Ipilimumab ist auch möglich, welcher bei Melanompatient*innen im Stadium III/IV gegeben werden kann. (4,68) Moderna dagegen hat zwei auf LNP-Plattform verkapselte mRNA-Produkte für intratumorale und immunstimulierende Wirkung entwickelt (mRNA-2416 und mRNA-2752). Die mRNA-2416 kodiert für OX40L, welches die Funktion und das Überleben von T-Zellen fördert und entweder allein oder in Kombination mit einem PD-L1-Inhibitor Durvalumab verabreicht werden kann. Sie kommt bei Lymphomen und metastasierendem Eierstockkrebs zum Einsatz. (4,69) mRNA-2752 hingegen besteht aus mRNAs, die für OX40L, IL-23 und IL-36 kodieren und wird aktuell bei Lymphomen eingesetzt. In diesem Mix bewirkt IL-36 eine Immunaktivierung, verstärkt somit die antitumorale Wirkung, moduliert die Tumormikroumfeld und korreliert durch diese Effekte mit einer günstigeren Prognose bei Krebspatient*innen.

Ein anderes Präparat ist MED I1191, welches von Moderna und AstraZeneca entwickelt wird, wobei es sich um eine IL-12-mRNA handelt, welche intratumoral verabreicht werden kann. Weiters gibt es auch kationische Lipoplexe von BioNtech, die mit

nukleosidmodifizierter IL-12-mRNA beladen sind und nach einer i.v.-Verabreichung die T-Zell-Antwort verstärken können. (4)

5.2. Die Rolle tumorassoziierter Antigene (TAAs) beim mRNA-Impfstoff

Tumorassoziierte Antigene (TAAs) sind Antigene, die im Tumorgewebe deutlich stärker exprimiert werden als im gesunden Gewebe. (8,70) TAAs können von Tumorzellen exprimiert werden, wobei man beim Melanom Tyrosinase, gp100, MAGE-A3 und MAGE-C2 als TAAs identifizieren konnte. (4) So gibt es bereits das Lipo-MERIT. Bei Lipo-MERIT befindet sich die mRNA in einem Komplex mit DOTAP oder DOTME. Das Verhältnis von DOPE zu mRNA sollte dabei 1,3:2 betragen. So konnte man dadurch effektiv die DCs der Milz in Mäusen erreichen. Dadurch konnten B-, NK-, CD4+- und CD8+-T-Zellen aktiviert werden. (4) Es gibt den mRNA-Impfstoff (BNT111). Dieser kodiert die TAAs NY-ESO-1, MAGE-A3, Tyrosinase und TPTE. Er wurde bei Patient*innen mit fortgeschrittenem Melanom untersucht. Drei Patient*innen zeigten eine T-Zell-Antwort gegen NY-ESO-1 und zwei davon zeigten eine Antwort gegen MAGE-A3. Es gibt auch den Ansatz BNT111 mit Cemiplimab zu kombinieren, was Anwendung beim Anti-PD1-refraktärem, inoperablem Melanom im Stadium III oder IV finden könnte. (4,71) Es gibt auch den Impfstoff CV9202 von CureVac, welcher die TAAs MUC-1, NY-ESO-1, MAGE-C1 und MAGE-C2 als Ziel hat. Dabei werden nackte TAA-mRNA-Impfstoffe mit Protamin/mRNA-Komplexen verabreicht. Auch bei diesem Impfstoff gibt es Tendenzen ihn mit einer zweiten Therapie zu kombinieren. So wird er mit Afatinib im Nicht-kleinzelligen Lungenkrebs kombiniert, um die therapeutische Effizienz zu steigern. Weiters gibt es Tendenzen mRNA-Impfstoffe auch mit Chemo- und/oder Strahlentherapie(n) zu kombinieren, um ihre Effizienz zu steigern. Selbiges konnte schon in einer Studie bei Patient*innen mit inoperablem Nicht-kleinzelligen Lungenkrebs im Stadium III gezeigt werden. (4,72) Es zeigte sich hierbei eine gute Verträglichkeit mit lediglich grippeähnlichen Symptomen und Reaktionen an der Injektionsstelle. Aus funktioneller Perspektive konnte gezeigt werden, dass in 84% der Patient*innen eine erhöhte Anzahl an antigenspezifischen Antikörpern und T-Zellen nachgewiesen werden konnte. (4,72)

Zusätzlich gibt es noch die Möglichkeit, dass man nur DCs mit der eingesetzten mRNA ansteuert. Sie beruht auf der Basis von pp65-Lysosomal-assoziiertem Membranprotein

(LAMP) und könnte zur Behandlung von Glioblastom-Patient*innen eingesetzt werden. Denn das pp65 (Cytomegalievirusprotein) ist sehr tumorspezifisch für das Glioblastom und könnte damit eine pp65-spezifische CD4+- und CD8+-T-Zellantwort auslösen. (4,73)

5.3. Für Neoantigen kodierender mRNA-Impfstoff

Die Verabreichung von TAAs hat allerdings auch gewisse Nachteile:

- 1) TAAs können nämlich auch in gesundem Gewebe vorkommen, wodurch diese Impfstoffe zentrale und periphere Toleranzreaktionen auslösen könnten.
- 2) Weiters weisen Patient*innen eine große Anzahl an TAAs auf, was zur Bildung von Resistenzen führen könnte.
- 3) Bis jetzt sind nur wenige TAAs für eine Vielzahl an Tumoren bekannt. (4,8)

Das Ziel von mRNA-Impfstoffen sollten also tumorspezifische Antigene (Neoantigene) sein. Diese Neoantigene entstehen durch somatische Mutationen und im Gegensatz zu TAAs sind sie nicht in gesunden Zellen vorhanden. Dadurch können Neoantigene vom Immunsystem als fremd erkannt werden und als solches auch bekämpft werden. (4,8,70)

Um einen personalisierten Neoantigen-Impfstoff herstellen zu können, müssen somatische Mutationen des Tumors identifiziert werden. Dabei wird zunächst eine Biopsie vom Tumor entnommen und dieser Tumor wird sequenziert und mit normalem Gewebe als Referenz verglichen. Mutationen mit der höchsten Immunogenität werden dann gescreent und danach wird mit Hilfe eines Algorithmus Epitope identifiziert. (4,8,70)

Es gibt dabei verschiedene Verabreichungssysteme für Neoantigene. Das können synthetische lange Peptide (SLPs) und auf Nukleinsäuren (DNA/mRNA) basierende Impfstoffe sein. Diese können direkt injiziert werden oder auf autologen DC-Transfer oder auf Biomaterialien basierenden Trägersystemen verabreicht werden. SLPs würden dabei CD4+ T-Zellen und CD8+ T-Zellen aktivieren und dadurch war in einer Studie bei vier von sechs Patient*innen nach 25 Monaten kein Krebs mehr nachweisbar. (4,74–76) Ein Nachteil ist allerdings, dass diese Peptide sehr schnell abgebaut werden und somit nicht lange im Körper verbleiben. Zweitens haben sich auch nur eine eingeschränkte Immunität und Drittens ist ihre klinische Anwendung durch ihre unterschiedliche physikalisch-chemische Eigenschaften ebenfalls limitiert. (4,77)

Für Neoantigene kodierende IVT-mRNA kann auch i.n. (intranodal) bei Patient*innen mit fortgeschrittenem Melanom verabreicht werden. Die Aufnahme der Antigene durch APCs

erfolgt dabei effektiver, wenn die Injektion ultraschallgezielt erfolgt. Dies löst bei den Patient*innen eine starke T-Zell-Reaktionen gegen mehrere Neoantigene. Die Nachteile der Methode ist, dass sie viel Übung in der technischen Durchführung benötigt. (4,75)

Es gibt auch nicht-virale Plattformen für die Verabreichung von Neoantigen-kodierender mRNA. So gibt es den Impfstoff mRNA-5671 von Moderna und Merck, welcher für KRAS-Neoantigene kodiert und allein oder in Kombination mit Pembrolizumab (PD-1-spezifischer Antikörper) kombiniert werden kann. Für die Verabreichung von mRNA-5671 werden LNPs verwendet. Dabei wird der Impfstoff alle drei Wochen mit insgesamt neun Zyklen i.m. verabreicht, wobei er in der Studie gut verträglich war. (4,75)

Dann gibt es noch mRNA-4157. Dabei handelt es sich um einen personalisierten Impfstoff, der in LNPs eingekapselt ist. Dieser kann ebenfalls als Monotherapie oder in Kombination mit Pembrolizumab bei Patient*innen mit resezierten soliden Tumoren, einschließlich Melanom, Blasenkarzinom und Nicht-kleinzelligem Lungenkrebs zur Anwendung kommen. Die Monotherapie und Kombinationstherapie können eine neoantigenspezifische T-Zell-Antwort auslösen. Diese erwiesen sich in mehreren Studien als sichere Therapieansätze. So wurden in einer Studie 13 Patient*innen mit der Monotherapie behandelt, wobei 12 von ihnen dann nachweislich tumorfrei waren. (4,78)

6. Materialien und Methoden

Bioinformatische Analyse

Um einen Überblick über die Expression von Genen im Gewebe zu bekommen, wurde der vollständige RNA-Seq-Datensatz vom Genotype-Tissue Expression (GTEx) portal (<https://gtexportal.org/home/>, aufgerufen am 01.06.2024) heruntergeladen.

Die Methodik der Analyse der GTEx-Datenbank wurde teilweise von "Blumberger Y., mRNA-Impfstoffe in Hämatologischen Erkrankungen - Stand der Entwicklung und Ausblick, 2024" übernommen.

[https://online.medunigraz.at/mug_online/pl/ui/\\$ctx;design=ca2;header=max/wbAbs.getDocument?pThesisNr=77626&pAutorNr=82178&pOrgNr=](https://online.medunigraz.at/mug_online/pl/ui/$ctx;design=ca2;header=max/wbAbs.getDocument?pThesisNr=77626&pAutorNr=82178&pOrgNr=)

Insgesamt sind dort gewebsspezifische RNA-Sequencing Daten von 53 unterschiedlichen Gewebetypen für ca 56000 Gene vorhanden (Augeschlüsselt in **STabelle 1**). Die

Expressionshöhe wurde in den RNA-Sequencing Daten der GTEx-Datenbank mit Transcripts Per Kilobase Million (TPM) pro unterschiedlichem Gewebetyp angegeben. RNA-seq stellt dabei eine Methode zur Bestimmung der Nukleotidabfolge der RNA dar. Die TPM wurde dabei errechnet, indem man das Produkt aus der Anzahl der Reads pro Gen, Readlänge und 1.000.000 durch das Produkt aus feature (Exon/Transkript) Länge vom Gen und die Summe aller "beprobten Transkripte" dividiert. Die Auswertung, des gesamten Datensatzes erfolgte mittels R (Version 4.3.1) und die Visualisierung mittels ggplot2 (version 3.4.2). Um die gefundenen Gene im Sinne der gegebenen Literatur zu betrachten, wurde eine systematische PubMed-Abfrage mittels der Rcurl (Version 1.98.1.13) durchgeführt. Um die GTex Gene mit ihren biologisch verfügbaren Daten zu verlinken, wurde die genspezifische ENSG-Nummer als Unique Identifier genommen und mittels der R Bibliothek biomaRt (Version 2.56.1) mit den vorhandenen Informationen verlinkt. Um Tumorspezifische Expressionen von insgesamt 17 unterschiedlichen Krebsarten (Aufgeschlüsselt in **STabelle 2**) des jeweiligen Genes zu bekommen wurde die Webseite des Proteinatlas (<https://www.proteinatlas.org/>, besucht am 01.06.2024) aufgerufen. Um die Gene nach ihrer klinischen Relevanz einzuordnen, wurden die Überlebensdaten von kmplot.org (<https://kmplot.com/analysis/>, besucht am 01.06.2024) mit den gefundenen Genen in 21 unterschiedlichen Krebsarten (Detailliert dargestellt in **STabelle 3**) verbunden. Hierzu wurde die pan-Cancer mRNA-Seq Datenbank benutzt und der cutoff auf „Auto select best cutoff“ gesetzt. Die aus PubMed erstellte Liste wurde nach Häufigkeit der genannten Gene sortiert und es folgte die manuelle Recherche in PubMed (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>) der einzelnen Gene und die Darstellung bzw. Zusammenfassung des aktuellen Wissensstandes.

7. Resultate

Insgesamt befanden sich in der GetEx-Datenbank 58.000 Gene aus 53 unterschiedlichen Gewebetypen (Detailliert in **STabelle 1**). Verbindet man die Gene-id mit der ENSEMBL-Datenbank so ergibt sich für die Daten in der GetEx-Datenbank folgendes Bild: Der Großteil der Gene war Protein-codierender Natur (n=19668, 33.45%), gefolgt von long-non-coding RNAs (lncRNA)(n=13685), prozessierten Pseudogenen (n=10012),

ribosomales RNA (rRNA)(n=598), unprozessierten Pseudogenen (n=2496) und small RNAs (snRNA)(n=2075).

Um potenziell vulnerables Gewebe zu schützen, wurden Gene, die im Gehirn oder im Herzen exprimiert waren (> 0.1 TPM), aus der Analyse ausgeschlossen. So wurden insgesamt 33.518 Gene aus der Analyse exkludiert, wobei 17.578 proteinkodierende Gene dabei waren (Detailliert in **Tabelle 1**).

Tabelle 1. Anzahl der exkludierten Gentypen geordnet nach deren Genfunktion.

| 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 (long-non-coding RNA) | 8405 |
| 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 das Nebenwirkungsspektrum für das restliche Gewebe klein zu halten, wurde in einem weiteren Schritt nur nach Genen gesucht, die nur in einem Gewebetyp überexprimiert sind mit möglichst niedrigen Expressionsraten in den anderen Gewebetypen. Insgesamt konnte so 3.428 Gene identifizieren (Detailliert in **Abbildung 17**). Die meisten Gene fanden sich im Hoden gefolgt von der Leber und dem gesamten Blut (whole_blood). Anhand der Genklassifikation zeigte sich, dass der Großteil der überexprimierten Gene nicht-protein kodierender Natur war (lncRNA (n=1921, 56.03%)), gefolgt von protein-kodierender RNA (n=581, 16.95%) (Detailliert in **Tabelle 3**).

Tabelle 2. Übersicht über alle Gene, die gefunden wurden und deren biologische Funktion.

| 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 |

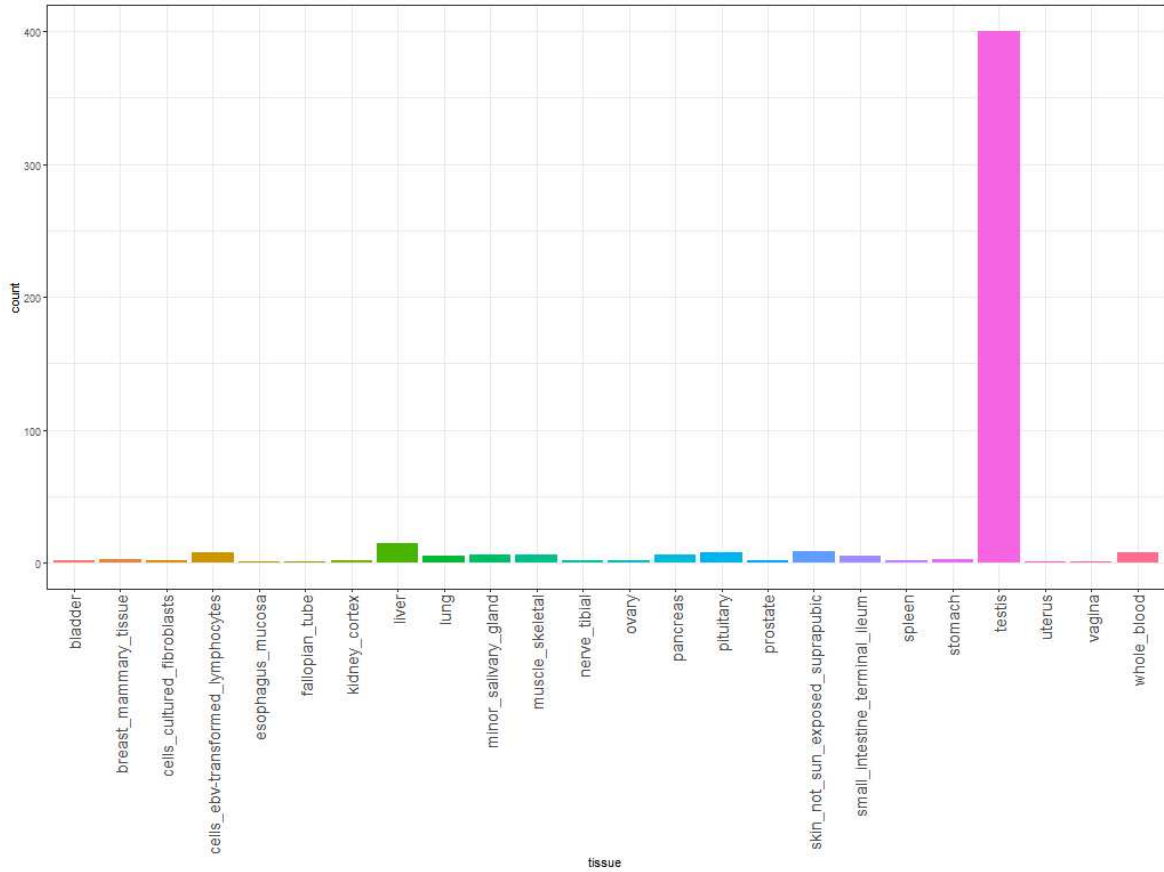


Abbildung 17: Gewebsverteilung der überexprimierten proteincodierenden Gene.

Es wurden nur Gene in die Abbildung mithineingenommen, die laut ENSEMBL-Datenbank eine proteincodierende Funktion haben. Auf der Y-Achse befinden sich die Anzahl der Gene und auf der X-Achse der Gewebetyp, wo das Gen exprimiert ist.

TPM = Transcripts Per Kilobase Million, FPKM = Fragments Per Kilobase of transcript per Million mapped reads

Gastric inhibitory polypeptide

Die größte Expression zeigte sich im Darm, wobei sich mehr Gastric inhibitory polypeptide (GIP) Expression im terminalen Ileum zeigte als im Colon (Detailliert in **Abbildung 18A**). In den untersuchten Krebsarten zeigte sich die größte Expression in Tumoren des Hodens, gefolgt vom Pankreaskarzinom und Magenkrebs (**Abbildung 18B**). In der Überlebensanalyse zeigte sich, dass von allen untersuchten Krebsarten die größten Überlebensvorteile in der Gruppe mit niedrigen GIP-Expressionen im Vergleich zur Gruppe mit hoher GIP-Expression in Brustkrebs (**Abbildung 18C**), Klarzelligem Nierenzellkarzinom (**Abbildung 18D**), Zervixkarzinom (**Abbildung 18E**) und Hepatozellulärem Karzinom (**Abbildung 18F**) gezeigt werden.

Funktionell wird GIP von den K-Zellen des Dünndarms produziert und nach der Nahrungsaufnahme aus dem Darm freigesetzt. (79,80) GIP fördert dann die glukoseabhängige Insulinsekretion, hemmt die Magensäuresekretion und stimuliert die Darmsekretion. Funktionell, reduzieren GLP-1 und GIP den Appetit, die Nahrungsaufnahme und somit auch das Körpergewicht. (81) Durch die GIP induzierte Insulinsekretion fördert es die Interaktion mit regionalen Blutgefäßen und GIP-Rezeptoren, die die Triglycerideinlagerung im weißen Fettgewebe fördern. (82) Bei nüchternen bzw. niedrigen Blutzuckerspiegel erhöht GIP die Glukagonausschüttung und erhöht nur gering die Insulinsekretion. Bei Patient*innen mit Typ-1-Diabetes kommt es bei einer Insulin-induzierten Hypoglykämie zu einer Glukagonfreisetzung und somit zu einem Glukoseanstieg. (82) Hingegen kommt es bei einer Hyperglykämie zu einer vermehrten Insulinausschüttung. Bei Diabetes Typ II kommt es jedoch zu einer insulinotropen Wirkung die GIP beeinträchtigt. (82) Der GIP-Rezeptor spielt auch eine wichtige Rolle bei der Adipozytenentwicklung. (83,84) Bei Männern mit Typ-1-Diabetes konnte beobachtet werden, dass eine sechstägige subkutane GIP-Infusion vorübergehend die Knochenresorption verringert und nicht-veresterte Fettsäuren und β -Oxidation erhöht. Außerdem wurden der hepatische Fettgehalt und die Hauttemperatur erhöht. (83) GIP führt auch zu erhöhter mRNA-Expression von IL-6, IL-1 β und dem IL-1-Rezeptorantagonisten IL-1Ra. Auf TNF α , IL-8 und das monozytochemotaktische Protein (MCP)-1 hat es dagegen keinen Einfluss. Zudem stimuliert GIP die Sekretion von IL-6 und IL-1Ra in Gegenwart von LPS, IL-1 β und TNF α . GIP fördert die Lipolyse, indem es die

(A) Violin-Plot mit dem Expressionsprofil des F9-Genes in 54 unterschiedlichen physiologischen Gewebstypen. Der Graph wurde von gtexportal.org zur Verfügung gestellt. Auf der X-Achse befindet sich die unterschiedlichen Gewebstypen und auf der Y-Achse die gewebsspezifische TPM.

(B) Box-Plot-Chart mit dem Expressionsprofil des F9-Genes in 17 unterschiedlichen Krebsarten. Der Graph wurde von proteinallas.org zur Verfügung gestellt. Auf der X-Achse sind die unterschiedlichen Krebsarten dargestellt und auf der Y-Achse die krebspezifische FPKM.

Kaplan-Meier-Überlebenskurven gruppiert nach hoher und niedriger F9-Expression in (C) Klarzelligem Nierenzellkarzinom, (D) Hepatozellulärem Karzinom, (E) Brustkrebs und (F) Ovarialkarzinom. Die Graphen wurden von kmplot.org zur Verfügung gestellt.

Rote Linie = hohe Expression, Schwarze Linie = niedrige/keine Expression

TPM = Transcripts Per Kilobase Million, FPKM = Fragments Per Kilobase of transcript per Million mapped reads

F9

Die größte Expression zeigte sich in der Leber, wo der Gerinnungsfaktor IX – für den das F9-Gen die Quelle ist – gebildet wird (siehe **Abbildung 19A**). Die größte Expression konnte im Hepatozellulären Karzinom gefunden werden (**Abbildung 19B**).

Interessanterweise war eine hohe Expression von F9 mit einer guten Prognose vergesellschaftet im klarzelligem Nierenzellkarzinom und auch im Hepatozellulären Karzinom (**Abbildung 19C-D**). Umgekehrterweise zeigte sich, dass eine hohe Expression von F9 im Mammakarzinom und im Ovarialkarzinom mit einem schlechten Gesamtüberleben vergesellschaftet war (**Abbildung 19E-F**). F9 kodiert den Gerinnungsfaktor IX, der an der Vitamin-K-abhängigen Antikoagulation beteiligt ist. Er wird dabei durch den Faktor XIa aktiviert und der aktivierte Faktor IX aktiviert dann durch Wechselwirkungen mit Ca²⁺-Ionen, Membranphospholipiden und Faktor VIII den Faktor X. (87)

F9 wird stärker im normalen Gewebe exprimiert als im Gewebe vom Hepatozellulären Karzinom (HCC), wo es sogar signifikant niedriger exprimiert ist. Es ist statistisch signifikant indirekt mit dem T-Stadium verbunden und korreliert negativ mit der vaskulären Invasion, sowie der Wahrscheinlichkeit eines metastatischen Phänotypes. Auffallend ist auch, dass eine hohe F9-Expression negativ mit dem Infiltrationsgrad von CD4⁺ T-Zellen, Neutrophilen, B-Zellen, dendritischen Zellen, Makrophagen und CD8⁺ T-Zellen in HCC-Gewebe korrelierte. (88)

Nach 60 Monaten waren ca. 50% der HCC-Patient*innen mit einer hohen F9-Expression noch am Leben. Mit einer niedrigen F9-Expression waren dagegen nur etwas mehr als 40% am Leben. Nach 120 Monaten waren bei den Proband*innen mit hoher Expression noch etwas mehr als 30% lebend. Bei den Proband*innen mit niedriger Expression waren es ca. 10%. (88)

Bei Darmkrebs kann miR-576-5p das Fortschreiten zu Lebermetastasen beeinflussen kann, indem es das F9-Gen reguliert. (89)

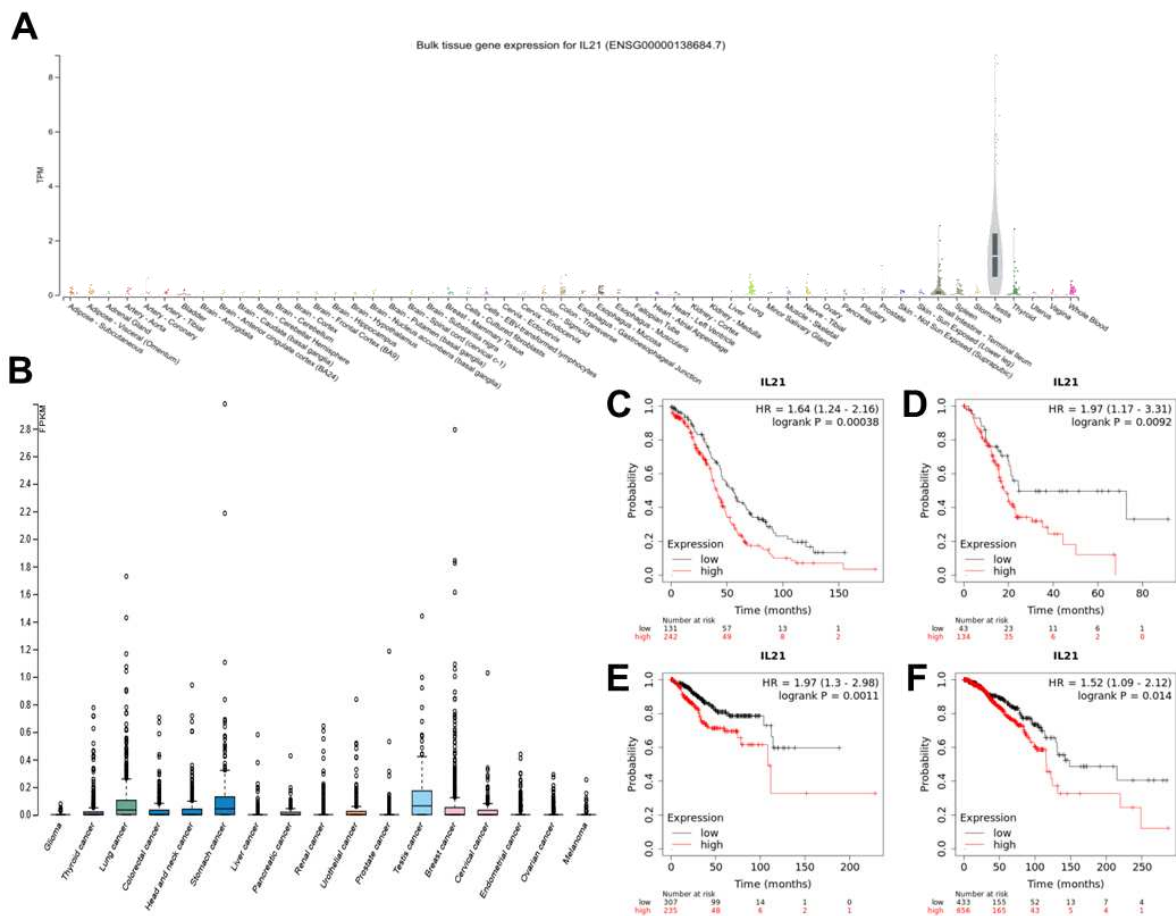


Abbildung 20: Expressionsprofil des IL21-Genes in normalem Gewebe und Krebsgewebe inklusive Kaplan-Meier-Plots von unterschiedlichen Krebsarten.

(A) Violin-Plot mit dem Expressionsprofil des IL21-Genes in 54 unterschiedlichen physiologischen Gewebstypen. Der Graph wurde von gtexportal.org zur Verfügung gestellt. Auf der X-Achse befindet sich die unterschiedlichen Gewebstypen und auf der Y-Achse die gewebsspezifische TPM.

(B) Box-Plot-Chart mit dem Expressionsprofil des IL21-Genes in 17 unterschiedlichen Krebsarten. Der Graph wurde von proteinatlas.org zur Verfügung gestellt. Auf der X-Achse sind die unterschiedlichen Krebsarten dargestellt und auf der Y-Achse die krebspezifische

FPKM.

Kaplan-Meier-Überlebenskurven gruppiert nach hoher und niedriger IL21-Expression in (C) Ovarialkarzinom, (D) Pankreaskarzinom, (E) Uteruskarzinom und (F) Brustkrebs. Die Graphen wurden von kmplot.org zur Verfügung gestellt. Rote Linie = hohe Expression, Schwarze Linie = niedrige/keine Expression

TPM = Transcripts Per Kilobase Million, FPKM = Fragments Per Kilobase of transcript per Million mapped reads

IL-21

IL-21 ist in verschiedenen Gewebetypen exprimiert, wobei die höchste Expression im Hoden zu finden ist, gefolgt vom terminalen Ileum (Vergleiche **Abbildung 20A**). In den unterschiedlichen Krebsarten zeigt sich expressionstechnisch ein pluralistisches Bild, wobei IL-21 am höchsten in Hodentumoren, gefolgt von Magentumoren und Lungenkarzinom exprimiert ist (Detailliert in **Abbildung 20B**). In der Überlebensanalyse zeigte sich, dass IL-21 offensichtlich eine signifikante Rolle in Tumoren des gynäkologischen Formenkreises spielt, wobei hohe IL-21 Expressionsraten im Ovarialkarzinom (**Abbildung 20C**), Uteruskarzinom (**Abbildung 20E**) und Mammakarzinom (**Abbildung 20F**), sowie dem aggressiven Pankreaskarzinom (**Abbildung 20D**) mit einem schlechten Gesamtüberleben vergesellschaftet war. Physiologisch wird die IL-21 Sekretion von Typ-III-IFNs (IFN- λ 1, IFN- λ 2 und IFN- λ 3) stimuliert. (90,91) So stimuliert IFN- α die Bildung von IL-21, aber auch die Neutralisierung von IL-2 kann die mRNA-Spiegel von IL-21 fördern. (90) IL-21 fördert die Produktion von IgG(1) und IgG(3) in B-Zellen. Es ist auch wichtig für die Bildung von T-Follikel-Helferzellen. IL-21-produzierende periphere T-Helferzellen tragen zur Aktivierung extrafollikulärer B-Zellen bei und spielen eine pathogene Rolle bei Autoimmunerkrankungen. (90,91) IL-21 fördert auch die Produktion von Autoantikörpern, wodurch bestimmte Autoimmunkrankheiten ausgelöst werden. Zudem sind die IL-21-Spiegel im peripheren Blut und im Gewebe von Patient*innen mit systematischem Lupus erythematoses (SLE), rheumatoider Arthritis (RA), Typ-1-Diabetes (T1D), Immnthrombozytopenie (ITP), primärem Sjögren-Syndrom (pSS), autoimmuner Schilddrüsenerkrankung (AITD) und Psoriasis erhöht. (92) Der homozygote GG-Genotyp von IL-21 (rs2055979) könnte ebenfalls im Zusammenhang mit Multiple Sklerose stehen.(93) Außerdem ist es an der Bildung von B-Zellen und deren Differenzierung zu Plasmazellen beteiligt, wodurch Immunglobuline produziert werden. Diese Wirkungen

werden hauptsächlich durch die Aktivierung der JAK/STAT-, MAPK- und PI3K-Signalwege vermittelt. (92) Es fördert auch mit IL-6 die Proliferation und Reifung von natürlichen Killerzellen (NK), reifen B- und T-Zellen. Auch die Produktion von Interferon gamma in T-Zellen und NK-Zellen kann es zusammen mit IL-15 und IL-18 fördern. Während der T-Zell-vermittelten Immunantwort wird die Reifung dendritischer Zellen (DC) gehemmt. IL-21 ist auch an der Aktivierung, Differenzierung und Apoptose von B-Zellen während humoraler Immunantworten beteiligt. (94)

Die Expression von IL-21 ist im Kehlkopfkrebs stark erhöht, wobei auch in angrenzenden Geweben eine leichte Erhöhung feststellbar ist, was auf eine Immunreaktion in den angrenzenden Geweben hindeuten könnte. (95)

Im Gegensatz zu Kehlkopfkrebs waren die IL-21-Spiegel in 50% der Patient*innen mit Kolonkarzinom verringert. Andererseits stieg die Expression von IL-21 signifikant mit dem Vorhandensein einer vaskulären Invasion, womit IL-21 die entzündungsbedingte Karzinogenese des Kolonkarzinoms förderte. (96) In Colon-38 Dickdarmkrebszellen kann IL-21 über den IL-21R aktiviert werden, wo es dann wiederum STAT3, STAT1 und ERK1/2 aktiviert. (97)

Auch in Brustkrebs kommt es zu einer Genexpression von IL-21-Rezeptoren. Die Genexpression von IL-21R ist in MDA-231, MCF-7, MDA-361 und BT-20 Zellen vorhanden. IL-21 fördert zudem die Proliferation, Migration und dosisabhängig die Invasion von MDA-231-Zellen, nicht aber von MCF-7- und ZR-75.1-Zellen. Die Invasion von MDA-231-Zellen erfolgt dabei durch die Regulation von MMP-Signalwegen. (98,99) Höhere Expression von IL-21R kommt auch gehäuft im Pankreaskarzinom vor. Die Expression von IL-21R fördert dabei die Proliferationsaktivität von Pankreaskarzinomzellen. (98) Weiters ist auch die Serumkonzentration von IL-21 bei Patient*innen mit Magenkrebs signifikant höher als in gesunden Menschen, wobei gezeigt werden konnte, dass die Konzentration von IL-21 bei Patient*innen mit Lymphknotenmetastasen höher war als bei jenen ohne Lymphknotenmetastasen. (100,101) Eine reduzierte Expression von IL-21 und IL-21-R im Vergleich zum normalen Gewebe fand sich auch im NSCLC. Eine stärkere Expression von IL21-R führt somit dosisabhängig zu Hemmung von Zellwachstum und Metastasierung. (102)

Beim Kolonkarzinompatient*innen beobachtete man nach 60 Monaten, dass ca. 90% derjenigen mit einer hohen IL-21-Expression noch lebten im Vergleich zur Kontrollgruppe. Bei Patient*innen mit einer niedrigen IL-21-Expression waren dagegen nur noch 40% lebend. Nach 80 Monaten waren von den mit höherer IL21-Expression noch ca. 60%

lebend. Von den mit der niedrigeren Expression waren nur noch ca. 30% nicht verstorben. (102)

Bei Brustkrebs konnte gezeigt werden, dass die Prognose auch vom Genotyp der IL-21-Expression abhängig war. Bei Brustkrebspatient*innen, die den CC-Genotyp des IL-21-Genes hatten, waren nach 60 Monaten ca. 80% noch am Leben. Bei Brustkrebspatient*innen mit dem TT-Genotyp lebten nach 60 Monaten ca. 94% und bei Brustkrebspatient*innen mit dem CT-Genotyp lebten nach 60 Monaten noch ca. 90%. (103)

Bei Patient*innen mit einem Pankreaskarzinom konnte man nach 1000 Tagen feststellen, dass von den Patient*innen mit einer niedrigen IL-21-Expression etwas mehr als 30% noch lebten im Vergleich zu Patient*innen mit einer hohen IL-21-Expression, wo es nur ca. 15% waren. (98)

Eine hohe IL-21R-Expression war bei den Patient*innen mit Magenkrebs in direkter Korrelation mit Tumorgröße und der lymphatischen Metastasierung assoziiert. In der Überlebenszeitanalyse zeigte sich, dass Magenkrebspatient*innen mit einer hohen IL-21R-Expression eine kürzere Überlebenszeit und eine höhere Wahrscheinlichkeit für ein Rezidiv hatten als die Patient*innen mit einer niedrigen IL-21R-Expression. (104)

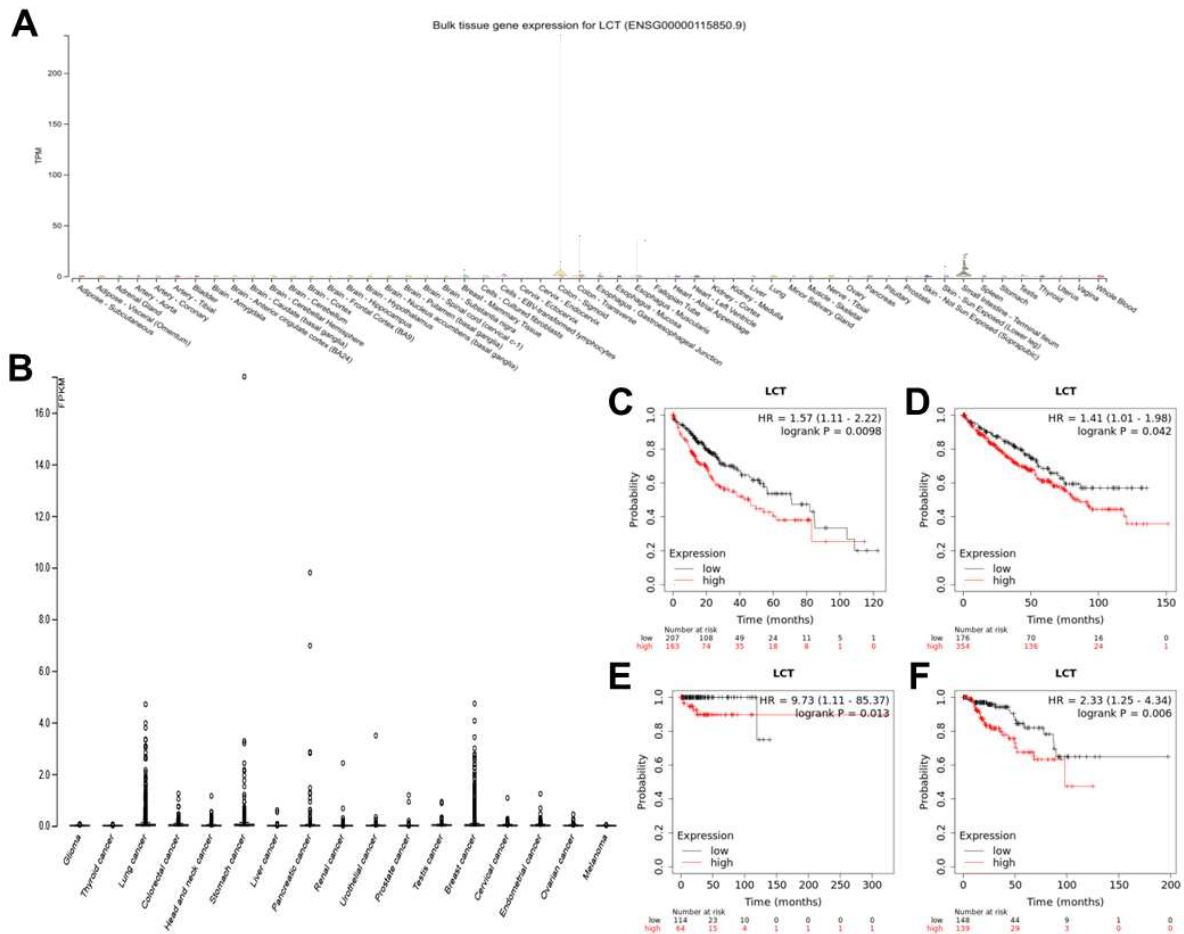


Abbildung 21: Expressionsprofil des LCT-Genes in normalem Gewebe und Krebsgewebe inklusive Kaplan-Meier-Plots von unterschiedlichen Krebsarten.

(A) Violin-Plot mit dem Expressionsprofil des LCT-Genes in 54 unterschiedlichen physiologischen Gewebstypen. Der Graph wurde von gtexportal.org zur Verfügung gestellt. Auf der X-Achse befindet sich die unterschiedlichen Gewebstypen und auf der Y-Achse die gewebsspezifische TPM.

(B) Box-Plot-Chart mit dem Expressionsprofil des LCT-Genes in 17 unterschiedlichen Krebsarten. Der Graph wurde von proteintatlas.org zur Verfügung gestellt. Auf der X-Achse sind die unterschiedlichen Krebsarten dargestellt und auf der Y-Achse die krebspezifische FPKM.

Kaplan-Meier-Überlebenskurven gruppiert nach hoher und niedriger LCT-Expression in (C) Hepatozellulärem Karzinom, (D) Klarzelligem Nierenzellkarzinom, (E) Pheochromozytom/Paraganglioma und (F) Papillärem Nierenzellkarzinom. Die Graphen wurden von kmplot.org zur Verfügung gestellt. Rote Linie = hohe Expression, Schwarze Linie = niedrige/keine Expression

TPM = Transcripts Per Kilobase Million, FPKM = Fragments Per Kilobase of transcript per Million mapped reads

LCT

Das LCT-Gen kodiert für das Enzym Laktase, welches in Dünndarmzellen im Kindesalter produziert wird und das Polysaccharid Lactose in Galactose und Glucose zu spaltet. Vom Expressionsmuster ist es vorzugsweise im gastrointestinalen Trakt zu finden mit den höchsten Expressionen im terminalen Ileum, gefolgt vom Colon (Vergleiche **Abbildung 21A**). In Tumoren ergibt sich ein uneinheitliches Bild, wo es einzelne Tumore geben dürfte, die eine Überexpression zeigen dürften, jedoch sich keine eindeutige Tumorentität herauskristallisierte (Vergleiche **Abbildung 21B**). Wenn allerdings das LCT-Gen in einem Tumor hochexprimiert war, so konnte ein verringertes Gesamtüberleben im Hepatozellulärem Karzinom (**Abbildung 21C**), Klarzelligem Nierenzellkarzinom (**Abbildung 21D**), Pheochromozytom/Paragangliom (**Abbildung 21E**), sowie dem Papillärem Nierenzellkarzinom (**Abbildung 21F**) gezeigt werden.

Ein Mangel dieses Enzyms führt zur Laktoseintoleranz, wodurch Betroffene keine Laktose abbauen können und somit auch keine Milchprodukte verdauen können. Im Alter nimmt die Expression dieses Enzyms ab. Von einer Laktasepersistenz spricht man, wenn das Enzym Laktase auch im Erwachsenenalter erhalten bleibt. (256)

Bei Kolonkarzinompatient*innen, die einen CC-Genotyp des LCT-Gens aufweisen, wurde eine niedrigere Lebenserwartung festgestellt. Nach 20 Monaten waren etwas mehr als 50% noch am Leben. Bei TT- und TC-Genotyp waren es vergleichsweise ca. 80%. (105)

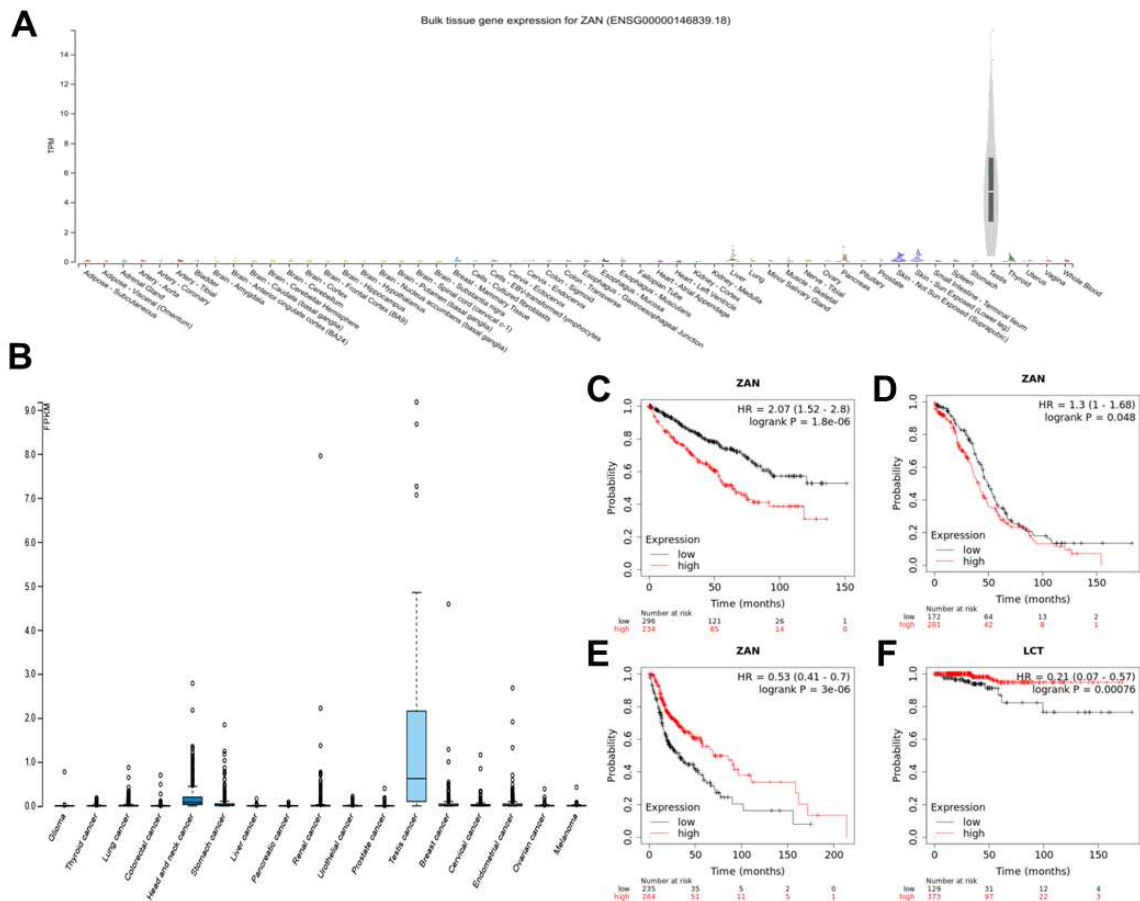


Abbildung 22: Expressionsprofil des ZAN-Genes in normalem Gewebe und Krebsgewebe inklusive Kaplan-Meier-Plots von unterschiedlichen Krebsarten.

(A) Violin-Plot mit dem Expressionsprofil des ZAN-Genes in 54 unterschiedlichen physiologischen Gewebstypen. Der Graph wurde von gtexportal.org zur Verfügung gestellt. Auf der X-Achse befindet sich die unterschiedlichen Gewebstypen und auf der Y-Achse die gewebsspezifische TPM.

(B) Box-Plot-Chart mit dem Expressionsprofil des ZAN-Genes in 17 unterschiedlichen Krebsarten. Der Graph wurde von proteintatlas.org zur Verfügung gestellt. Auf der X-Achse sind die unterschiedlichen Krebsarten dargestellt und auf der Y-Achse die krebspezifische FPKM.

Kaplan-Meier-Überlebenskurven gruppiert nach hoher und niedriger ZAN-Expression in (C) Klarzelligem Nierenzellkarzinom, (D) Ovarialkarzinom, (E) Kopf-Hals-Tumore und (F) Thyroidkarzinom. Die Graphen wurden von kmpplot.org zur Verfügung gestellt. Rote Linie = hohe Expression, Schwarze Linie = niedrige/keine Expression

TPM = Transcripts Per Kilobase Million, FPKM = Fragments Per Kilobase of transcript per Million mapped reads

(A) Violin-Plot mit dem Expressionsprofil des CCR3-Genes in 54 unterschiedlichen physiologischen Gewebstypen. Der Graph wurde von gtexportal.org zur Verfügung gestellt. Auf der X-Achse befindet sich die unterschiedlichen Gewebstypen und auf der Y-Achse die gewebsspezifische TPM.

(B) Box-Plot-Chart mit dem Expressionsprofil des CCR3-Genes in 17 unterschiedlichen Krebsarten. Der Graph wurde von proteinallas.org zur Verfügung gestellt. Auf der X-Achse sind die unterschiedlichen Krebsarten dargestellt und auf der Y-Achse die krebspezifische FPKM.

Kaplan-Meier-Überlebenskurven gruppiert nach hoher und niedriger CCR3-Expression in (C) Hepatozellulärem Karzinom, (D) Klarzelligem Nierenzellkarzinom, (E) Papillärem Nierenzellkarzinom und (F) Brustkrebs. Die Graphen wurden von kmplot.org zur Verfügung gestellt. Rote Linie = hohe Expression, Schwarze Linie = niedrige/keine Expression

TPM = Transcripts Per Kilobase Million, FPKM = Fragments Per Kilobase of transcript per Million mapped reads

CCR3

CCR3 kodiert für ein Protein, das der Familie 1 der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren angehört. An diesen Rezeptor binden andere Chemokine. Vom Expressionsmuster ist der Großteil von CCR3 in Blutzellen exprimiert (Median TPM 2.5), gefolgt von der Milz, der Haut und der Lunge (Detailliert in **Abbildung 23A**). Ungleich der physiologischen Expression ist IL-21 in vielen Krebsarten wie zum Beispiel dem Lungenkarzinom, Schilddrüsenkarzinom oder dem Urothelkarzinom exprimiert (Vergleiche **Abbildung 23B**). Bei sehr hoher IL-21 Expression konnte gezeigt werden, dass sich im Hepatozellulären Karzinom (**Abbildung 23C**), Klarzelligem Nierenzellkarzinom (**Abbildung 23D**), Papillärem Nierenzellkarzinom (**Abbildung 23E**), sowie im Mammakarzinom (**Abbildung 23F**) ein Überlebensnachteil ergab.

Physiologisch funktionell wird es weiters in den Epithelzellen der Atemwege exprimiert, wo es eine wichtige Rolle bei der Entstehung von allergischen Atemwegserkrankungen wie z.B. der allergischen Rhinitis, sowie dem allergischen Asthma spielt. CCR3 aktiviert dabei Hauptzellen des respiratorischen Epithels, wodurch es über eine nachgeschaltete Kaskade zu einer allergischen Entzündung kommt. (111) CCR3 fördert zudem in Lungenepithelzellen die Freisetzung von IL-8 und ist somit an Lipopolysaccharid (LPS)-induzierten Lungenentzündungen beteiligt. So erhöht LPS die CCR3-Expression in einer

zeitabhängigen Weise in NCI-H292- und A549-Zellen. (112) Er ist auch als Co-Rezeptor für den Eintritt von HIV-1 bekannt. (113) Ein CCR3-Anstieg wurde auch bei Patient*innen mit infektiöser Mononukleose beobachtet, wo sich ein direkter Zusammenhang mit der Dauer des Fiebers und dem Verhältnis der ungewöhnlichen Lymphozyten zeigt. (114) Eine verstärkte Expression von CCR3 auf Synovialzellen kommt auch bei Rheumatoider Arthritis (RA) vor, wo Eotaxin-1 die Expression von CCR3 in fibroblastenähnlichen Synoviozyten (FLS) stimuliert. (115)

Im Magenkarzinom konnte man eine höhere Expression von CCR3 finden, wo CCR3 durch CCL5 stimuliert wird. (116)

Im Lungenkarzinom ist die Expression von CCR3 im Tumorgewebe ebenfalls signifikant erhöht, wo CCR3 eine wichtige Rolle bei der Entwicklung von Adenokarzinomen spielt. (117)

Beim Hautkrebs ist die CCR3-Expression im Melanom und im Plattenepithelkarzinom erhöht, jedoch im Basalzellkarzinom de facto gar nicht exprimiert.

Bei Melanom-Zelllinien war CCR3 am stärksten in SK-Mel-24-Zellen (gefolgt von G361 und SK-Mel-2) exprimiert. Hierbei korreliert die CCR3-Expression mit dem Grad der Malignität und ist somit vergesellschaftet mit einer malignen Zelltransformation, Wachstum und Invasion, sowie der Metastasierung. (118)

Bei Schilddrüsenkarzinomen ist eine signifikant erhöhte Expression von CCR3 in papillären Schilddrüsenkarzinom feststellbar. (119)

Auch in Prostatakrebszelllinien konnte eine erhöhte Expression von CCR3 festgestellt werden. Eotaxin-1 fördert dabei über den CCR3-ERK-Signalweg die Invasion von Prostatakrebszellen mit einer Hochregulierung der MMP3-Expression. Periprostatische Adipozyten könnten hier als treibende Kraft für den CCR3-exprimierenden Prostatakrebs fungieren. (120,121)

Die intratumorale Expression von CCR3 war zudem mit Brustkrebs assoziiert. Bei Tumoren mit hoher CCR3-Expression handelte es sich meistens um luminal-ähnliche Tumore als um TNBC (Tripple negative breast cancer) - oder HER2 (human epidermal growth factor receptor 2) -angereicherte Tumore. Die CCR3-Expression korrelierte dabei nicht mit der Tumorgöße, dem Lymphknotenstatus und dem Alter. HER2/Neu positive Tumore waren mit größerer Wahrscheinlichkeit intratumoral CCR3-negativ. (122) CCL5 aktiviert dabei CCR3 und das führt zur Th2-Polarisierung von CD4+ T-Zellen, was die prometastatische Aktivität von tumorassoziierten Zellen verstärkt. (123)

Eine vermehrte CCR3-Expression findet sich auch in Nierenzellkarzinomzellen, wo die CCR3-Aktivierung zu einer Hochregulierung des intrazellulären Ca²⁺-Signalweges führt. Die Aktivierung von CCR3 führt zur Zellproliferation und somit korreliert diese mit dem Malignitätsgrad. (124)

CCR3 kommt mit höherer Expression in Krebszellen von Glioblastomen vor und fördert dort die Proliferation, Migration und Invasion von Tumorzellen. (125)

Prognostisch spielt die CCR3-Expression im Magenkarzinom eine Rolle, wo die CCR3-Expression in direkter Korrelation mit dem klinischen Stadium steht. (116)

Im Lungenkarzinom zeigte sich, dass Patient*innen mit erhöhter CCR3-Expression ein schlechteres Erstprogressionsüberleben haben und es zeigte sich auch eine indirekte Korrelation von CCR3-Expression und Gesamtüberleben. (117)

Im Hautkrebs korrelierte die CCR3-Expression mit dem Malignitätsgrad und damit einhergehend indirekt korrelierend mit der Gesamtüberlebenschancen. (118)

Im Vergleich hierzu zeigte sich im Mammakarzinom, dass eine erhöhte CCR3-Expression mit einem längeren rezidivfreien Überleben bei luminal A-, luminal B- und HER2/Neu positivem Brustkrebsfällen assoziiert war. (122)

Beim Nierenzellkarzinom gibt es eine direkte Korrelation zwischen CCR3-Expression und dem Malignitätsgrad. Was somit mit einer geringeren Lebenserwartung assoziiert war. (124)

Schließlich ist auch bei Glioblastompatient*innen eine hohe CCR3-Expression mit einem schlechten Outcome vergesellschaftet. So zeigte es sich, dass nach 24 Monaten über 90% der Glioblastompatient*innen mit hoher CCR3-Expression verstorben waren. Im Vergleich hierzu waren 80% der Glioblastompatient*innen mit niedriger CCR3-Expression verstorben. (125)

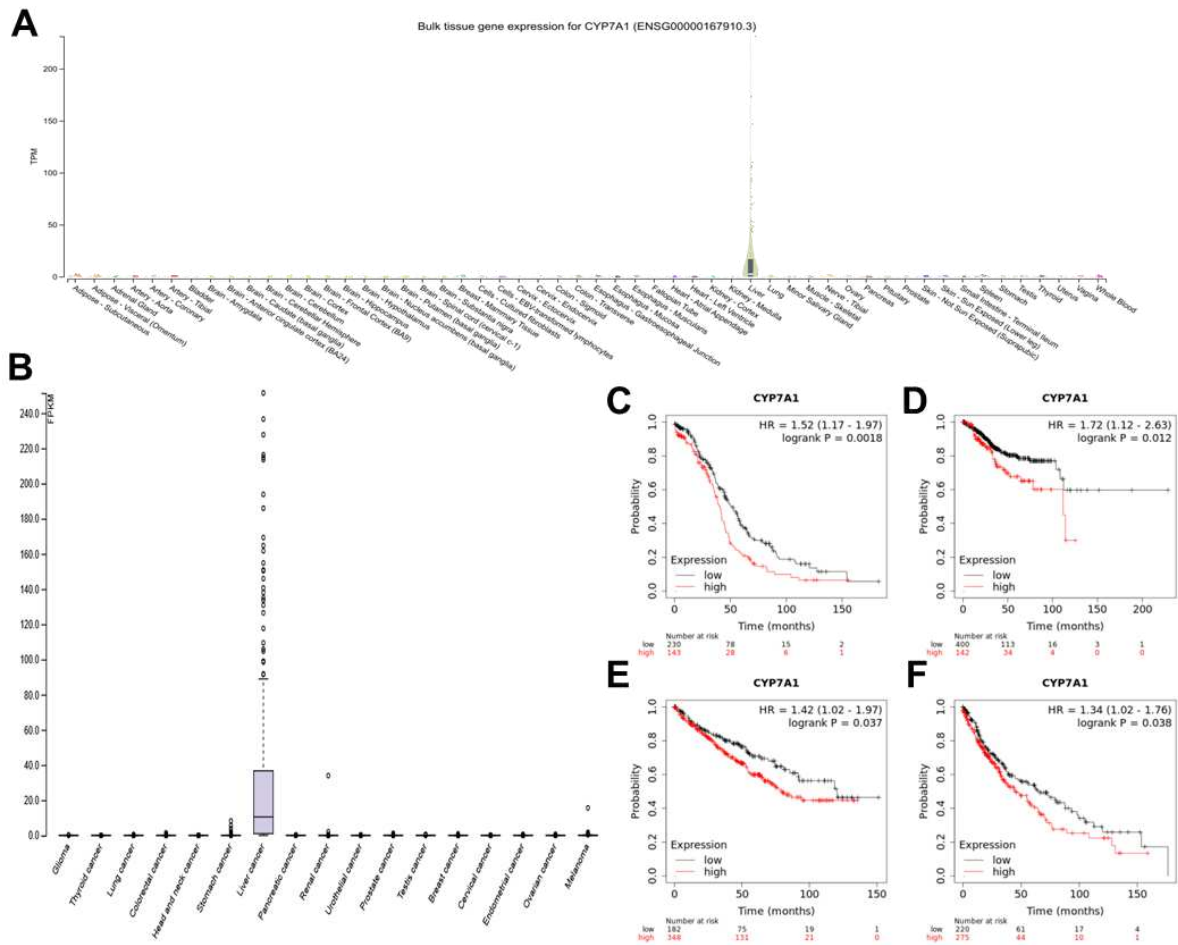


Abbildung 24: Expressionsprofil des CYP7A1-Genes in normalem Gewebe und Krebsgewebe inklusive Kaplan-Meier-Plots von unterschiedlichen Krebsarten.

(A) Violin-Plot mit dem Expressionsprofil des CYP7A1-Genes in 54 unterschiedlichen physiologischen Gewebstypen. Der Graph wurde von gtexportal.org zur Verfügung gestellt. Auf der X-Achse befindet sich die unterschiedlichen Gewebstypen und auf der Y-Achse die gewebsspezifische TPM.

(B) Box-Plot-Chart mit dem Expressionsprofil des CYP7A1-Genes in 17 unterschiedlichen Krebsarten. Der Graph wurde von proteinatlas.org zur Verfügung gestellt. Auf der X-Achse sind die unterschiedlichen Krebsarten dargestellt und auf der Y-Achse die krebspezifische FPKM.

Kaplan-Meier-Überlebenskurven gruppiert nach hoher und niedriger CYP7A1-Expression in (C) Ovarialkarzinom, (D) Endometriumkarzinom, (E) Klarzelligem Nierenzellkarzinom und (F) Plattenepithelkarzinom der Lunge. Die Graphen wurden von kmplot.org zur Verfügung gestellt. Rote Linie = hohe Expression, Schwarze Linie = niedrige/keine Expression

TPM = Transcripts Per Kilobase Million, FPKM = Fragments Per Kilobase of transcript per Million mapped reads

CYP7A1

CYP7A1 ist fast ausschließlich in der Leber exprimiert (Siehe **Abbildung 24A**), sowie im Hepatozellulären Karzinom (**Abbildung 24B**). Interessanterweise findet sich bei der Überlebensanalyse das Hepatozelluläre Karzinom nicht, sondern das Ovarialkarzinom (**Abbildung 24C**), Endometriumkarzinom (**Abbildung 24D**), Klarzellige Nierenzellkarzinom (**Abbildung 24E**) und das Plattenepithelkarzinom der Lunge (**Abbildung 24F**). Funktionell, kodiert das CYP7A1-Gen für das Enzym Cholesterin-7 α -Hydroxylase. Dieses Enzym reguliert den Cholesterinstoffwechsel, indem es enzymatisch Cholesterin in 7 α -hydroxycholesterol umwandelt. 7 α -hydroxycholesterol wird dann durch andere Enzyme in Gallensäuren (GS) umgewandelt. (126)

In einem alternativen Weg der GS-Synthese wird Cholesterin durch Cholesterin-7 α -Hydroxylase in 25(R)-26-Hydroxycholesterin umgewandelt, welches dann später zu Cholsäure und Chenodeoxycholsäure reduziert wird, wobei die Cholesterin-7 α -Hydroxylase der ratenlimitierende Schritt ist der GS-Synthese ist. (126) Niedrige Gallensäurekonzentrationen stimulieren dabei die Expression von CYP7A1, wodurch vermehrt GS synthetisiert wird. Eine hohe Konzentration von GS im Darm reduziert dagegen die Expression des CYP7A1-Gens. (126) GS aktivieren nämlich den FXR (farnesoid X receptor) in Hepatozyten, welcher wiederum Small Heterodimer Partner (SHP) stimuliert, wodurch die CYP7A1-Aktivierung gehemmt wird. GS fördern auch die Freisetzung des Fibroblasten-Wachstumsfaktors 19 (FGF19). FGF19 blockiert dann über ERK/c-Jun N-terminale Kinase (JNK) CYP7A1, wodurch auch die GS-Synthese gehemmt wird. (126)

Eine niedrige Expression des CYP7A1-Gens ist auch mit einem erhöhten Risiko für Insulinresistenz und Diabetes Mellitus assoziiert. (126)

Im Krebs war CYP7A1 auch vermehrt in Brustkrebszellen exprimiert, wo es vor allem in TNBC vorkam und mit einem höheren Ki67 vergesellschaftet war. Erstaunlicherweise, wurde beobachtet, dass bei einer höheren CYP7A1-Expression weniger Lymphknotenmetastasen vorlagen. Das durch CYP7A1 entstandene Produkt, das 7 α -hydroxycholesterol korrelierte jedoch mit einem höheren Grad an Ki67 und einem höheren histologischen Grad bei Brustkrebspatient*innen. (127)

Im Gallenblasenkrebs (GBC) wurde beobachtet, dass der CC-Genotyp des CYP7A1-Genes häufiger als bei der gesunden Kontrollgruppe vorlag. So lag der CC-Genotyp bei GBC-Patient*innen ohne Steine bei 25.8% und bei der gesunden Kontrollgruppe 14.5%, womit vermutet wird, dass Träger des CC-Genotypes des CYP7A1-Genes ein sehr hohes Risiko für GBC haben. (128)

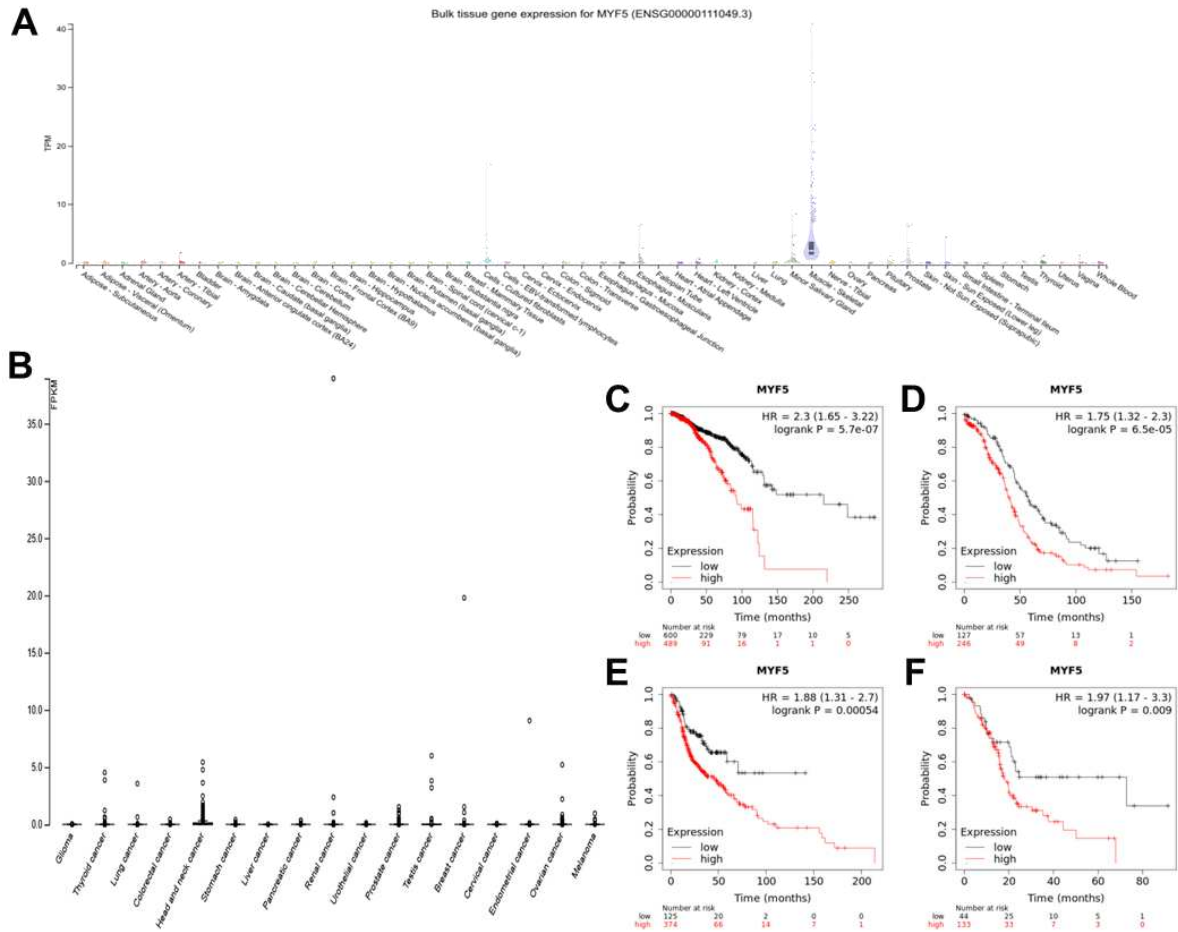


Abbildung 25: Expressionsprofil des MYF5-Genes in normalem Gewebe und Krebsgewebe inklusive Kaplan-Meier-Plots von unterschiedlichen Krebsarten.

(A) Violin-Plot mit dem Expressionsprofil des MYF5-Genes in 54 unterschiedlichen physiologischen Gewebstypen. Der Graph wurde von gtxportal.org zur Verfügung gestellt. Auf der X-Achse befindet sich die unterschiedlichen Gewebstypen und auf der Y-Achse die gewebsspezifische TPM.

(B) Box-Plot-Chart mit dem Expressionsprofil des MYF5-Genes in 17 unterschiedlichen Krebsarten. Der Graph wurde von proteoinatlas.org zur Verfügung gestellt. Auf der X-Achse sind die unterschiedlichen Krebsarten dargestellt und auf der Y-Achse die krebspezifische FPKM.

Kaplan-Meier-Überlebenskurven gruppiert nach hoher und niedriger MYF5-Expression in

(C) Brustkrebs, (D) Ovarialkarzinom, (E) Kopf-Hals-Tumore und (F) Pankreaskarzinom. Die Graphen wurden von *kmplot.org* zur Verfügung gestellt. Rote Linie = hohe Expression, Schwarze Linie = niedrige/keine Expression

TPM = Transcripts Per Kilobase Million, FPKM = Fragments Per Kilobase of transcript per Million mapped reads

MYF5

Das MYF5-Gen ist ein Transkriptionsfaktor, der die Entwicklung des Muskels steuert, wo es auch hauptsächlich exprimiert ist (Vergleiche **Abbildung 25A**). Dabei ist es für die primäre Muskelfaserbildung während der Embryonalentwicklung zuständig und wird in den somatischen Mesodermzellen exprimiert. MYF5 wird dann in Muskelvorläuferzellen aktiviert, woraufhin sich diese Vorläuferzellen zu Myoblasten differenzieren und in weiterer Folge dann zu Muskelzellen reifen. Weiters ist MYF5 auch an der Regeneration von Muskelzellen beteiligt. (129) Rezessive MYF5-Mutationen verursachen außerdem externe Ophthalmoplegien und Rippen-, sowie Wirbelsäulenanomalien. (130)

Krebspezifisch, fand sich in der TCGA-Datenbank kein eindeutiger Fokus für eine Überexpression in den unterschiedlichen Krebsarten (Siehe **Abbildung 25B**).

Überlebensvorteile konnten gezeigt werden im Brustkrebs, Ovarialkarzinom, in Kopf-Hals-Tumoren, sowie Pankreaskarzinomen, wenn MYF5 nicht exprimiert war (Detailliert in den **Abbildungen 25C-F**). In der Literatur konnte weiters gezeigt werden, dass MYF5 im humanen embryonalen Rhabdomyosarkom exprimiert ist, sowie in geringerer Menge auch im alveolären Rhabdomyosarkom. MYF5 fördert dabei im Rhabdomyosarkom die Tumorausbreitung, indem es eine Umgebung schafft, die das Wachstum fördert. (131,132)

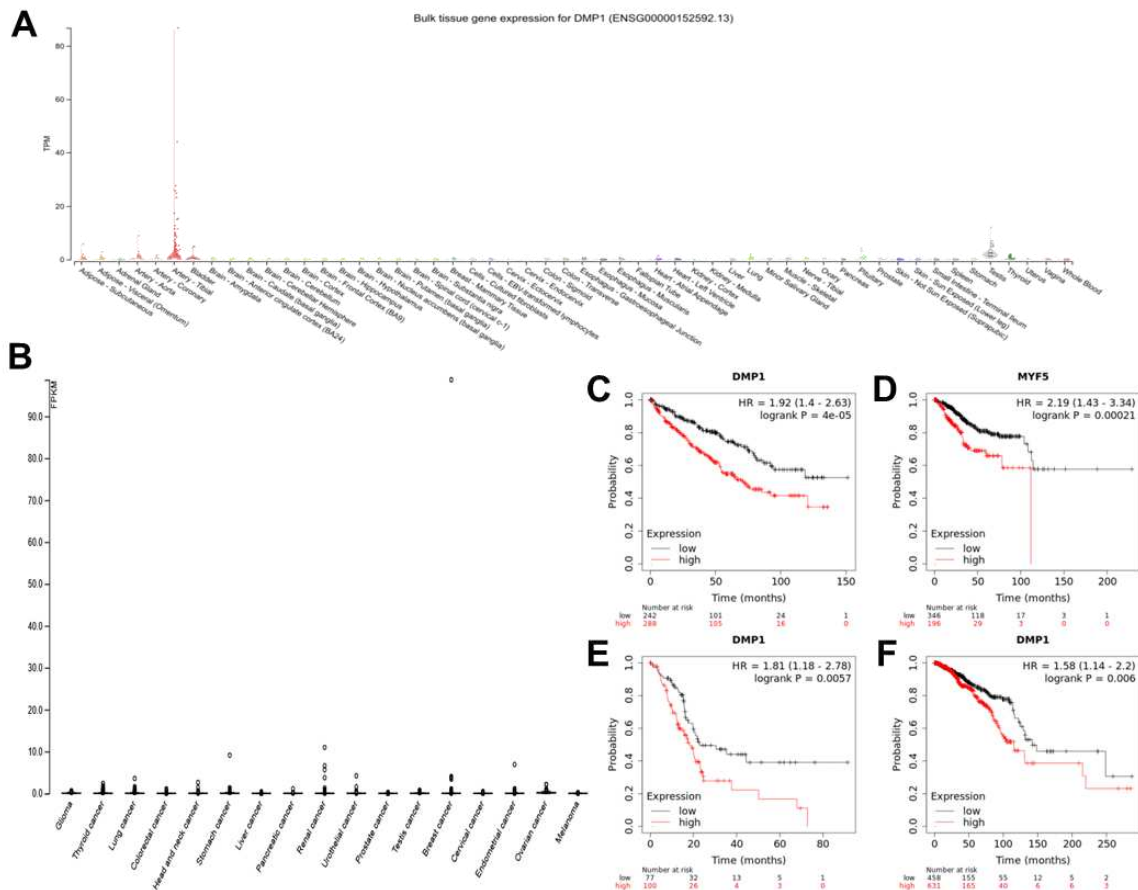


Abbildung 26: Expressionsprofil des DMP1-Genes in normalem Gewebe und Krebsgewebe inklusive Kaplan-Meier-Plots von unterschiedlichen Krebsarten.

(A) Violin-Plot mit dem Expressionsprofil des DMP1-Genes in 54 unterschiedlichen physiologischen Gewebstypen. Der Graph wurde von gtexportal.org zur Verfügung gestellt. Auf der X-Achse befindet sich die unterschiedlichen Gewebstypen und auf der Y-Achse die gewebsspezifische TPM.

(B) Box-Plot-Chart mit dem Expressionsprofil des DMP1-Genes in 17 unterschiedlichen Krebsarten. Der Graph wurde von proteinatlas.org zur Verfügung gestellt. Auf der X-Achse sind die unterschiedlichen Krebsarten dargestellt und auf der Y-Achse die krebspezifische FPKM.

Kaplan-Meier-Überlebenskurven gruppiert nach hoher und niedriger DMP1-Expression in (C) Klarzelligem Nierenzellkarzinom, (D) Endometriumkarzinom, (E) Pankreaskarzinom und (F) Brustkrebs. Die Graphen wurden von kmpplot.org zur Verfügung gestellt. Rote Linie = hohe Expression, Schwarze Linie = niedrige/keine Expression

TPM = Transcripts Per Kilobase Million, FPKM = Fragments Per Kilobase of transcript per Million mapped reads

DMP1

Physiologisch wird DMP1 hauptsächlich im Hoden und in den arteriellen Gefäßen exprimiert (Detailliert in **Abbildung 26A**). Interessanterweise ist es nicht in Hodentumoren überexprimiert und nur minimal in allen anderen Krebsarten exprimiert, was in physiologischerweise wahrscheinlich die Gefäßkomponente eines jeden Tumors ist (siehe **Abbildung 26B**). Sofern DMP1 allerdings überexprimiert ist, konnte im klarzelligen Nierenzellkarzinom, im Endometriumkarzinom, im Pankreaskarzinom und im Brustkrebs ein Überlebensnachteil gezeigt werden (Siehe **Abbildung 26C-F**).

Funktionell ist DMP1 ein extrazelluläres Matrixprotein und gehört zur Familie der N-glykosylierten Glykoproteine. Es kommt dabei in Zellen des Knochen- und Zahngewebes vor und enthält eine große Anzahl von sauren Domänen, mehrere Phosphorylierungsstellen, eine funktionelle arg-gly-asp-Zellbindungssequenz und eine DNA-Bindungsdomäne.

Physiologisch ist DMP1 wichtig für die Mineralisierung von Knochen und Dentin. (133–135) In undifferenzierten Osteoblasten stimuliert es die Expression von osteoblastenspezifischen Genen, wie Osteocalcin und alkalische Phosphatase 1. Während der Osteoblastenreifung wird das DMP1 phosphoryliert und in die extrazelluläre Matrix exportiert. Dort steuert es die Bildung der mineralisierten Matrix. (133) Störungen der DMP1-Expression im Knochen führt zu einer gestörten Osteozytenreifung, Mineralisierung und einer erhöhten Produktion des Fibroblasten-Wachstumsfaktors 23 (FGF23). Mutationen im DMP1-Gen sind auch mit der hereditären hypophosphatämischen Rachitis assoziiert. (136–138) Bei Menschen mit chronischer Niereninsuffizienz sind niedrige zirkulierende DMP1-Spiegel mit erhöhtem kardiovaskulärem Risiko assoziiert. DMP1-Supplementierung senkt dabei die zirkulierenden FGF23-Spiegel und verbessert die Knochenmineralisierung, sowie die kardialen Ergebnisse bei Patient*innen mit chronischer Niereninsuffizienz. (139) Auch sind niedrige DMP1-Spiegel signifikant mit dem Vorhandensein von Gefäßverkalkung und unabhängig mit dem Auftreten von kardiovaskulären Ereignissen bei prävalenten Peritonealdialysepatient*innen assoziiert. (140)

Im Adeno- und Plattenepithelkarzinom der Lunge zeigte sich, dass es dort eine hohe DMP1-Expression gab und es vermutet wurde, dass DMP1 in der Entwicklung von Knochenmetastasen beteiligt ist. DMP1 kann auch den Komplementfaktor H an Zelloberflächenrezeptoren binden und ihn vor der Lyse durch den alternativen Komplementweg schützen. Dadurch können Tumorzellen der Wirtsüberwachung besser entgehen und haben damit eine höhere Überlebenschance, welche mit einem schlechteren

Outcome assoziiert ist. Knochenmatrixproteine könnten zudem das Tumorwachstum, die tumorassoziierte Angiogenese, den Schutz vor der Immunüberwachung, die Adhäsion zwischen Zellen und Knochen und Knochenmikroumgebung fördern. (141)

Bei Brustkrebspatient*innen wurde DMP1 in 63.5% der untersuchten Brusttumoren exprimiert. Es gibt dabei einen umgekehrten Zusammenhang zwischen der DMP1-Expression und der Größe und dem Grad des Tumors. Hohe DMP1-Expressionswerte sind in den primären Brustläsionen mit einem geringeren Risiko für die Entwicklung von Skelettmetastasen assoziiert. Die DMP1-Expression ist in Brustkrebszelllinien mit geringerer Invasivität (MCF-7- und T47-D-Zellen) stärker exprimiert als in hochinvasiven Zelllinien, wie MDA-MB-231- und Hs578T-Zellen. (142)

Das Krankheitsfreie Überleben ist bei Brustkrebspatient*innen mit hoher DMP1-Expression höher als bei denjenigen mit niedriger DMP1-Expression.

Nach 100 Monaten lag das Krankheitsfreie Überleben bei Brustkrebspatient*innen mit hoher DMP1-Expression bei ca. 55% im Vergleich zu 25% bei Brustkrebspatient*innen mit niedriger DMP1-Expression. (142)

Weiters wurde in PMTs (Phosphaturischer mesenchymaler Tumor) eine erhöhte DMP1-Expression beobachtet. Hierbei dient DMP1 als ein wertvoller pathologischer Marker für PMTs. (143) Schließlich wurde auch erhöhte DMP1-Expression durch immunreaktive Färbung in Tumorzellen von Prostatakrebs nachgewiesen. (144)

SLCO1B1

Das SLCO1B1-Gen kodiert für das OATP1B1 (Organic Anion Transporting Polypeptide 1B1). Dieses ist für die Na (+) -unabhängige Aufnahme von organischen Anionen zuständig. Des Weiteren befördert es die Bilirubin-Glucuronide aus dem Blut in die Hepatozyten, wo es auch fast ausschließlich exprimiert ist (Siehe **Abbildung 27A**). Somit ist es auch nicht verwunderlich, dass es fast ausschließlich im hepatozellulären Karzinom exprimiert ist (**Abbildung 27B**). Aufgrund der physiologischen Expression im Lebergewebe, konnte kein Überlebensvorteil in der TCGA-Datenbank gefunden werden, jedoch für Brustkrebs, Kopf-Hals-Tumore und Adenokarzinome der Lunge (**Abbildung 27C-E**). Interessanterweise fand sich in der TCGA-Datenbank auch ein Überlebensvorteil im Klarzelligen Nierenzellkarzinom, wenn SLCO1B1 hoch exprimiert war (Vergleiche Kaplan-Meier-Plot in **Abbildung 27F**). SLCO1B1 ist in der Entgiftung von Arzneimittelverbindungen (Statine, Valsartan und Rifampicin) beteiligt, welche ebenfalls aus dem Blut in die Leber aufgenommen werden. Beim Transport von Statinen, ACE-Hemmern und Angiotensin-I -Rezeptor-Antagonisten in der Leber fungiert Hydrogencarbonat als Gegenanion, das gegen organische Anionen ausgetauscht wird. (145–149) Zudem ist es für den Transport von Coproporphyrin I und III wichtig. Auch transportiert es organischen Verbindungen über die Blut-Hoden-Schranke in den Hoden. (150)

Die c.521T>C-Variante dieses Gens ist mit verringerter Transportaktivität von OATP1B1 assoziiert, was zu einer verminderten Aufnahme bestimmter Medikamente durch die Leberzellen führt, wodurch es zu höheren Medikamentenkonzentrationen und einem erhöhten Risiko von unerwünschten Arzneimittelreaktionen kommt. (145) Homozygote Träger*innen der c.521T>C-Variante haben auch ein erhöhtes Risiko für Myopathien oder Rhabdomyolysen bei der Einnahme von Statinen, insbesondere von Simvastatin und Atorvastatin. (145) Träger des C-Allels des SLCO1B1-Polymorphismuses haben zudem ein höheres Hepatotoxizitätsrisiko nach Methothrexateinnahme als Patient*innen mit dem TT-Genotyp. (151)

Die OATP1B1-Expression ist im Kolonkarzinom erhöht, nimmt mit dem Grading direkt proportional zu und ist somit mit einer schlechten Prognose assoziiert. (152,153)

Beim Gallenblasenkarzinom war das SLCO1B1 rs2306283 GG/AG mit einem höheren Risiko für Blasenkrebs assoziiert als bei Patient*innen mit SLCO1B1 rs2306283 AA. Es gibt dabei einen Zusammenhang zwischen Genotyphäufigkeiten von SLCO1B1 rs2306283

und dem Krebsstadium. Die Häufigkeit von GG/AG-Genotypen betrug 92,3 % in den Gruppen mit nicht-muskelinvasivem Krebs (NMIC). (154)

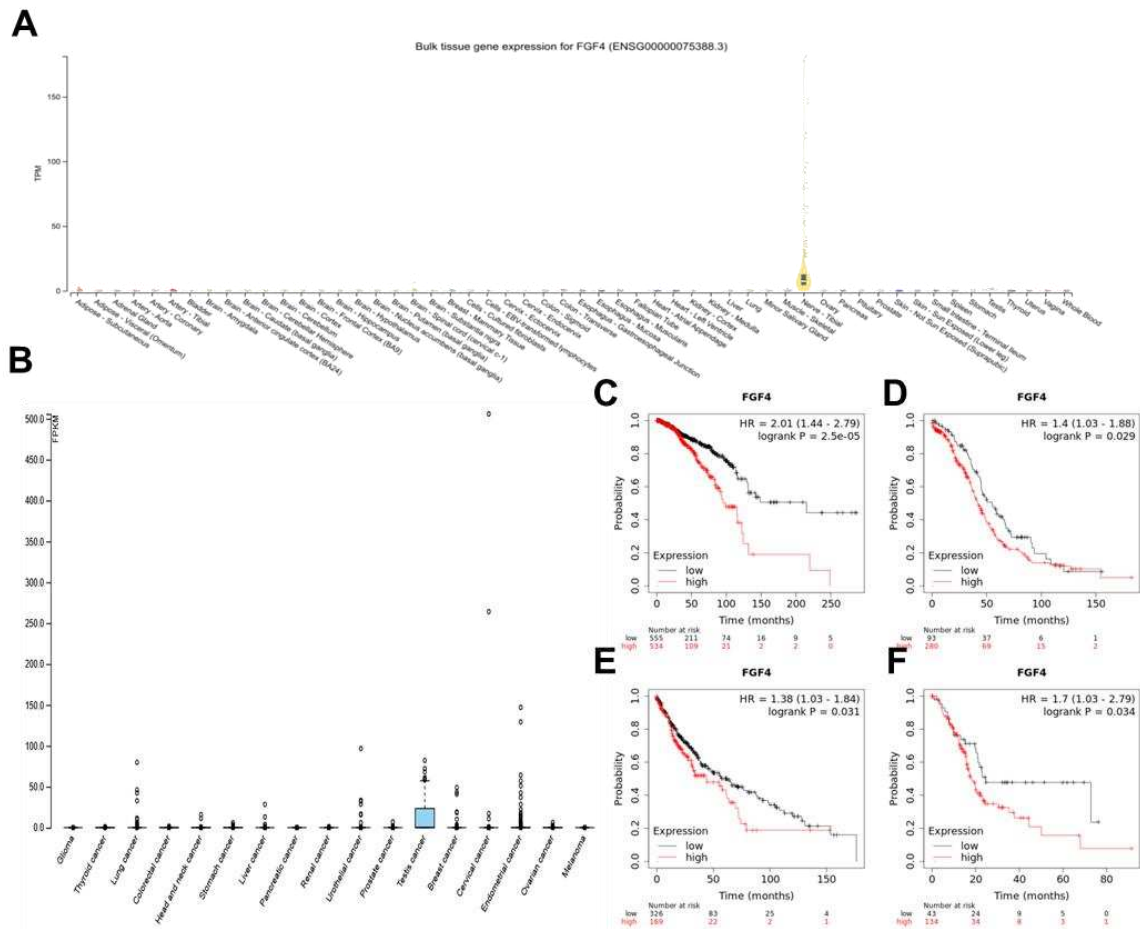


Abbildung 28: Expressionsprofil des FGF4-Genes in normalem Gewebe und Krebsgewebe inklusive Kaplan-Meier-Plots von unterschiedlichen Krebsarten.

(A) Violin-Plot mit dem Expressionsprofil des FGF4-Genes in 54 unterschiedlichen physiologischen Gewebstypen. Der Graph wurde von gtexportal.org zur Verfügung gestellt. Auf der X-Achse befindet sich die unterschiedlichen Gewebstypen und auf der Y-Achse die gewebsspezifische TPM.

(B) Box-Plot-Chart mit dem Expressionsprofil des FGF4-Genes in 17 unterschiedlichen Krebsarten. Der Graph wurde von proteintatlas.org zur Verfügung gestellt. Auf der X-Achse sind die unterschiedlichen Krebsarten dargestellt und auf der Y-Achse die krebspezifische FPKM.

Kaplan-Meier-Überlebenskurven gruppiert nach hoher und niedriger FGF4-Expression in (C) Brustkrebs, (D) Ovarialkarzinom, (E) Plattenepithelkarzinom der Lunge und (F)

Pankreaskarzinom. Die Graphen wurden von kmplot.org zur Verfügung gestellt. Rote Linie = hohe Expression, Schwarze Linie = niedrige/keine Expression
TPM = Transcripts Per Kilobase Million, FPKM = Fragments Per Kilobase of transcript per Million mapped reads

FGF4

In der Expressionsanalyse von Gtex konnte gezeigt werden, dass die größte Expression im Nervus tibialis nachweisbar war und de facto keine Expression im ZNS (Vergleiche **Abbildung 28A**). Der Knochen wurde nicht sequenziert und erstaunlicherweise, war auch keine FGF4 Expression in immortalisierten Fibroblastenzellen nachweisbar. In verschiedenen Krebsvarianten war FGF4 fast ausschließlich in Hodentumoren überexprimiert (**Abbildung 28B**).

Das FGF4-Gen kodiert für ein Protein aus der Familie der Fibroblasten-Wachstumsfaktoren (FGF). Es ist an der Embryonalentwicklung, Zellwachstum, Morphogenese, Gewebereparatur, Tumorwachstum und Invasion beteiligt. Auch stimuliert es die Knochenmorphogenese und die Entwicklung der Gliedmaßen. (155) Es fördert zudem die rekombinante p38 MAPK-GSK3 β -vermittelte Stabilisierung von Slug. Dies führt zur Migration und Proliferation von Keratinozyten, was wiederum die Reepithelisierung und Wundheilung fördert. (156) Eine frühe Expression von FGF4 (Tag 2 bis Tag 4) ist wichtig für eine erfolgreiche Erzeugung von induzierten pluripotenten Stammzellen. (157) FGF4 erhöht dabei die Proliferationsrate von mesenchymalen Stammzellen (MSC). (158) FGF4 zeigt auch einen schützenden Effekt bei Autoimmunhepatitis (AIH). Ohne FGF4 wäre die Leber viel anfälliger für Lipidperoxidation, Eisenakkumulation und Entzündungen. FGF4 mildert zudem Leberschädigungen und die hepatozelluläre Ferroptose ab. Man kann somit mit der FGF4-Behandlung die Ferroptose der Hepatozyten durch Erhöhung der C1SD3-Spiegel und Aktivierung der Nrf2/HO-1-Signalübertragung hemmen, womit FGF4 eine prophylaktische Rolle beim Fortschreiten von AIH spielen könnte. (159) Eine konstitutionell erhöhte Dosis der FGF3- und FGF4-Genes stellt jedoch einen Risikofaktor für Kraniosynostose beim Menschen dar. (160)

Man konnte auch eine FGF4-Überexpression beim Gastrointestinalen Stromatumor (GIST) feststellen. So konnte man eine FGF4-Überexpression sowohl bei vierfachen WT-Gist als auch bei SDH-defizienten GIST feststellen. Die FGF4-Expression war dabei in

vierfachen WT-Fällen höher als in SDH-defizienten Fällen. Die FGF4-Induktion wird dabei in vierfachen WT-GIST durch unterschiedliche Aktivierungsmechanismen ausgelöst. FGF4 wird in vierfachen WT-GISTs in Verbindung mit einer fokalen Duplikation überexprimiert. Die Transkription von FGF4 wird möglicherweise durch die Super-Enhancer-Aktivität von ANO18 induziert. (161)

Auch im Magenkarzinomgewebe ist die FGFR4-Expression sehr hoch und FGFR4 führt dabei zum Fortschreiten des Magenkarzinomes durch Proliferation und Hemmung der Apoptose. Die FGFR4-Expression steht zudem im Zusammenhang mit dem Lymphknotenstatus und der PCNA (Proliferating-Cell-Nuclear-Antigen) - und Neu-Expression. Die 5-Jahres-Überlebensrate betrug bei Magenkarzinompatient*innen mit niedriger FGFR4-Expression 61.5% und nur 42% bei Patient*innen mit hoher FGFR4-Expression. (162)

FGFR4 rs2011077 und rs1966265 ist auch bei Frauen mit der Progression von normalem Gebärmutterhalsgewebe zu präkanzerösen Läsionen assoziiert. Der rs351855 Genotyp (Gly388Arg) ist jedoch der einzige genetische FGFR4-Polymorphismus, der mit dem Überleben der Patient*innen assoziiert ist. (163)

Beim Ovarialkarzinom ist die Expression von FGF4 in Fibroblasten (N25-5)-gemischten ALDH1-hohen Tumoren im Vergleich zu der Expression von reinen ALDH1-hohen Tumoren erhöht. Die Expressionsniveaus des FGF4-Rezeptors (FGFR2) waren in Fibroblasten-gemischten ALDH1-hohen Tumoren ebenfalls höher als in reinen ALDH1-hohen Tumoren. FGF4 steigerte die Kugelbildungskapazität von ALDH1-high-Zellen signifikant, nicht aber die von ALDH1-low-Zellen.

Der FGF4-Score 0 war bei serösen Adenokarzinomen signifikant niedriger und der FGF4-Score 1 bei serösen Adenokarzinomen signifikant höher. Der FGF4-Score 0 korrelierte dabei mit dem FIGO-Stadium I und der Score 2 mit dem FIGO-Stadium IV. Es gab zudem eine schwache, aber signifikante Korrelation zwischen den FGF4-positiven Raten und ALDH1-positiven Raten.

Eine höhere FGF4-Expression (Score 1 und Score 2) war mit einer schlechteren Prognose assoziiert. Die 5-Jahres-Überlebensrate beträgt bei hoher FGF4-Expression ca. 50%. Bei niedriger FGF4-Expression liegt sie dagegen bei ca. 80%. (164)

Die FGF4-Expression ist auch bei Mammakarzinom erhöht. Der Hepatitis-B-X-interagierende Faktor aktiviert dabei den Transkriptionsfaktor Sp1. Dadurch steigt die FGF4-Expression, was wiederum die Metastasierung von Mammakarzinom stimuliert.

FPKM.

Kaplan-Meier-Überlebenskurven gruppiert nach hoher und niedriger PDCL2-Expression in (C) Brustkrebs, (D) Endometriumkarzinom, (E) Pankreaskarzinom und (F)

Hepatozellulärem Karzinom. Die Graphen wurden von kmplot.org zur Verfügung gestellt.

Rote Linie = hohe Expression, Schwarze Linie = niedrige/keine Expression

TPM = Transcripts Per Kilobase Million, FPKM = Fragments Per Kilobase of transcript per Million mapped reads

PDCL2

Das PDCL2-Gen kodiert für das Protein Phosducin like 2. Dieses wird in männlichen meiotischen und postmeiotischen Keimzellen exprimiert (was sich auch in den GTex-Daten widerspiegelte (Siehe **Abbildung 29A**)). Interessanterweise ist PDCL2 auch im Hodentumor hochgradig exprimiert bzw. im Ovarialkarzinom (Vergleiche **Abbildung 29B**). Dieses Protein weist eine N-terminale Helixdomäne und eine C-terminale Thioredoxin-Faltdomäne auf. PDCL2 fungiert als ein Modulator für heterotrimerer G-Proteine. Es bindet dabei an die Beta-Gamma-Untereinheiten von G-Proteinen. (168) PDCL2 interagiert auch mit CCT (Chaperonin Containing Tcp1) und moduliert dessen Faltungsaktivität. Dies führt zu Biogenese mehrerer für Zellzyklus und Funktion des Zytoskeletts notwendiger CCT-Substrate. (169)

In der Literatur konnte gezeigt werden, dass sich eine hohe PDCL2-Expression im Hodenkrebs (Seminom) als auch im Nierenzellkarzinom findet.

Eine hohe Expression von PDCL2 ist jedoch mit einem geringeren Überleben von Nierenkrebspatient*innen assoziiert. Die Überlebensrate nach 100 Monaten bei Patient*innen mit hoher PDCL2-Expression liegt bei ca. 40%. Bei Patient*innen mit niedriger PDCL2-Expression liegt sie dagegen bei ca. 50%. (170) In der TCGA-Datenbank gab es einen Überlebensnachteil für Patient*innen mit hoher PDCL2-Expression im Brustkrebs, im Endometriumkarzinom, und im Pankreaskarzinom (**Abbildung 29C-E**) und mit umgekehrten Vorzeichen im Hepatozellulärem Karzinom (**Abbildung 29F**).

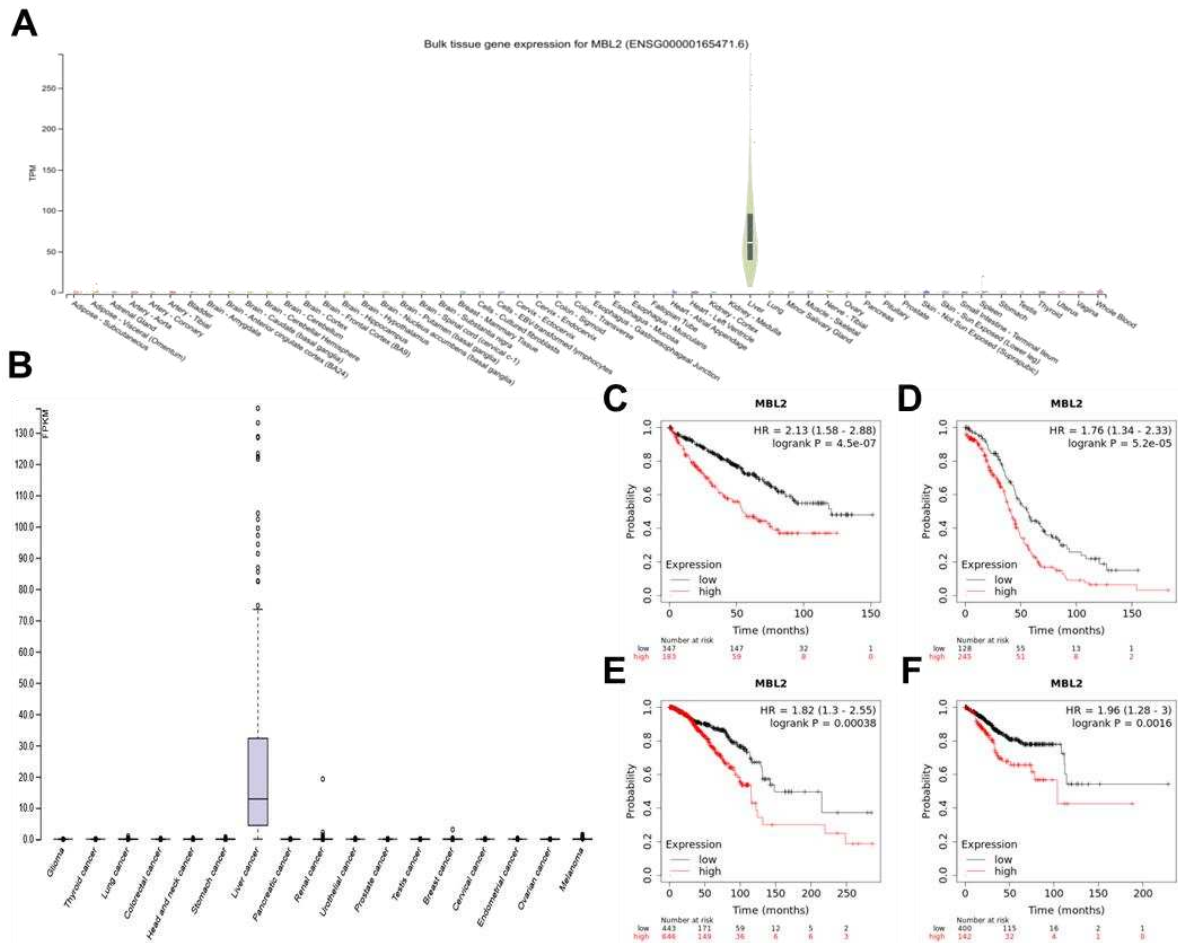


Abbildung 30: Expressionsprofil des MBL2-Genes in normalem Gewebe und Krebsgewebe inklusive Kaplan-Meier-Plots von unterschiedlichen Krebsarten.

(A) Violin-Plot mit dem Expressionsprofil des MBL2-Genes in 54 unterschiedlichen physiologischen Gewebstypen. Der Graph wurde von gtexportal.org zur Verfügung gestellt. Auf der X-Achse befindet sich die unterschiedlichen Gewebstypen und auf der Y-Achse die gewebsspezifische TPM.

(B) Box-Plot-Chart mit dem Expressionsprofil des MBL2-Genes in 17 unterschiedlichen Krebsarten. Der Graph wurde von proteinatlas.org zur Verfügung gestellt. Auf der X-Achse sind die unterschiedlichen Krebsarten dargestellt und auf der Y-Achse die krebspezifische FPKM.

Kaplan-Meier-Überlebenskurven gruppiert nach hoher und niedriger MBL2-Expression in (C) klarzelligem Nierenzellkarzinom, (D) Ovarialkarzinom, (E) Brustkrebs und (F) Endometriumkarzinom. Die Graphen wurden von kmplot.org zur Verfügung gestellt. Rote Linie = hohe Expression, Schwarze Linie = niedrige/keine Expression

TPM = Transcripts Per Kilobase Million, FPKM = Fragments Per Kilobase of transcript per Million mapped reads

MBL2

Das MBL2-Gen kodiert das Protein „Mannose-bindendes Lektin“. Es gehört zur Familie der Kollektine und stellt ein Element des angeborenen Immunsystems dar. Es ist in der Lage an Mannose und N-Acetylglucosamin auf Bakterien, Hefe und Viren wie z.B. Influenzavirus, HIV und SARS-CoV zu binden. Dadurch wird der klassische Komplementweg aktiviert und deren Aufnahme durch Makrophagen erleichtert. Exprimiert wird es fast ausschließlich in der Leber und im Hepatozellulärem Karzinom (Siehe **Abbildung 30A-B**). (171,172)

Bei einer Infektion mit dem SARS-Coronavirus-2/SARS-CoV-2 wird der Komplement-Lektin-Weg aktiviert. Defizite dieses Gens sind mit Autoimmun- und Infektionskrankheiten assoziiert. (171,172) Durch Polymorphismen im MBL-Gen kann zu einem Mangel an Mannose-bindendem Lektin kommen, wodurch die Abwehr gegen Mikroben beeinträchtigt ist. Genotypen, die mit MBL-Mangel assoziiert waren, waren auch mit erhöhtem Risiko für Bronchiolitis, Lungenentzündung und Keuchen mit Kurzatmigkeitsepisoden assoziiert. (173) So ist bei Patient*innen mit atopischer Dermatitis der Mangel an Mannose-bindenden Lektinen mit einer erhöhten Sensibilisierung gegenüber *Candida albicans* assoziiert. (174) MBL-defiziente Genotypen zeigen zudem ein geringeres Risiko für atopische Dermatitis. (173) Beim Zervixkarzinom ist eine Überexpression von gewissen Genotypen feststellbar. Das Exon 1 D-Allel, O/O-Genotyp und D/D-Genotyp ist häufiger bei atypischen Plattenepithelzellen überexprimiert. (175) Beim HCC stellt MBL2 ein direktes Ziel von miR-942-3p dar. Es zeigte sich hierbei eine negative Korrelation mit der miR-942-3p-Expression. Das MBL2 hemmt zudem das Fortschreiten von HCC-Zellen und schwächt den durch miR-942-3p induzierten tumorfördernden Effekt ab. HCC-Patient*innen mit hoher MBL2-Expression zeigten dadurch eine bessere Überlebensrate. Nach 2000 Tagen lag die Überlebensrate bei HCC-Patient*innen mit hoher MBL2-Expression bei ca. 50%. Bei HCC-Patient*innen mit niedriger MBL2-Expression lag sie dagegen bei ca. 25%. Bei HCC-Patient*innen mit einem Tumor-Rezidiv konnte dagegen kein Unterschied zwischen niedriger und hoher MBL2-Expression festgestellt werden. (176)

Beim Ovarialkarzinom (OC) zeigte sich auch eine erhöhte MBL2-Expression. Möglicherweise liegt da eine Beteiligung des Lektinweges der Komplementaktivierung vor. Es gab dabei eine schwache Korrelation der MBL-Werte mit dem CRP (C-reaktive Protein). Die MBL-Werte korrelierten jedoch nicht mit der CA125-Antigenkonzentration. Die lokale MBL2-Expression korrelierte dabei signifikant mit Serum-MBL-Spiegel bei

FPKM.

Kaplan-Meier-Überlebenskurven gruppiert nach hoher und niedriger DMRT1-Expression in (C) Blasenkrebs, (D) Endometriumkarzinom, (E) Papillärem Nierenzellkarzinom und (F) Brustkrebs. Die Graphen wurden von kmplot.org zur Verfügung gestellt. Rote Linie = hohe Expression, Schwarze Linie = niedrige/keine Expression

TPM = Transcripts Per Kilobase Million, FPKM = Fragments Per Kilobase of transcript per Million mapped reads

DMRT1

Das DMRT1-Gen kodiert den Doublesex und Mab-3 verwandten Transkriptionsfaktor 1. Physiologisch findet sich die DMRT1-Expression im Hoden und wird überexprimiert vor allem in Hodentumoren, sowie Tumoren des weiblichen Urogenitaltraktes (Vergleiche **Abbildung 31A-B**). In Akkordanz mit den vorherigen Ergebnissen steht auch die Überlebenskurven, die sich in der TCGA-Datenbank finden können. So zeigte sich ein Überlebensnachteil bei hoher DMRT1-Expression in den Tumoren des weiblichen Geschlechtstraktes, sowie des Urogenitaltraktes (Blasenkrebs, Endometriumkarzinom, Papillärem Nierenzellkarzinom, sowie Brustkrebs) (Detailliert in **Abbildung 31C-F**). Es weist dabei ein gonadenspezifisches und geschlechtsdimorphes Expressionsmuster auf. Es ist für die Hodenentwicklung wichtig und spielt hierbei eine Schlüsselrolle bei der männlichen Geschlechtsbestimmung. Es aktiviert männerspezifische Gene und unterdrückt weiblichspezifische Gene. (178) Wenn dieses Gen hemizygot exprimiert wird, dann kommt es zu einer fehlerhaften Hodenentwicklung und XY-Genotypisierung. Auch ist es für die Spermienproduktion zuständig. Es hemmt dabei die Meiose bzw. fördert die Mitose in undifferenzierten Spermatogonien. (179) Die Meiose verhindert es durch Einschränkung der Retinsäure-abhängigen Transkription und Unterdrückung der STRA8-Expression. (180) Es fördert zudem die Spermatogonienentwicklung durch Aktivierung von Spermatogonien-Differenzierungsgenen (SOHLH1). Es ist auch bekannt, dass DMRT1 als Tumorsuppressor wirken kann. (181)

DMRT1 wird auch vermehrt in den Keimzellen von Gemischten Keimzell-Geschlechtsstrang-Stromatumoren als auch von Spermatozytentumoren im Hoden exprimiert. (181,182)

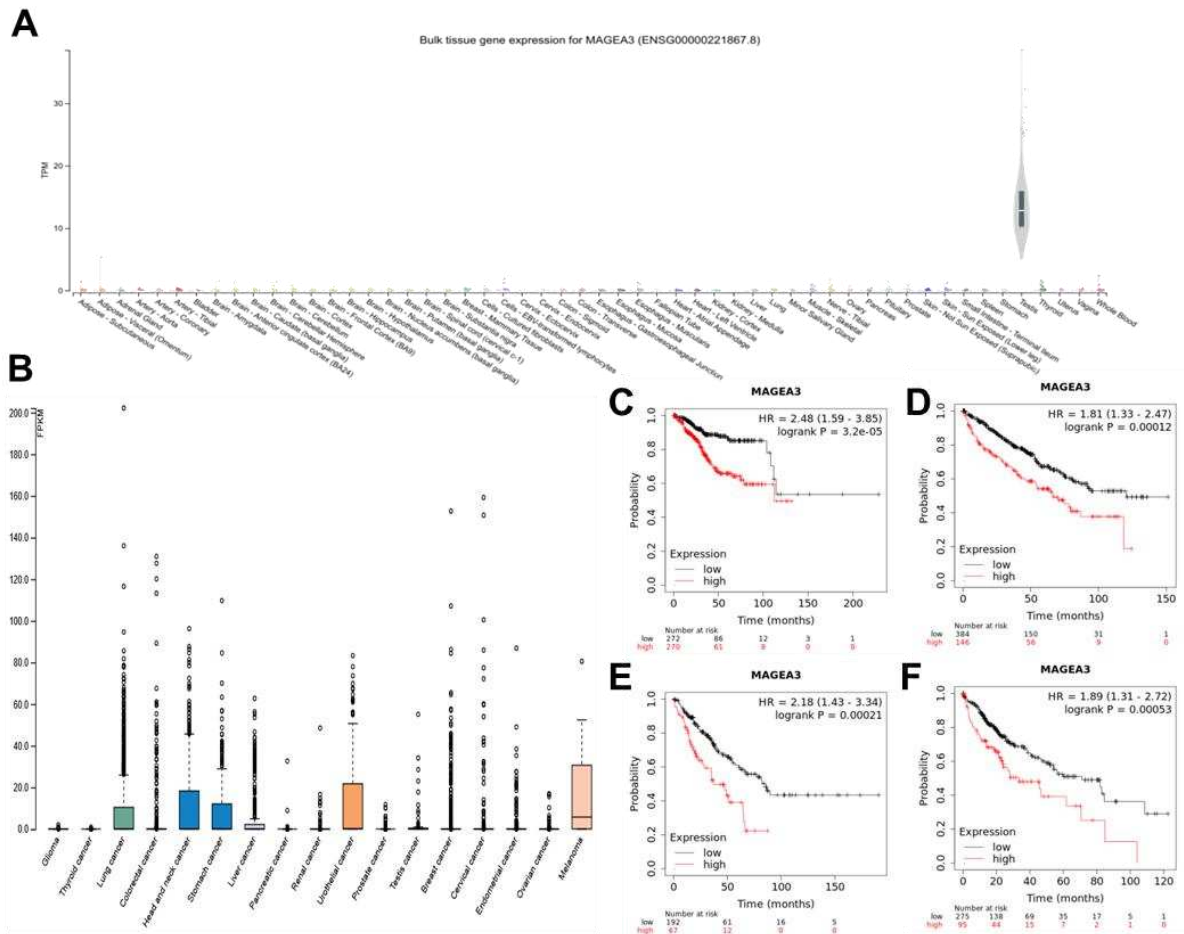


Abbildung 32: Expressionsprofil des MAGEA3-Genes in normalem Gewebe und Krebsgewebe inklusive Kaplan-Meier-Plots von unterschiedlichen Krebsarten.

(A) Violin-Plot mit dem Expressionsprofil des MAGEA3-Genes in 54 unterschiedlichen physiologischen Gewebstypen. Der Graph wurde von gtexportal.org zur Verfügung gestellt. Auf der X-Achse befindet sich die unterschiedlichen Gewebstypen und auf der Y-Achse die gewebsspezifische TPM.

(B) Box-Plot-Chart mit dem Expressionsprofil des MAGEA3-Genes in 17 unterschiedlichen Krebsarten. Der Graph wurde von proteinatlas.org zur Verfügung gestellt. Auf der X-Achse sind die unterschiedlichen Krebsarten dargestellt und auf der Y-Achse die krebspezifische FPKM.

Kaplan-Meier-Überlebenskurven gruppiert nach hoher und niedriger MAGEA3-Expression in (C) Endometriumkarzinom, (D) Klarzelligem Nierenzellkarzinom, (E) Sarkom und (F) Hepatozellulärem Karzinom. Die Graphen wurden von kmplot.org zur Verfügung gestellt. Rote Linie = hohe Expression, Schwarze Linie = niedrige/keine Expression

TPM = Transcripts Per Kilobase Million, FPKM = Fragments Per Kilobase of transcript per Million mapped reads

MAGEA3

MAGEA3 ist ein Mitglied der MAGEA-Genfamilie. MAGEA3 aktiviert die Ubiquitin-Ligase-Aktivität. Es kann auch die Ubiquitin-Ligase-Aktivität von TRIM28 verstärken und die Ubiquitinierung von p53/TP53 durch TRIM28 stimulieren. MAGEA3 ist auch mit einigen Erbkrankheiten (z.B. Dyskeratosis congenita) assoziiert. (189–191) Es ist auch bekannt, dass es *in vitro* die Zellebensfähigkeit von Melanomzelllinien stimuliert. Als Antigen kann es dabei auf einem Melanom von körpereigenen zytolytischen T-Lymphozyten erkannt werden. (192) Physiologisch wird MAGEA3 nur im Hoden exprimiert (Vergleiche **Abbildung 32A**), jedoch hat sich gezeigt, dass es in vielen Krebsarten überexprimiert ist, wie zum Beispiel im Melanom, Lungenkarzinom, Kopf-Hals-Tumoren oder Urothelkarzinomen (**Abbildung 32B**).

In 90% der Fälle gibt es eine positive MAGE-A 3/4-Expression im Plattenepithelkarzinom der Speiseröhre. Eine hohe MAGE-A 3-Expression findet in allen Lymphknotenmetastasen statt. Die Expression von MAGE-A 3/4 in Primärtumoren zeigte eine signifikant positive Korrelation mit der Primärtumorexpression von NY-ESO-1. Die Expression von MAGE-A 3/4 in Primärtumoren und Lymphknotenmetastasen zeigte jedoch keine signifikante Korrelation mit prognostischen Parametern wie Tumorgrad und TNM-Stadium. (193) Beim Magenkarzinom konnte dagegen eine signifikante umgekehrte Korrelation zwischen der MAGE-A3-Promotor-Methylierung und Expression in den Krebsproben festgestellt werden. Ein niedrigerer MAGE-A3-Methylierungsgrad ist dabei mit einem schlechteren Überleben der Patient*innen assoziiert. Die miRNA-vermittelte Unterdrückung der MAGE-A3-Expression in MKN1-Zellen hemmt die Proliferation bzw. die Koloniebildungsfähigkeit. MAGE-A3 reguliert auch unter Stressbedingungen die Expression von Bax und p21. Unterdrückung der MAGE-A3-Expression stimulierte zudem die Expression von Puma und Noxa und erhöhte die Empfindlichkeit gegenüber Docetaxel in den von Magenkrebs stammenden Zellen. Man hat festgestellt, dass nach 60 Monaten ca. 50% der Magenkarzinompatient*innen mit einer niedrigen MAGEA3-Expression lebten (nach 120 Monaten ca. 40%). Mit einer hohen MAGEA3-Expression waren dagegen nach 60 Monaten ca. 30% der Magenkarzinompatient*innen noch lebend (nach 120 Monaten ca. 20%). (194,195)

Auch beim Urothelialen Blasenkrebs (UBC) konnte die Expression von MAGEA3 im Zellkern und im Zytoplasma nachgewiesen werden. Diese Tumore korrelieren dabei statistisch signifikant häufiger mit einem ungünstigen Tumorgrading. Nach 60 Monaten waren ca. 85% der UBC-Patient*innen mit einer niedrigen MAGEA3-Expression noch am Leben. Bei den UBC-Patient*innen mit einer hohen MAGEA3-Expression waren es dagegen nur 60%. (196)

MAGE-A3/6 wird auch in 50,0 % der nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen (NSCLCs) exprimiert. MAGE-A3/6 wurde dabei bei Plattenepithelkarzinomen häufiger exprimiert als bei Adenokarzinomen. Man hat festgestellt, dass die Gruppe mit negativer Expression von MAGE-A3/6 eine höhere Anzahl von DC als die Gruppe mit positiver Expression aufwies. Es gab dabei keinen signifikanten Unterschied bei der CD8+ T-Zell-Infiltration zwischen den Gruppen. Nach 60 Monaten waren ca. 50% der Patient*innen mit nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom und niedriger MAGEA3-Expression lebend. Bei den Patient*innen mit nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom und niedriger MAGEA3-Expression waren es nach gleicher Zeit ca. 40%. (197)

MAGEA3 ist auch im HCC überexprimiert, wo es die Tumorprogression fördert. Die Ausschaltung von MAGEA3 verringert die Zellproliferation und Koloniebildung und erhöht die Apoptoserate. Somit ist die Überexpression von MAGEA3 mit aggressiveren Tumoren assoziiert. Nach 60 Monaten waren ca. 50% der HCC-Patient*innen mit einer niedrigen MAGEA3-Expression noch lebend. Bei HCC-Patient*innen mit einer hohen MAGEA3-Expression waren es nach dem gleichen Zeitabschnitt dagegen nur ca. 30%. (198)

Eine erhöhte nukleäre und zytoplasmatische Expression von MAGE-A3 wurde auch in Prostatakarzinomgewebe im Vergleich zu benigner Prostatahyperplasie und hochgradiger prostaticher intraepithelialer Neoplasie festgestellt. Es gab dabei eine signifikante Korrelation zwischen einer höheren nukleären und zytoplasmatischen Expression von MAGE-A3 und dem Gleason-Score (MAGE-A3-Expression nimmt mit höherem Malignitätsgrad zu). Ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem zytoplasmatischen Expressionsmuster von MAGE-A3 und der Tumorinvasion in die Samenblasen wurde ebenfalls festgestellt. Eine erhöhte Expression von MAGE-A3 ist mit einem kürzeren krankheitsfreien Überleben (DFS) der Patient*innen assoziiert. Nach 100 Monaten waren ca. 75% der Prostatakarzinom-Patient*innen mit einer niedrigen MAGEA3-Expression lebend.

Im gleichen Zeitraum waren dagegen ca. 40% der Prostatakarzinom-Patient*innen mit einer hohen MAGEA3-Expression lebend. Bei Prostatakarzinom-Patient*innen mit einer hohen MAGEA3-Expression waren es dagegen ca. 40% nach gleichem Zeitabschnitt.

(199)

Schließlich konnte beim Zervixkarzinom festgestellt werden, dass die Expression von MAGE-A in den CC-Zelllinien (HeLa, SiHa und C33A) im Vergleich zur End1/E6E7-Zelllinie signifikant hochreguliert ist. Die Überexpression von MAGE-A3 führt zu Migration, Invasion und Proliferation in SiHa-Zellen und zur Aktivierung von EMT und des Wnt-Signalwegs in SiHa-Zellen. Somit fördert MAGEA3 das Tumorwachstum beim Zervixkarzinom. (200) In den Überlebensanalysen der TCGA zeigte sich, dass eine erhöhte MAGEA3-Expression mit einem verkürzten Überleben vor allem im Endometriumkarzinom, Klarzelligen Nierenzellkarzinom, Sarkom und dem Hepatozellulärem Karzinom vergesellschaftet war (Siehe **Abbildung 32C-F**).

Tabelle 3. Tabellarische Zusammenfassung der untersuchten Gene.

| Gen | Physiologische Funktion | Funktion in Krebs | Prognose | Ref |
|-------------|--|--|--|----------------------------------|
| GIP | <ul style="list-style-type: none"> - Produziert aus den K-Zellen des Dünndarms nach Nahrungsaufnahme. - GIP fördert die glukoseabhängige Insulinsekretion - GIP führt zu einer erhöhten mRNA-Expression von IL-6, IL-1β und IL-1Ra | <p>Starke Expression des GIP-Rezeptors (GIPR) in: pädiatrischen, sowie adulten Nebennierentumoren, neuroendokrinen Tumoren, medullären Schilddrüsenkarzinom (89% der Fälle), 92% der NET der Lunge, in 99% der NETs des Pankreas, 86% der NETs des Ileums.</p> | Nichts dokumentiert | (79–86) |
| F9 | <ul style="list-style-type: none"> - kodiert den Gerinnungsfaktor IX - an Vitamin-K-abhängiger Antikoagulation beteiligt - durch den Faktor XIa aktiviert - aktivierte Faktor IX aktiviert dann den Faktor X durch Wechselwirkungen mit Ca²⁺-Ionen, Membranphospholipiden und Faktor VIII | <p>Hepatozelluläres Karzinom:</p> <ul style="list-style-type: none"> - F9 stärker in normalen Geweben exprimiert als in Gewebe von HCC - Assoziiert mit vaskulärer Invasion, T- und M-Stadium - hohe F9-Expression korreliert negativ mit dem Infiltrationsgrad von CD4⁺ T-Zellen, Neutrophilen, B-Zellen, dendritische Zellen, Makrophagen und CD8⁺ T-Zellen in HCC-Gewebe <p>Kolonkarzinom:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Bei Darmkrebs kann miR-576-5p das Fortschreiten zu Lebermetastasen beeinflussen, indem es das F9-Gen angreift | <p>Hepatozelluläres Karzinom:</p> <ul style="list-style-type: none"> - 50% nach 60 Monaten mit hoher F9 Expression lebend <p>Kolorektalkrebs:</p> <ul style="list-style-type: none"> - 30% nach 120 Monaten mit hoher Expression lebend | (87–89) |
| IL21 | <ul style="list-style-type: none"> - Typ-III-IFNs (IFN-λ1, IFN-λ2 und IFN-λ3) stimulieren Sekretion von IL21 - IFN-α stimuliert die Bildung von IL21 - fördert die Produktion von IgG(1) und IgG(3) in B-Zellen - Bildung von T-Follikel-Helferzellen - Aktivierung extrafollikulärer B-Zellen - Produktion von Autoantikörpern \rightarrow Autoimmunkrankheiten - Bildung von B-Zellen und deren Differenzierung zu Plasmazellen durch Aktivierung der JAK/STAT-, MAPK- und PI3K-Signalwege \rightarrow Immunglobuline produziert | <p>Larynxkarzinom:</p> <ul style="list-style-type: none"> - erhöhte Expression von IL21 in Kehlkopfkrebs - auch in angrenzenden Geweben leichte Erhöhung durch Immunreaktion oder Bluttransport feststellbar <p>Kolonkarzinom:</p> <ul style="list-style-type: none"> - bei 50 % der Patient*innen mit Kolonkarzinom verringert - IL21 Expression assoziiert mit vaskulärer Invasion - fördert entzündungsbedingte Karzinogenese des Kolonkarzinoms - in Kolon-Epithelzellen aktiviert es STAT3, STAT1 und ERK1/2 <p>Mammakarzinom</p> | <p>Kolonkarzinom:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Bei hoher IL21 Expression sind 80-90% der Kolonkarzinompatient*innen nach 60-80 Monaten noch am Leben <p>Mammakarzinom:</p> <ul style="list-style-type: none"> - nach 60 Monaten 80%/94%/90% der Brustkrebspatient*innen mit CC/TT/CT-Genotyp des IL21 Genes noch am Leben <p>Pankreaskarzinom:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Bei niedriger IL21 Expression sind nach 1000 | (90,91, 100–104,24 6–248,92 –99) |

| | | | |
|-------------|--|--|---|
| | <ul style="list-style-type: none"> - Antikörperreaktionen bei Virusinfektionen - mit IL6 Proliferation und Reifung von natürlichen Killerzellen (NK), reifen B- und T-Zellen - Produktion zusammen mit IL15 und IL18 von Interferon gamma in T-Zellen und NK-Zellen kann es zusammen mit - Aktivierung, Differenzierung und Absterben von B-Zellen während humoraler Immunantworten - fungiert als Co-Adjuvans zu gewissen Autoantikörpern → Abwehr von Infektionen | <ul style="list-style-type: none"> - IL21 fördert Proliferation, Migration und Invasion von MDA-231-Zellen (durch die Regulation von MMP-Signalwegen), nicht aber von MCF-7- und ZR-75.1-Zellen <p>Pankreaskarzinom:</p> <ul style="list-style-type: none"> - IL21-R fördert die Proliferationsaktivität <p>Magenkarzinom:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Serumkonzentration von IL21 erhöht bei Patient*innen mit Magenkrebs und bei Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen <p>Lungenkarzinom:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Reduzierte IL21 und IL21-R Expression im SCLC - stärkere Expression von IL21-R führt somit dosisabhängig zur Hemmung von Zellwachstum und Metastasierung | <p>Tagen noch 30% (vs 15%) der Pankreaskarzinompatient*innen am Leben</p> <p>Magenkarzinom:</p> <ul style="list-style-type: none"> - positive Assoziation zwischen hoher IL21R-Expression und Tumorgroße und lymphogener Metastasierung - kürzere Überlebenszeit mit höheren Rezidivraten bei Patient*innen mit einer hohen IL21R-Expression |
| LCT | <ul style="list-style-type: none"> - kodiert für das Enzym Laktase - spaltet Laktose in Galaktose und Glukose - Mangel dieses Enzyms führt zu Laktoseintoleranz → Betroffene können keine Laktose und somit auch keine Milchprodukte verdauen - abnehmende Expression mit zunehmendem Alter - Laktasepersistenz = Laktase auch im Erwachsenenalter erhalten | <ul style="list-style-type: none"> - kein Hinweis für höhere LCT-Expression bei Krebserkrankungen -LCT-CC Genotyp ist mit einer höheren Wahrscheinlichkeit für ein Fernrezidiv bei Kolonkarzinompatient*innen assoziiert | <p>Kolonkarzinom: (105)</p> <ul style="list-style-type: none"> - Kolonkarzinompatient*innen mit LCT-CC Gen mit niedrigerer Lebenserwartung → nach 20 Monaten etwas mehr als 50% noch am Leben - bei TT- und TC-Genotyp waren es vergleichsweise ca. 80% |
| ZAN | <ul style="list-style-type: none"> - kodiert das Protein Zonadhesin (artspezifische Bindung von Spermien an die Zona pellucida der Eizelle mittels D-Domäne des Zonadhesins) - Synthese der Zonadhesin-mRNA hauptsächlich in primären Spermatozyten - befindet sich im Akrosom des Spermiums - an der Gametenerkennung beteiligt | Nichts dokumentiert | Nichts dokumentiert (106–110) |
| CCR3 | <ul style="list-style-type: none"> - kodiert Protein der Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren | <p>Magenkarzinom:</p> <ul style="list-style-type: none"> - höhere Expression von CCR3 | <p>Magenkarzinom: (111,112,121–125,24)</p> <ul style="list-style-type: none"> - Indirekte Korrelation zwischen CCR3- |

| | | | |
|---|---|--|------------------------|
| - an diesen Rezeptoren binden Chemokine wie z.B. Eotaxin, Eotaxin-3, MCP-3, MCP-4 und RANTES | - CCR3 wird dabei von CCL5 stimuliert | Expression und Überlebensrate | 9,250,1 13– 120) |
| - in eosinophilen, basophile, TH1- und TH2-Zellen, sowie in Epithelzellen der Atemwege exprimiert | Lungenkarzinomen: - wichtige Rolle bei der Entwicklung vom Adenokarzinom der Lunge | - Indirekte Korrelation zwischen CCR3-Expression und Overall Survival | |
| - an allergischen beteiligt | - Expression von CCR3 war in Tumorgewebe signifikant erhöht | | |
| - CCR3 fördert in Lungenepithelzellen die Freisetzung von IL-8→ an Lipopolysaccharid (LPS)-induzierten Lungenentzündungen beteiligt | Hautkrebs: - CCR3 im Malignen Melanom (MM) und Plattenepithelkarzinom überexprimiert | Hautkrebs: - Höhere CCR3-Expression korreliert mit geringerem Gesamtüberleben | |
| - LPS erhöht die CCR3-Expression in NCI-H292- und A549-Zellen | - im Basalzellkarzinom nur schwach und im normalen Gewebe kaum exprimiert | Mammakarzinom: - hohe CCR3-Expression mit verbesserten rezidivfreien Überleben | |
| - verstärkte Expression von CCR3 auf Synovialzellen bei Rheumatoider Arthritis (RA) | - bei MM-Zelllinien am stärksten in SK-Mel-24 Zellen (gefolgt von G361 und SK-Mel-2) exprimiert | bei luminalen A-, luminalen B- und HER2-angereicherten Brustkrebsfällen verbunden | |
| -Eotaxin-1 stimuliert die Expression von CCR3 in fibroblastenähnlichen Synoviozyten (FLS) | - CCR3 könnte die Zelltransformation, das Wachstum und die Invasion von Tumoren sowie die Metastasierung stimulieren | | |
| - Korrelation zwischen CCR3-Expression und der Neovaskularisation von Hornhaut | Schilddrüsenkarzinom: - signifikant erhöhte Expression von CCR3 im papillären Schilddrüsenkarzinom | Nierenzellkarzinom: - CCR3-Expression korreliert mit dem Malignitätsgrad (Grading) | |
| | Prostatakarzinom: - erhöhte Expression von CCR3 in Prostatakrebszelllinien | - Hohe CCR3-Expression mit einer schlechteren Lebenserwartung assoziiert | |
| | - CCR3 fördert über den ERK-Signalweg die Invasion von Prostatakrebszellen mit einer Hochregulierung der MMP3-Expression | Glioblastom: - hohe CCR3-Expression ist assoziiert mit kürzerem Überleben | |
| | Mammakarzinom: - bei Tumoren mit hoher CCR3-Expression handelte es sich meistens um luminal-ähnliche Tumore als um TNBC- oder HER2-angereicherte Tumore | - nach 24 Monaten waren unter 10% von den Glioblastompatient*innen mit hoher CCR3-Expression noch am Leben | |
| | - CCR3-Expression nicht mit der Tumorgroße, dem Lymphknotenstatus und dem Alter assoziiert | | |
| | - CCL5 aktiviert CCR3 | | |

| | | | |
|---------------|---|---|---|
| | <p>→ Th2-Polarisierung von CD4+ T-Zellen und prometastatische Aktivität von tumorassoziierten Zellen verstärkt</p> <p>Nierenzellkarzinom:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Erhöhte CCR3-Expression in Nierenzellkarzinomzellen - Chemokine induzieren eine Hochregulierung der intrazellulären Ca²⁺-Signalübertragung, was zu Zellproliferation führt - CCR3-Expression korreliert mit dem Malignitätsgrad <p>Glioblastom:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Erhöhte CCR3-Expression in Glioblastomzellen - CCR3 fördert die Proliferation, Migration und Invasion von Tumorzellen | | |
| CYP7A1 | <p>- CYP7A1-Gen kodiert für das Enzym Cholesterin-7α-Hydroxylase</p> <ul style="list-style-type: none"> - CYP7A1 wird vermehrt in Brustkrebszellen (TNBC) exprimiert - Cholesterin-7α-Hydroxylase wandelt enzymatisch Cholesterin in 7α-hydroxycholesterin oder 25(R)-26-Hydroxycholesterin um - Niedrige Gallensäurekonzentrationen stimulieren und hohe Gallensäurekonzentrationen reduzieren die Expression des CYP7A1-Gens | <p>Brustkrebs:</p> <ul style="list-style-type: none"> - höhere CYP7A1-Expression korreliert mit einem höheren Ki67-Wert und weniger Lymphknotenmetastasen <p>Gallenblasenkrebs:</p> <ul style="list-style-type: none"> - CC-Genotyp des CYP7A1-Gens sind bei Patient*innen mit Gallenblasenkrebs (GBC) häufiger - hohes Risiko für GBC besteht auch bei Trägern des AC-Genotyps und des C-Allels bei GBC-Patient*innen ohne Gallensteine | <p>Nichts dokumentiert</p> <p>(126–128)</p> |
| MYF5 | <p>- Transkriptionsfaktor, der die Muskelentwicklung steuert (primäre Muskelfaserbildung während der Embryonalentwicklung)</p> <ul style="list-style-type: none"> - in somatischen Mesodermzellen exprimiert - Hilft bei der Differenzierung von Myoblasten zu reifen Muskelzellen - Ebenso an der Regeneration von Muskelzellen beteiligt | <p>Rhabdomyosarkom:</p> <ul style="list-style-type: none"> - MYF5 wird in humanem embryonalem Rhabdomyosarkom mehr exprimiert als in alveolären Rhabdomyosarkom und normalem Muskelgewebe - MYF5 fördert die Tumorausbreitung im Rhabdomyosarkom, indem es eine | <p>Nichts dokumentiert</p> <p>(129–132)</p> |

| | | | |
|-------------|--|--|--|
| | - Rezessive MYF5-Mutationen verursachen externe Ophthalmoplegie, Rippen- und Wirbelsäulenanomalien | Umgebung schafft, die das Wachstum fördert | |
| DMP1 | <p>- DMP1 ist ein extrazelluläres Matrixprotein, was in den Zellen des Knochen- und Zahngewebes vorkommt</p> <p>- wichtig für die Mineralisierung von Knochen und Dentin</p> <p>- In undifferenzierten Osteoblasten stimuliert es die Expression von osteoblastenspezifischen Genen (Osteocalcin und alkalische Phosphatase1)</p> <p>- Während der Osteoblastenreifung wird DMP1 phosphoryliert und in die extrazelluläre Matrix exportiert</p> <p>- steuert die Bildung der mineralisierten Matrix</p> <p>- Mutation im DMP1-Gen ist mit hereditärer hypophosphatämischer Rachitis assoziiert</p> <p>- Störungen der DMP1-Expression im Knochen führen zu gestörten Osteozytenreifung, Mineralisierung und einer erhöhten Produktion des Fibroblasten-Wachstumsfaktors 23 (FGF23).</p> <p>- Bei Menschen mit chronischer Niereninsuffizienz sind niedrige zirkulierende DMP1-Spiegel mit erhöhten kardiovaskulären Risiken assoziiert</p> | <p>Lungenkrebs:</p> <p>- DMP1-Expression ist in Adenokarzinomen und Plattenepithelkarzinomen hoch</p> <p>- Produktion von Knochenmatrixproteinen durch Krebszellen könnte die Entwicklung von Knochenmetastasen fördern</p> <p>- DMP1 kann Komplementfaktor H an Zelloberflächenrezeptoren binden und ihn vor der Lyse durch alternativen Komplementweg schützen und dadurch können Tumorzellen der Wirtsüberwachung besser entgehen und haben damit eine höhere Überlebenschance</p> <p>- Knochenmatrixproteine könnten das Tumorwachstum, die tumorassoziierte Angiogenese, den Schutz vor der Immunüberwachung, die Adhäsion zwischen Zellen und Knochen und Knochenmikroumgebung fördern</p> <p>Brustkrebs:</p> <p>- Indirekte Korrelation zwischen DMP1-Expression und Tumorgroße und -grad</p> <p>- Hohe DMP1-Expressionswerte in primären Brustläsionen sind mit einem geringeren Risiko für die Entwicklung von Skelettmetastasen assoziiert</p> <p>- bei der DMP1-Expression in Brustkrebszelllinien nicht invasive MCF-7- und T47-D-Zellen stärker exprimiert als hochinvasive MDA-MB-231- und Hs578T-Zellen</p> <p>Phosphaturischer mesenchymaler Tumor:</p> | <p>Lungenkrebs: (133,1 34,143, 144,13 5–142)</p> <p>- hohe DMP1-Expression ist bei Lungenkrebspatient*innen mit schlechterer Prognose assoziiert</p> <p>- das bronchioloalveoläre Karzinom (Subtyp des Adenokarzinoms der Lunge) hat eine bessere Prognose, wobei es DMP1 sehr selten exprimiert</p> <p>Brustkrebs:</p> <p>- Erhöhtes krankheitsfreies Überleben bei Brustkrebspatient*innen mit hoher DMP1-Expression</p> <p>- nach 100 Monaten lag das Krankheitsfreie Überleben bei Brustkrebspatient*innen mit hoher/niedriger DMP1-Expression bei ca. 55%/25%</p> |

| | | | |
|----------------|--|---|--|
| | | - erhöhte DMP1-Expression wurde bei allen drei PMTs (phosphaturischer mesenchymaler Tumor) beobachtet | |
| | | - DMP1 ist ein wertvoller pathologischer Marker für PMTs | |
| | | Prostatakrebs: | |
| | | - erhöhte DMP1-Expression in Prostatakrebszellen nachgewiesen | |
| SLCO1B1 | - kodiert für den Organic Anion Transporting Polypeptide 1B1 (OATP1B1) | Pankreaskarzinom: | Kolonkarzinom: (145,1 |
| B1 | - Na(+)-unabhängige Aufnahme von organischen Anionen | - OATP1B1-Expression in BxPC-3 2-mal höher als in MIA PaCa-2 Zellen | 46,234, |
| | - Entfernung von Bilirubin-Glucuroniden und Arzneimittelverbindungen aus dem Blut in die Hepatozyten | Hepatozelluläres Karzinom: | SLCO1B1 nimmt mit dem 147- |
| | - Transportiert Coproporphyrin I und III | - OATP1B1-Expression in HCC reduziert | Grad des 154) |
| | - Transport von organischen Verbindungen in den Hoden über die Blut-Hoden-Schranke | - Expression von SLCO1B1 nimmt mit dem Grad des Leberkrebses ab | Dickdarmkrebses zu |
| | - homozygote Träger der c.521T>C-Variante haben ein erhöhtes Risiko für Myopathie oder Rhabdomyolyse bei der Einnahme von Statinen | Kolonkarzinom: | → hohe SLCO1B1-Expression ist mit schlechter Prognose assoziiert |
| | - Träger des C-Allels des SLCO1B1-Polymorphismus haben ein höheres Hepatotoxizitätsrisiko nach Methothrexateinnahme als Patient*innen mit dem TT-Genotyp | - OATP1B1-Expression in Kolonkarzinom erhöht | |
| | | - Expression von SLCO1B1 nimmt mit dem Grad des Dickdarmkrebses zu | |
| | | Gallenblasenkarzinom: | |
| | | - SLCO1B1 rs2306283 GG/AG ist mit einem höheren Risiko für Gallenblasenkrebs assoziiert | |
| | | - Zusammenhang zwischen Genotyphäufigkeiten von SLCO1B1 rs2306283 und dem Krebsstadium | |
| FGF4 | - kodiert Proteine aus der Familie der Fibroblasten-Wachstumsfaktoren (FGF) | Gastrointestinaler Stromatumor (GIST): | Magenkarzinom: (155,1 |
| | - an Embryonalentwicklung, Zellwachstum, Morphogenese, Gewebereparatur, Tumorwachstum und Invasion beteiligt | - Überexpression von FGF4 sowohl bei vierfachem WT- als auch bei SDH-defizienten GIST | - 5-Jahres-Überlebensrate 56,165 |
| | - Knochenmorphogenese und Entwicklung der Gliedmaßen | - FGF4-Expression in vierfachen WT-Fällen höher als in SDH-defizienten Fällen | betrug 61,5 % bei - |
| | - fördert die p38 MAPK-GSK3β-vermittelte Stabilisierung von Slug | Magenkarzinom: | Patient*innen mit GC mit 167,15 |
| | | - FGFR4-Expression im Magenkarzinomgewebe extrem hoch | niedriger FGFR4- 7-164) |
| | | Magenkarzinom: | Expression |
| | | - FGFR4-Expression im Magenkarzinomgewebe extrem hoch | - aber nur 42 % bei Patient*innen mit hoher FGFR4-Expression |
| | | Ovarialkarzinom: | - höhere FGF4-Expression (Score 1 und |

| | | |
|---|--|--|
| <p>→ Migration und Proliferation von Keratinozyten</p> <p>→ Reepithelisierung und Wundheilung</p> <p>- FGF4 mit schützendem Effekt bei Autoimmunhepatitis (AIH)</p> <p>- ohne FGF4 Leber anfälliger für Lipidperoxidation, Eisenakkumulation und Entzündungen</p> <p>- mildert Leberschädigung und die hepatozelluläre Ferroptose ab</p> <p>- frühe Expression von FGF4 (Tag 2 bis Tag 4) wichtig für eine erfolgreiche Erzeugung von induzierten pluripotenten Stammzellen</p> <p>- FGF4 erhöht die Proliferationsrate von mesenchymalen Stammzellen (MSC)</p> <p>- keine signifikanten Auswirkungen auf die Pluripotenz von MSC</p> | <p>- FGFR4 führt zum Fortschreiten von Magenkarzinom durch Proliferation und Antiapoptose</p> <p>- FGFR4-Expression stand im Zusammenhang mit dem Lymphknotenstatus und der PCNA- und Neu-Expression</p> <p>Zervixkarzinom:</p> <p>- FGFR4 rs2011077 und rs1966265 bei Frauen mit der Progression von normalem Gebärmutterhalsgewebe zu präkanzerösen Läsionen assoziiert</p> <p>- rs351855 (Gly388Arg) der einzige genetische FGFR4-Polymorphismus, der mit dem Überleben der Patient*innen assoziiert ist</p> <p>Ovarialkarzinom:</p> <p>- Expression von FGF4 in Fibroblasten (N25-5)-gemischten ALDH1-hohen Tumoren im Vergleich zu der Expression in ALDH1-hohen Tumoren erhöht</p> <p>- Die Expressionsniveaus des FGF4-Rezeptors (FGFR2) waren in Fibroblasten-gemischten ALDH1-hohen Tumoren ebenfalls höher als in reinen ALDH1-hohen Tumoren</p> <p>- FGF4-Score 0 bei serösen Adenokarzinomen signifikant niedriger</p> <p>- FGF4-Score 1 bei serösen Adenokarzinomen signifikant höher</p> <p>- FGF4-Score 0 korreliert mit dem FIGO-Stadium I und der Score 2 mit dem FIGO-Stadium IV</p> <p>Mammakarzinom:</p> <p>- FGF4-Expression bei Brustkrebs erhöht</p> <p>- Hepatitis-B-X-interagierende aktiviert Transkriptionsfaktor Sp1</p> <p>→ FGF4-Expression steigt</p> <p>→ Metastasierung von Brustkrebs</p> | <p>2) sind mit einer schlechteren Prognose assoziiert</p> <p>- 5-Jahres-Überlebensrate bei hoher/niedriger FGF4-Expression bei ca. 50%/80%</p> <p>Mammakarzinom:</p> <p>- 5-Jahres-Überlebensrate bei hoher/niedriger FGF4-Expression bei ca. 15%/30%</p> |
| <p>PDCL2 - kodiert für das Protein Phosducin like 2</p> | <p>- hohe Expression in Hodenkrebs (Seminom)</p> | <p>Nierenzellkarzinom: (168–170)</p> <p>- hohe Expression von PDCL2 ist mit geringerem</p> |

| | | | | |
|-------------|---|--|--|---|
| | <ul style="list-style-type: none"> - in männlichen meiotischen und postmeiotischen Keimzellen exprimiert - haben eine N-terminale Helixdomäne und eine C-terminale Thioredoxin-Faltdomäne - Modulator für heterotrimere G-Proteine - binden an die Beta-Gamma-Untereinheiten von G-Proteinen - PDCL2 interagiert mit mit CCT (Chaperonin Containing Tcp1) und moduliert dessen Faltungsaktivität → Biogenese mehrerer für Zellzyklus und Funktion des Zytoskeletts notwendiger CCT-Substrate | <ul style="list-style-type: none"> - Erhöhte PDCL2-Anreicherung in Nierenkrebs | <ul style="list-style-type: none"> Überleben von Nierenkrebspatient*innen assoziiert - Überlebensrate nach 100 Monaten bei Patient*innen mit hoher/niedriger PDCL2-Expression bei ca. 40%/50% | |
| MBL2 | <ul style="list-style-type: none"> - kodiert das Protein Mannose-bindendes Lektin - wichtiges Element des angeborenen Immunsystems - erkennt und bindet an Mannose und N-Acetylglucosamin auf Bakterien, Hefe und Viren → klassische Komplementweg aktiviert → erleichtert deren Aufnahme durch Makrophagen - Defizite in diesem Gen sind mit Autoimmun- und Infektionskrankheiten assoziiert - Polymorphismus im MBL-Gen kann zu einem Mangel an Mannose-bindendem Lektin führen → Abwehr gegen Mikroben beeinträchtigt - Diverse Polymorphismen sind mit einem hohen Risiko mit HIV-1-Infektion verbunden, sowie Hashimoto-Thyreoiditis (HT), Autoimmunerkrankung der Schilddrüse (AITD) und Morbus Basedow - Genotypen, die mit MBL-Mangel assoziiert waren, mit erhöhtem Risiko | <ul style="list-style-type: none"> Kolonkarzinom: - Diverse Polymorphismen und Haplotypen sind mit einem erhöhten Darmkrebsrisiko assoziiert Adenokarzinom des Magens: - erhöhte Expression von MBL2 in Adenokarzinom des Magens Lungenkrebs: - X-Allel des Promotor-Y/X-Polymorphismus führt zu einer niedrigeren Serum-MBL-Konzentration Gebärmutterhalskrebs: - Exon 1 D-Allel, O/O-Genotyp und D/D-Genotyp häufiger bei atypischen Plattenepithelzellen überexprimiert Hepatozelluläres Karzinom: - MBL2 direktes Ziel von miR-942-3p mit inverser Korrelation - hemmt das Fortschreiten von HCC-Zellen und schwächt durch miR-942-3p induzierten tumorfördernden Effekt ab Ovarialkarzinom: - MBL2-Expression bei Ovarialkarzinompatient*innen erhöht (möglicherweise Beteiligung des Lektinweges der Komplementaktivierung) | <ul style="list-style-type: none"> Lungenkrebs: - Ein heterozygoter (YX) oder doppelt varianter Genotyp (XX) war mit niedrigeren Serum-MBL-Spiegeln und geringerem Sterberisiko assoziiert - kumulative 5-Jahres-Überlebensrate war 41,5 % für Patient*innen mit dem Y/Y-Genotyp und 58,2 % für Patient*innen mit mindestens einem X-Allel Nachbeobachtungszeitraum (12 Jahre) kumulative Überlebensrate bei 18,9 % für Patient*innen mit Y/Y-Genotyp und 46,6 % für Patient*innen mit mindestens einem X-Allel Hepatozelluläres Karzinom: - HCC-Patient*innen mit hoher MBL2-Expression mit besserer Überlebensrate - nach 2000 Tagen 50%/25% Überlebensrate | <ul style="list-style-type: none"> (171,1 72,238, 173– 177,23 5–237) |

| | | | |
|----------------|---|--|--|
| | für Bronchiolitis und Lungenentzündung, sowie geringerem Risiko für atopische Dermatitis | - schwache Korrelation der MBL-Werte mit dem CRP - keine Korrelation der MBL-Werte mit der CA125-Antigenkonzentration | bei HCC-Patient*innen mit hoher/niedriger MBL2-Expression Ovarialkarzinom: Die Genotypen A/A und YA/O mit kürzerem Überleben assoziiert als XA/O und O/O. (60% nach 30 Monaten) |
| DMRT1 | - DMRT1-Expression in Hoden und Lungenmakrophagen - weist ein gonadenspezifisches und geschlechtsdimorphes Expressionsmuster auf - wenn dieses Gen hemizygot → fehlerhafte Hodenentwicklung und XY-Feminisierung - Hodenentwicklung → Schlüsselrolle bei der männlichen Geschlechtsbestimmung - Spermienproduktion (hemmt Meiose/fördert Mitose in undifferenzierten Spermatogonien) - Verhindert Meiose durch Einschränkung der Retinsäure-abhängigen Transkription und Unterdrückung der STRA8-Expression - fördert Spermatogonienentwicklung durch Aktivierung von Spermatogonien-Differenzierungsgenen (SOHLH1) - aktiviert männerspezifische Gene und unterdrückt weiblichspezifische Gene - kann als Tumorsuppressor wirken | Gemischter Keimzell-Geschlechtsstrang-Stromatumor im Hoden: - DMRT1 wird in den Keimzellen, sowohl vom Gemischten Keimzell-Geschlechtsstrang-Stromatumor im Hoden als auch von Spermatozytentumoren im Hoden exprimiert | Nichts dokumentiert (178–182) |
| MAGE A3 | - Mitglied der MAGEA-Genfamilie - mit einigen Erbkrankheiten (z.B. Dyskeratosis congenita) in Verbindung gebracht - aktiviert die Ubiquitin-Ligase-Aktivität E3-Ubiquitin-Protein-Ligasen (Repressor der Autophagie) - kann Ubiquitin-Ligase-Aktivität von TRIM28 verstärken und die | Plattenepithelkarzinomen der Speiseröhre: - in 90% der Fälle positive MAGE-A 3/4-Expression - hohe MAGE-A 3-Expression in allen Lymphknotenmetastasen - Expression von MAGE-A 3/4 in Primärtumoren mit signifikanter positiver Korrelation mit der | Magenkarzinom: - nach 60 Monaten ca. 90,199, 200,19 Magenkarzinompatient*in 1–198) mit einer niedrigen/hohen MAGEA3-Expression lebend (nach 120 Monaten ca. 40%/20%) |

| | | |
|---|---|--|
| Ubiquitinierung von p53/TP53 durch TRIM28 stimulieren | Primärtumorexpression von NY-ESO-1 aber ohne signifikante Korrelation mit der Expression von MAGE-A 3/4 in Lymphknotenmetastasen | Urothelkarzinom: - nach 60 Monaten 85%/60% der Urothelkarzinompatient*innen mit einer niedrigen/hohen MAGEA3-Expression lebend (nach 120 Monaten ca. 85%/60%) |
| - stimuliert in vitro die Zelllebensfähigkeit von Melanomzelllinien | - Expression von MAGE-A 3/4 in Primärtumoren und Lymphknotenmetastasen ohne signifikante Korrelation mit prognostischen Parametern wie Tumorgrad und TNM-Stadium | Lungenkarzinom: - nach 60 Monaten 50%/40% der Patient*innen mit nicht-kleinzelligem Lungenkarzinom und niedriger/hohem MAGEA3-Expression lebend |
| - als Antigen auf einem Melanom von körpereigenen zytolytischen T-Lymphozyten erkannt | Magenkarzinom: - Inverse Korrelation zwischen der MAGE-A3-Promotor-Methylierung und Expression im Magenkarzinom - niedrigerer MAGE-A3-Methylierungsgrad mit einem schlechteren Überleben der Patient*innen assoziiert - MAGE-A3 reguliert unter Stressbedingungen die Expression von Bax und p21 - Unterdrückung der MAGE-A3-Expression stimulierte die Expression von Puma und Noxa und erhöhte die Empfindlichkeit gegenüber | Hepatozelluläres Karzinom: - nach 60 Monaten 50%/30% der HCC-Patient*innen mit einer niedrigen/hohen MAGEA3-Expression lebend |
| | Urothelkarzinom: - Expression von MAGEA3 im Zellkern und im Zytoplasma von Urothelkarzinomen - Direkte Korrelation zum WHO-Grading | Prostatakarzinom: - erhöhte Expression von MAGEA3 mit einem kürzeren rezidivfreien Überleben und krankheitsfreien Überleben assoziiert |
| | Lungenkarzinom: - MAGE-A3/6 in Plattenepithelkarzinomen häufiger exprimiert als bei Adenokarzinomen - Negative MAGE-A3/6 Expression ist assoziiert mit höherer DC-Anzahl | - nach 100 Monaten 75%/40% der Prostatakarzinom-Patient*innen mit einer niedrigen/hohen MAGEA3-Expression lebend |
| | Hepatozelluläres Karzinom: - MAGEA3 in HCC überexprimiert - fördert Tumorprogression - Ausschaltung von MAGEA3 verringerte die Zellproliferation und | |

Koloniebildung und erhöht die
Apoptose

- Überexpression von MAGEA3 mit
aggressiveren Tumoren assoziiert

Prostatakarzinom:

- signifikante Korrelation zwischen
einer höheren nukleären und
zytoplasmatischen Expression von
MAGE-A3 und dem Gleason-Score,
sowie Tumorinvasion

Zervixkarzinom:

- Expression von MAGE-A in den
CC-Zelllinien (HeLa, SiHa und
C33A) im Vergleich zur End1/E6E7-
Zelllinie signifikant hochreguliert

- Überexpression von MAGE-A3
führt zu Migration, Invasion und
Proliferation in SiHa-Zellen

- Hochregulierung von MAGE-A3
führt zu Aktivierung von EMT und
des Wnt-Signalwegs in SiHa-Zellen

- fördert Tumorwachstum

8. Diskussion

Die mRNA-Technologie steckt noch in den Kinderschuhen und doch war der erste klinische Einsatz im Zuge der COVID19-Pandemie ein durchschlagender Erfolg. (253) Aus wissenschaftlicher Sicht war es der erste erfolgreiche Einsatz dieser neuen Technologie im klinischen Bereich. Eine wesentliche Neuerung dieser Technologie war, dass der Impfstoff in wenigen Stunden designt werden konnte.

Das impliziert natürlich, dass BioNTech eine Plattform entwickelt und perfektioniert hat, die es Ihnen erlaubt einen Impfstoff für eine klinisch-therapeutische Fragestellung innerhalb weniger Tage zu erzeugen. Im Lichte der personalisierten Medizin ist das ein weiterer Lichtblick, denn nun könnte die potenzielle Therapie sehr schnell auf die Patient*innen und ihren Krebs „zugeschnitten“ werden. Eine wesentliche Fragestellung diesbezüglich ist, aber welche Gene sich als Ziele für eine Impfung anbieten würden und diese Fragestellung wollte diese Arbeit behandeln. Diese Ziele sollten jedoch unter den Gesichtspunkten ausgesucht werden, dass sie einerseits vulnerables Gewebe, wie das Gehirn und das Herz nicht angreifen und andererseits sollten sie nur in einem Gewebe exprimiert sein, um mögliche Nebeneffekte zu minimieren.

Funktionell müssen für eine erfolgreiche mRNA-Impfung zunächst spezifische Neoantigene des Tumors identifiziert werden. Für die Herstellung des Neoantigen-Impfstoff müssen somatische Mutationen des Tumors identifiziert werden. Dabei wird zunächst eine Biopsie vom Tumor entnommen und selbiger Tumor wird sequenziert und mit normalem Gewebe als Referenz verglichen. Da jeder Tumor eine ganz eigene Kombination von Mutationen aufweist, muss ein mRNA-Wirkstoff individuell ausgerichtet und hergestellt werden.

Es ist grundsätzlich mit Nukleinsäureimpfstoffen möglich, dass gleichzeitig mehrere Antigene oder ein vollständiges Protein mit MHCI- und MHCII-bindenden Epitopen kodiert und verabreicht werden, was eine humorale und eine zellvermittelte Immunreaktion auslöst. In weiterer Folge wird somit die Wahrscheinlichkeit einer möglichen Impfstoffresistenz reduziert. (4,251) Zudem können die Tumorantigene in voller Länge kodiert werden. So können APCs mehrere Epitope mit Patient*innen-spezifischen humanen Leukozytenantigenen (HLA) der Klassen I und II gleichzeitig „präsentieren“, wodurch eine breitere T-Zell-Antwort ausgelöst werden kann. (4,251)

Nukleinsäureimpfstoffe sind zudem prophylaktisch und therapeutisch gut verträglich, da sie nicht infektiös und frei von Verunreinigungen durch Proteine oder Viren sind. (4,251) Dabei haben mRNA-Impfstoffe den Vorteil, dass sie im Vergleich zu DNA-Impfstoffen leichter abgebaut werden können. (4,8,251) Speziell mRNA-Impfstoffe haben den Vorteil, dass sie in teilenden und nicht teilenden Zellen translatiert werden können. Dadurch ist die Proteinexpressionsrate bei mRNA höher als bei DNA. (4) Die mRNA-Impfstoffe können zudem nicht in das Genom eingebaut werden, wodurch Insertionsmutagenese verhindert wird. (4,8) Auch können mRNA-Impfstoffe schnell und einfach hergestellt werden. Dadurch ist es möglich innerhalb kürzester Zeit neue Impfstofftypen zu produzieren. (4,8) Schließlich ist die Identifizierung von Neoantigenen ein weiterer Vorteil, der die Anwendung von mRNA-Impfstoffen verbessert. Somit konnten mRNA-Impfstoffe gut vertragen werden. Lediglich Reaktionen an der Injektionsstelle sind bis jetzt ganz selten verzeichnet worden. (4,8)

Man muss allerdings auch die Limitationen der mRNA-Impfstoffe genau betrachten. Es ist grundsätzlich schwierig einen Krebsimpfstoff herzustellen, der prophylaktisch funktionieren könnte. Dabei ist es schwierig eine Antigenvorhersage und somit auch eine optimale Immunantwort umzusetzen. Aus diesen Gründen funktionieren die meisten Krebsimpfstoffe therapeutisch. (4,252) Nur gegen virusbedingte Malignome (HPV und HBV) gibt es derzeit prophylaktisch wirkende Krebsimpfstoffe.

Der therapeutisch wirkende Impfstoff muss dabei die humorale Immunabwehr, die CD4+ T-Zellen-Antwort und auch die MHCII-vermittelte CD+ 8 T-Zellen-Antwort aktivieren. Dies würde jedoch die Antitumor-Immunität erschweren, obwohl CD8+ zytotoxische T-Zellen eine wichtige Rolle bei der Bekämpfung bösartiger Zellen spielen. (4,251,252) Auch die tumorspezifischen Antigene stellen ein Problem dar. Menschen weisen nämlich unterschiedliche Tumorantigene auf, die auch eine unterschiedliche Immunogenität aufweisen. Eine suppressive Mikroumgebung könnte zudem die Infiltration von T-Zellen verhindern und zu einer Erschöpfung dieser führen. (4,8,251)

Man muss bei Krebserkrankungen zudem höhere Dosen des therapeutisch wirkenden Impfstoffs verabreichen, was sich negativ auf die Sicherheit des Impfstoffs auswirken kann. (4,8,251) Bei mRNA-Impfstoffen können auch durch die Aktivierung des TLR7/8-Signalwegs und die Auslösung von Typ-I-IFN-Reaktionen systemische Entzündungen entstehen, wobei Typ-I-IFN-Reaktionen durch Codon-Optimierungen, Nukleotidmodifikationen und Entfernung von dsRNA-Verunreinigungen reduziert werden können. Man könnte auch dabei die Verabreichungswege so gestalten, dass angeborene

Immunreaktionen lokal bleiben. (4,251) Typ-I-Interferon-Reaktionen können jedoch Autoimmunreaktionen auslösen, weswegen es nötig sein wird Patient*innen mit Autoimmunkrankheiten zu identifizieren, bevor ihnen die mRNA-Impfung verabreicht werden kann. (4,27)

Betrachtet man die hier besprochenen Gene, um festzustellen, ob sie geeignet für eine potenzielle mRNA-Impfung sind, dann ist auffällig, dass die meisten Gene eine erhöhte Expression in Tumoren aufwiesen. Von den untersuchten Genen wies ZAN keine Assoziation mit Tumoren auf, womit dieses Gen per se ungeeignet für eine mRNA-Impfung wäre. Es gab auch Fälle, wo eine erhöhte Expression eines dieser Gene zu einer besseren Prognose führte. Das F9-Gen war stärker im normalen Gewebe exprimiert als in Gewebe von HCC. Bei den Überlebensanalysen zeigte sich ebenfalls ein sehr heterogenes Bild: So gab es Tumore, bei denen eine erhöhte Expression mit einem längeren Überleben vergesellschaftet war und auf der anderen Seite gab es auch Tumore, wo eine erhöhte Expression mit einer verminderter Überlebenswahrscheinlichkeit vergesellschaftet war. Dieses Muster zieht sich durch alle untersuchten Gene durch, insofern ist ein wichtiger Punkt die Personalisierte Medizin und das damit verbundene Testen i.e.L.

immunhistochemische Testen, ob das Protein exprimiert ist oder nicht. Von einer physiologischen Seite würde sich im Falle von F9 allerdings ein weiteres Problem ergeben, das den Behandlungsansatz auf ein stark verkleinertes Patient*ingut beschränken würde: Da das F9 Gen für den Gerinnungsfaktor kodiert, würde es bei einer individualisierten Impfung zu einem funktionellen Verlust des Gerinnungsfaktors IX kommen und damit zu erhöhter Blutungsneigung. Nun ist es allerdings so, dass Patient*innen mit Tumoren per se schon eine erhöhte Blutungsneigung haben sofern der Tumor eine Hohlstruktur infiltriert (Trachea, Ösophagus, ...) und somit sie sich einem erhöhten Blutungsrisiko aussetzen. (87,254) Auf der anderen Seite kann dieser Effekt auch gewünscht werden, da gewisse Krebsarten mit erhöhten Thromboseraten assoziiert sind (z.B. Pankreaskarzinom) und es auch von Seiten von Komorbiditäten durchaus eine Indikation zur medikamentösen Antikoagulation gegeben sein kann (z.B. Vorhofflimmerarrhythmie). (255) Letztendlich – wenn man so eine Impfung überhaupt anbieten kann – wird man nicht nur die Tumorspezifischen Erfolgsaussichten evaluieren, sondern auch ein besonderes Augenmerk auf die Co-Morbiditäten der Patient*innen legen müssen. Diese Überlegung zieht sich natürlich durch alle untersuchten Gene durch bzw. ist ein Dogma, das generell beachtet werden sollte. Schwieriger wird es auch, wenn es sich bei den Impfzielen um Proteine handelt, die eine hohe physiologische Bedeutung haben, wie zum Beispiel IL-21 oder CYP7A1. IL-21

spielt eine wichtige Rolle beim Immunsystem. Es ist nämlich an der Produktion von Antikörpern und T-Follikel-Helferzellen beteiligt. Aufgrund dieser wichtigen Funktion wäre eine Impfung gegen dieses Protein kontraproduktiv.

Gleiches gilt für CYP7A1, welches ein wesentliches Protein im Bereich der Pharmakologie ist, wo es für den Abbau vieler Substanzen zuständig ist. (90,91,126) Ein wesentlicher Argumentationsstrang könnte allerdings sein, dass man sagt, dass Substanzen, die über CYP7A1 abgebaut werden, einfach gemieden werden sollten. Dies wäre für jüngere Patient*innen einfacher als für Patient*innen in höherem Alter, da auch sehr viele Medikamente über CYP7A1 abgebaut werden. (126) Ein weiteres Gen, das in die selbe Richtung geht, wäre das LCT-Gen, welches für das Enzym Laktase kodiert. (105,256) Laktase selbst ist ein Enzym, das der Körper nicht notwendigerweise braucht. So gibt es vor allem Personen aus dem Mittelmeerraum, die keine funktionierende Laktase haben und somit darauf angewiesen sind, dass sie sich laktosefrei ernähren. (105,256) Somit wäre Laktase eigentlich ein exzellentes Ziel, da es heutzutage schon sehr viele – vor allem – Nahrungsmittelprodukte gibt, die laktosefrei angeboten werden.

Conclusio

Die Idee der mRNA-Impfungen ist per se nicht jung, jedoch hat erst die Corona-Pandemie dieser Technologie zum Durchbruch verholfen. Allerdings kommen mit jeder neuen Technologie Limitationen. Eine der Limitation der mRNA-Impfung sind die potenziellen Nebenwirkungen auf andere Gewebearten außer den Krebszellen. In dieser Forschungsarbeit haben wir uns dezidiert mit dieser Fragestellung auseinandergesetzt, indem wir kritische Gewebestrukturen exkludiert haben und andererseits nur Proteine ausgewählt haben, die nach Möglichkeit nur in einem Gewebetypus exprimiert waren und somit möglichst wenig Auswirkungen auf andere Gewebetypen hatten. Mit Hilfe der Bioinformatik konnten wir so einige Proteine identifizieren, die diesen Vorgaben entsprachen und somit konnten sie mit Hilfe der Literatur auch in Hinblick auf ihre onkologische Bedeutung einordnen. Diese Proteine sind hochspannende Kandidaten für eine zukünftige Impfung.

9. Literaturverzeichnis

1. Murken, Jan; Grimm, Tiemo; Holinski-Feder, Elke; Zerres K. Taschenlehrbuch Humangenetik. 9th ed. Thieme; 2017.
2. Bayrhuber H. LINDER Biologie. 22nd ed. Schroedel Verlag GmbH; 2005.
3. Nordheim, Alfred; Knippers R. Molekulare Genetik. 11th ed. Thieme; 2018.
4. Miao L, Zhang Y, Huang L. mRNA vaccine for cancer immunotherapy. Mol Cancer [Internet]. 2021 Dec 1 [cited 2022 Mar 21];20(1). Available from: <https://pubmed-1ncbi-1nlm-1nih-1gov-10013b5gv055f.han.medunigraz.at/33632261/>
5. Xu S, Yang K, Li R, Zhang L. mRNA Vaccine Era-Mechanisms, Drug Platform and Clinical Prospection. Int J Mol Sci [Internet]. 2020 Sep 2 [cited 2022 Mar 21];21(18):1–35. Available from: <https://pubmed-1ncbi-1nlm-1nih-1gov-10013b5gv055f.han.medunigraz.at/32916818/>
6. Merrick WC, Pavitt GD. Protein Synthesis Initiation in Eukaryotic Cells. Cold Spring Harb Perspect Biol [Internet]. 2018 Dec 1 [cited 2022 Jan 16];10(12). Available from: <https://pubmed-1ncbi-1nlm-1nih-1gov-10013b51g068e.han.medunigraz.at/29735639/>
7. Schlake T, Thess A, Fotin-Mleczek M, Kallen KJ. Developing mRNA-vaccine technologies. Vol. 9, RNA Biology. 2012.
8. Yao R, Xie C, Xia X. Recent progress in mRNA cancer vaccines. Vol. 20, Human vaccines & immunotherapeutics. 2024.
9. Rydzik AM, Kulis M, Lukaszewicz M, Kowalska J, Zuberek J, Darzynkiewicz ZM, et al. Synthesis and properties of mRNA cap analogs containing imidodiphosphate moiety - Fairly mimicking natural cap structure, yet resistant to enzymatic hydrolysis. Bioorganic Med Chem. 2012;20(5).
10. Stepinski J, Waddell C, Stolarski R, Darzynkiewicz E, Rhoads RE. Synthesis and properties of mRNAs containing the novel “anti-reverse” cap analogs 7-methyl(3'-O-methyl)GpppG and 7-methyl(3'-deoxy)GpppG. RNA. 2001;7(10).

11. Jemielity J, Fowler T, Zuberek J, Stepinski J, Lewdorowicz M, Niedzwiecka A, et al. Novel “anti-reverse” cap analogs with superior translational properties. *RNA*. 2003;9(9).
12. Grudzien-Nogalska E, Stepinski J, Jemielity J, Zuberek J, Stolarski R, Rhoads RE, et al. Synthesis of Anti-Reverse Cap Analogs (ARCAs) and their Applications in mRNA Translation and Stability. Vol. 431, *Methods in Enzymology*. 2007.
13. Vlasova-St. Louis I, Bohjanen PR. Coordinate regulation of mRNA decay networks by GU-rich elements and CELF1. Vol. 21, *Current Opinion in Genetics and Development*. 2011.
14. Murray EL, Schoenberg DR. A+U-Rich Instability Elements Differentially Activate 5'-3' and 3'-5' mRNA Decay. *Mol Cell Biol*. 2007;27(8).
15. Kozak M. At least six nucleotides preceding the AUG initiator codon enhance translation in mammalian cells. *J Mol Biol*. 1987;196(4).
16. Gray NK, Wickens M. Control of translation initiation in animals. Vol. 14, *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 1998.
17. Weissman D. mRNA transcript therapy. Vol. 14, *Expert Review of Vaccines*. 2014.
18. Pelletier J, Sonenberg N. Insertion mutagenesis to increase secondary structure within the 5' noncoding region of a eukaryotic mRNA reduces translational efficiency. *Cell*. 1985;40(3).
19. Linares-Fernández S, Lacroix C, Exposito JY, Verrier B. Tailoring mRNA Vaccine to Balance Innate/Adaptive Immune Response. Vol. 26, *Trends in Molecular Medicine*. 2020.
20. Gallie DR. The cap and poly(A) tail function synergistically to regulate mRNA translational efficiency. *Genes Dev*. 1991;5(11).
21. Park JE, Yi H, Kim Y, Chang H, Kim VN. Regulation of Poly(A) Tail and Translation during the Somatic Cell Cycle. *Mol Cell*. 2016;62(3).
22. Baiersdörfer M, Boros G, Muramatsu H, Mahiny A, Vlatkovic I, Sahin U, et al. A Facile Method for the Removal of dsRNA Contaminant from In Vitro-Transcribed mRNA. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2019;15.

23. Kallen K-J, Heidenreich R, Schnee M, Petsch B, Schlake T, Thess A, et al. A novel, disruptive vaccination technology. *Hum Vaccin Immunother.* 2013;9(10).
24. De Beuckelaer A, Grooten J, De Koker S. Type I Interferons Modulate CD8+ T Cell Immunity to mRNA Vaccines. Vol. 23, *Trends in Molecular Medicine.* 2017.
25. Verbeke R, Lentacker I, De Smedt SC, Dewitte H. Three decades of messenger RNA vaccine development. Vol. 28, *Nano Today.* 2019.
26. De Beuckelaer A, Pollard C, Van Lint S, Roose K, Van Hoecke L, Naessens T, et al. Type I interferons interfere with the capacity of mRNA lipoplex vaccines to elicit Cytolytic T cell responses. *Mol Ther.* 2016;24(11).
27. Pardi N, Hogan MJ, Porter FW, Weissman D. mRNA vaccines-a new era in vaccinology. Vol. 17, *Nature Reviews Drug Discovery.* 2018.
28. Kumar P, Sweeney TR, Skabkin MA, Skabkina O V., Hellen CUT, Pestova T V. 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 Res.* 2014;42(5).
29. Anderson BR, Muramatsu H, Jha BK, Silverman RH, Weissman D, Karikó K. Nucleoside modifications in RNA limit activation of 2'-5'- oligoadenylate synthetase and increase resistance to cleavage by RNase L. *Nucleic Acids Res.* 2011;39(21).
30. Van Lint S, Goyvaerts C, Maenhout S, Goethals L, Disy A, Benteyn D, et al. Preclinical evaluation of TriMix and antigen mRNA-based antitumor therapy. *Cancer Res.* 2012;72(7).
31. Pollard C, Rejman J, De Haes W, Verrier B, Van Gulck E, Naessens T, et al. Type I IFN counteracts the induction of antigen-specific immune responses by lipid-based delivery of mRNA vaccines. *Mol Ther.* 2013;21(1).
32. Granot-Matok Y, Kon E, Dammes N, Mechtinger G, Peer D. Therapeutic mRNA delivery to leukocytes. Vol. 305, *Journal of Controlled Release.* 2019.
33. Sun X, Zeng L, Huang Y. Transcutaneous delivery of DNA/mRNA for cancer therapeutic vaccination. Vol. 21, *Journal of Gene Medicine.* 2019.

34. Vacchelli E, Vitale I, Eggermont A, Fridman WH, Fučíková J, Cremer I, et al. Trial Watch: Dendritic cell-based interventions for cancer therapy. *Oncoimmunology*. 2013;2(10).
35. Wilgenhof S, Corthals J, Heirman C, Van Baren N, Lucas S, Kvistborg P, et al. Phase II study of autologous monocyte-derived mRNA electroporated dendritic cells (TriMixDC-MEL) plus ipilimumab in patients with pretreated advanced melanoma. *J Clin Oncol*. 2016;34(12).
36. Scheel B, Teufel R, Probst J, Carralot JP, Geginat J, Radsak M, et al. Toll-like receptor-dependent activation of several human blood cell types by protamine-condensed mRNA. *Eur J Immunol*. 2005;35(5).
37. Christensen D, Agger EM, Andreassen LV, Kirby D, Andersen P, Perrie Y. Liposome-based cationic adjuvant formulations (CAF): Past, present, and future. Vol. 19, *Journal of Liposome Research*. 2009.
38. Kauffman KJ, Webber MJ, Anderson DG. Materials for non-viral intracellular delivery of messenger RNA therapeutics. *J Control Release*. 2016;240.
39. Sedic M, Senn JJ, Lynn A, Laska M, Smith M, Platz SJ, et al. Safety Evaluation of Lipid Nanoparticle-Formulated Modified mRNA in the Sprague-Dawley Rat and Cynomolgus Monkey. *Vet Pathol*. 2018;55(2).
40. Thevenot J, Troutier AL, David L, Delair T, Ladavière C. Steric stabilization of lipid/polymer particle assemblies by poly(ethylene glycol)-lipids. *Biomacromolecules*. 2007;8(11).
41. Jayaraman M, Ansell SM, Mui BL, Tam YK, Chen J, Du X, et al. Maximizing the potency of siRNA lipid nanoparticles for hepatic gene silencing in vivo. *Angew Chemie - Int Ed*. 2012;51(34).
42. Maier MA, Jayaraman M, Matsuda S, Liu J, Barros S, Querbes W, et al. Biodegradable lipids enabling rapidly eliminated lipid nanoparticles for systemic delivery of RNAi therapeutics. *Mol Ther*. 2013;21(8).
43. Dahlman JE, Kauffman KJ, Xing Y, Shaw TE, Mir FF, Dlott CC, et al. Barcoded nanoparticles for high throughput in vivo discovery of targeted therapeutics. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017;114(8).

44. Wang F, Xiao W, Elbahnasawy MA, Bao X, Zheng Q, Gong L, et al. Optimization of the linker length of mannose-cholesterol conjugates for enhanced mRNA delivery to dendritic cells by liposomes. *Front Pharmacol.* 2018;9(SEP).
45. Kowalski PS, Rudra A, Miao L, Anderson DG. Delivering the Messenger: Advances in Technologies for Therapeutic mRNA Delivery. Vol. 27, *Molecular Therapy.* 2019.
46. Kaczmarek JC, Patel AK, Kauffman KJ, Fenton OS, Webber MJ, Heartlein MW, et al. Polymer–Lipid Nanoparticles for Systemic Delivery of mRNA to the Lungs. *Angew Chemie - Int Ed.* 2016;55(44).
47. Son S, Nam J, Zenkov I, Ochyl LJ, Xu Y, Scheetz L, et al. Sugar-Nanocapsules Imprinted with Microbial Molecular Patterns for mRNA Vaccination. *Nano Lett.* 2020;20(3).
48. Kowalski PS, Capasso Palmiero U, Huang Y, Rudra A, Langer R, Anderson DG. Ionizable amino-polyesters synthesized via ring opening polymerization of tertiary amino-alcohols for tissue selective mRNA delivery. *Adv Mater.* 2018;30(34).
49. Blakney AK, Zhu Y, McKay PF, Bouton CR, Yeow J, Tang J, et al. Big Is Beautiful: Enhanced saRNA Delivery and Immunogenicity by a Higher Molecular Weight, Bioreducible, Cationic Polymer. *ACS Nano.* 2020;14(5).
50. McKinlay CJ, Vargas JR, Blake TR, Hardy JW, Kanada M, Contag CH, et al. Charge-altering releasable transporters (CARTs) for the delivery and release of mRNA in living animals. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2017;114(4).
51. Zeng C, Zhang C, Walker PG, Dong Y. Formulation and Delivery Technologies for mRNA Vaccines. In: *Current Topics in Microbiology and Immunology.* 2022.
52. Liu L, Wang Y, Miao L, Liu Q, Musetti S, Li J, et al. Combination Immunotherapy of MUC1 mRNA Nano-vaccine and CTLA-4 Blockade Effectively Inhibits Growth of Triple Negative Breast Cancer. *Mol Ther.* 2018;26(1).
53. Le Moignic A, Malard V, Benvegno T, Lemiègre L, Berchel M, Jaffrès PA, et al. Preclinical evaluation of mRNA trimannosylated lipopolyplexes as therapeutic cancer vaccines targeting dendritic cells. *J Control Release.* 2018;278.

54. Persano S, Guevara ML, Li Z, Mai J, Ferrari M, Pompa PP, et al. Lipopolyplex potentiates anti-tumor immunity of mRNA-based vaccination. *Biomaterials*. 2017;125.
55. Ols S, Yang L, Thompson EA, Pushparaj P, Tran K, Liang F, et al. Route of Vaccine Administration Alters Antigen Trafficking but Not Innate or Adaptive Immunity. *Cell Rep*. 2020;30(12).
56. Pardi N, Tuyishime S, Muramatsu H, Kariko K, Mui BL, Tam YK, et al. Expression kinetics of nucleoside-modified mRNA delivered in lipid nanoparticles to mice by various routes. *J Control Release*. 2015;217.
57. Li M, Zhao M, Fu Y, Li Y, Gong T, Zhang Z, et al. Enhanced intranasal delivery of mRNA vaccine by overcoming the nasal epithelial barrier via intra- and paracellular pathways. *J Control Release*. 2016;228.
58. Perri S, Greer CE, Thudium K, Doe B, Legg H, Liu H, et al. An Alphavirus Replicon Particle Chimera Derived from Venezuelan Equine Encephalitis and Sindbis Viruses Is a Potent Gene-Based Vaccine Delivery Vector. *J Virol*. 2003;77(19).
59. Ulmer JB, Mason PW, Geall A, Mandl CW. RNA-based vaccines. Vol. 30, *Vaccine*. 2012.
60. Rayner JO, Dryga SA, Kamrud KI. Alphavirus vectors and vaccination. Vol. 12, *Reviews in Medical Virology*. 2002.
61. Beissert T, Perkovic M, Vogel A, Erbar S, Walzer KC, Hempel T, et al. A Trans-amplifying RNA Vaccine Strategy for Induction of Potent Protective Immunity. *Mol Ther*. 2020;28(1).
62. Lou G, Anderluzzi G, Schmidt ST, Woods S, Gallorini S, Brazzoli M, et al. Delivery of self-amplifying mRNA vaccines by cationic lipid nanoparticles: The impact of cationic lipid selection. *J Control Release*. 2020;325.
63. Schumacher TN, Schreiber RD. Neoantigens in cancer immunotherapy. Vol. 348, *Science*. 2015.

64. Reinhard K, Rengstl B, Oehm P, Michel K, Billmeier A, Hayduk N, et al. An RNA vaccine drives expansion and efficacy of claudin-CAR-T cells against solid tumors. *Science* (80-). 2020;367(6476).
65. Jabulowsky RA, Loquai C, Mitzel-Rink H, Utikal J, Gebhardt C, Hassel JC, et al. Abstract CT156: A first-in-human phase I/II clinical trial assessing novel mRNA-lipoplex nanoparticles encoding shared tumor antigens for immunotherapy of malignant melanoma. *Cancer Res.* 2018;78(13_Supplement).
66. Shariati M, Zhang H, Van de Sande L, Descamps B, Vanhove C, Willaert W, et al. High Pressure Nebulization (PIPAC) Versus Injection for the Intraperitoneal Administration of mRNA Complexes. *Pharm Res.* 2019;36(9).
67. Van Lint S, Renmans D, Broos K, Goethals L, Maenhout S, Benteyn D, et al. Intratumoral delivery of TriMix mRNA results in T-cell activation by cross-presenting dendritic cells. *Cancer Immunol Res.* 2016;4(2).
68. De Keersmaecker B, Claerhout S, Carrasco J, Bar I, Corthals J, Wilgenhof S, et al. TriMix and tumor antigen mRNA electroporated dendritic cell vaccination plus ipilimumab: Link between T-cell activation and clinical responses in advanced melanoma. *J Immunother Cancer.* 2020;8(1).
69. Hewitt SL, Bai A, Bailey D, Ichikawa K, Zielinski J, Karp R, et al. Durable anticancer immunity from intratumoral administration of IL-23, IL-36 γ , and OX40L mRNAs. *Sci Transl Med.* 2019;11(477).
70. Guo Y, Lei K, Tang L. Neoantigen vaccine delivery for personalized anticancer immunotherapy. Vol. 9, *Frontiers in Immunology.* 2018.
71. Kranz LM, Diken M, Haas H, Kreiter S, Loquai C, Reuter KC, et al. Systemic RNA delivery to dendritic cells exploits antiviral defence for cancer immunotherapy. *Nature.* 2016;534(7607).
72. Papachristofilou A, Hipp MM, Klinkhardt U, Früh M, Sebastian M, Weiss C, et al. Phase Ib evaluation of a self-adjuvanted protamine formulated mRNA-based active cancer immunotherapy, BI1361849 (CV9202), combined with local radiation treatment in patients with stage IV non-small cell lung cancer. *J Immunother Cancer.* 2019;7(1).

73. Batich KA, Mitchell DA, Healy P, Herndon JE, Sampson JH. Once, Twice, Three Times a Finding: Reproducibility of Dendritic Cell Vaccine Trials Targeting Cytomegalovirus in Glioblastoma. Vol. 26, *Clinical Cancer Research*. 2020.
74. Ott PA, Hu Z, Keskin DB, Shukla SA, Sun J, Bozym DJ, et al. An immunogenic personal neoantigen vaccine for patients with melanoma. *Nature*. 2017;547(7662).
75. Cafri G, Gartner JJ, Zaks T, Hopson K, Levin N, Paria BC, et al. mRNA vaccine–induced neoantigen-specific T cell immunity in patients with gastrointestinal cancer. *J Clin Invest*. 2020;130(11).
76. Chen X, Yang J, Wang L, Liu B. Personalized neoantigen vaccination with synthetic long peptides: recent advances and future perspectives. Vol. 10, *Theranostics*. 2020.
77. Amunts K, Zilles K, Miele L, Cordella-Miele E, Mukherjee AB, UNDERHILL AE, et al. Personalized RNA mutanome vaccines mobilize poly-specific therapeutic immunity against cancer. *Nature*. 2016;7(1).
78. Burris HA, Patel MR, Cho DC, Clarke JM, Gutierrez M, Zaks TZ, et al. A phase I multicenter study to assess the safety, tolerability, and immunogenicity of mRNA-4157 alone in patients with resected solid tumors and in combination with pembrolizumab in patients with unresectable solid tumors. *J Clin Oncol*. 2019;37(15_suppl).
79. Cleator IGM, Gourlay RH. Release of immunoreactive gastric inhibitory polypeptide (IR-GIP) by oral ingestion of food substances. *Am J Surg*. 1975;130(2).
80. Li L, Wice BM. Bombesin and nutrients independently and additively regulate hormone release from GIP/Ins cells. *Am J Physiol - Endocrinol Metab*. 2005;288(151-1).
81. Christensen MB. Glucose-dependent insulinotropic polypeptide: Effects on insulin and glucagon secretion in humans. *Dan Med J*. 2016;63(4).
82. Nauck MA, Quast DR, Wefers J, Pfeiffer AFH. The evolving story of incretins (GIP and GLP-1) in metabolic and cardiovascular disease: A pathophysiological update. Vol. 23, *Diabetes, Obesity and Metabolism*. 2021.
83. Heimbürger SMN, Hoe B, Nielsen CN, Bergman NC, Skov-Jeppesen K, Hartmann B, et al. GIP Affects Hepatic Fat and Brown Adipose Tissue Thermogenesis but Not

- White Adipose Tissue Transcriptome in Type 1 Diabetes. *J Clin Endocrinol Metab.* 2022;107(12).
84. Song DH, Getty-Kaushik L, Tseng E, Simon J, Corkey BE, Wolfe MM. Glucose-Dependent Insulinotropic Polypeptide Enhances Adipocyte Development and Glucose Uptake in Part Through Akt Activation. *Gastroenterology.* 2007;133(6).
 85. Timper K, Grisouard J, Sauter NS, Herzog-Radimerski T, Dembinski K, Peterli R, et al. Glucose-dependent insulinotropic polypeptide induces cytokine expression, lipolysis, and insulin resistance in human adipocytes. *Am J Physiol - Endocrinol Metab.* 2013;304(1).
 86. Waser B, Rehmann R, Sanchez C, Fourmy D, Reubi JC. Glucose-dependent insulinotropic polypeptide receptors in most gastroenteropancreatic and bronchial neuroendocrine tumors. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012;97(2).
 87. Afosah DK, Ofori E, Mottamal M, Al-Horani RA. Factor IX(a) inhibitors: an updated patent review (2003-present). *Expert Opin Ther Pat.* 2022;32(4).
 88. Zhu Y, Wang Y, Hu M, Lu X, Sun G. Identification of oncogenes and tumor-suppressor genes with hepatocellular carcinoma: A comprehensive analysis based on TCGA and GEO datasets. *Front Genet.* 2023;13.
 89. Makondi PT, Wei PL, Huang CY, Chang YJ. Development of novel predictive miRNA/ target gene pathways for colorectal cancer distance metastasis to the liver using a bioinformatic approach. *PLoS One.* 2019;14(2).
 90. Tanemura S, Seki N, Tsujimoto H, Saito S, Kikuchi J, Sugahara K, et al. Role of interferons (IFNs) in the differentiation of T peripheral helper (Tph) cells. *Int Immunol.* 2022;34(10).
 91. Tanemura S, Tsujimoto H, Seki N, Kojima S, Miyoshi F, Sugahara K, et al. Role of interferons (IFNs) in the differentiation of T peripheral helper (Tph) cells. *Int Immunol.* 2022;34(10).
 92. Long D, Chen Y, Wu H, Zhao M, Lu Q. Clinical significance and immunobiology of IL-21 in autoimmunity. Vol. 99, *Journal of Autoimmunity.* 2019.

93. Ali Abdulla A, Abdulaali Abed T, Razzaq Abdul-Ameer W. Impact of IL-21 Gene Polymorphisms (rs2055979) and the Levels of Serum IL-21 on the Risk of Multiple Sclerosis. *Arch Razi Inst.* 2022;77(1).
94. Ettinger R, Kuchen S, Lipsky PE. The role of IL-21 in regulating B-cell function in health and disease. Vol. 223, *Immunological Reviews.* 2008.
95. Yang Q, Qiao X, Li D, Chen B, Zhang L, Yuan C, et al. Expression and association of IL-21, FBXL20 and tumour suppressor gene PTEN in laryngeal cancer. *Saudi J Biol Sci.* 2019;26(8).
96. Ozmen F, Erdem GO, Kulacoglu S, Ozmen M, Kansu E. Interleukin-21 and Interleukin-32 gene expression levels and their relationship with clinicopathological parameters in colorectal cancer. *Ann Ital Chir.* 2022;92.
97. Araki A, Jin L, Nara H, Takeda Y, Nemoto N, Gazi MY, et al. IL-21 Enhances the Development of Colitis-Associated Colon Cancer: Possible Involvement of Activation-Induced Cytidine Deaminase Expression. *J Immunol.* 2019;202(11).
98. Linnebacher A, Mayer P, Marnet N, Bergmann F, Herpel E, Revia S, et al. Interleukin 21 receptor/ligand interaction is linked to disease progression in pancreatic cancer. *Cells.* 2019;8(9).
99. Wang LN, Cui YX, Ruge F, Jiang WG. Interleukin 21 and its receptor play a role in proliferation, migration and invasion of breast cancer cells. *Cancer Genomics and Proteomics.* 2015;12(5).
100. Su Z, Sun Y, Zhu H, Liu Y, Lin X, Shen H, et al. Th17 cell expansion in gastric cancer may contribute to cancer development and metastasis. *Immunol Res.* 2014;58(1).
101. Meng X, Yu X, Dong Q, Xu X, Li J, Xu Q, et al. Distribution of circulating follicular helper T cells and expression of interleukin-21 and chemokine C-X-C ligand 13 in gastric cancer. *Oncol Lett.* 2018;16(3).
102. Xue D, Yang P, Wei Q, Li X, Lin L, Lin T. IL-21/IL-21R inhibit tumor growth and invasion in non-small cell lung cancer cells via suppressing Wnt/ β -catenin signaling and PD-L1 expression. *Int J Mol Med.* 2019;44(5).

103. You Y, Deng J, Zheng J, Hu M, Li N, Wu H, et al. IL-21 gene polymorphism is associated with the prognosis of breast cancer in Chinese populations. *Breast Cancer Res Treat.* 2013;137(3).
104. Yan L, Zhang J, Guo D, Ma J, Shui SF, Han XW. IL-21R functions as an oncogenic factor and is regulated by the lncRNA MALAT1/miR-125a-3p axis in gastric cancer. *Int J Oncol.* 2019;54(1).
105. Bácsi K, Hitre E, Kósa JP, Horváth H, Lazáry Á, Lakatos PL, et al. Effects of the lactase 13910 C/T and calcium-sensor receptor A986S G/T gene polymorphisms on the incidence and recurrence of colorectal cancer in Hungarian population. *BMC Cancer.* 2008;8.
106. Lea IA, Sivashanmugam P, O'Rand MG. Zonadhesin: Characterization, localization, and zona pellucida binding. *Biol Reprod.* 2001;65(6).
107. Gasper J, Swanson WJ. Molecular population genetics of the gene encoding the human fertilization protein zonadhesin reveals rapid adaptive evolution. *Am J Hum Genet.* 2006;79(5).
108. Herlyn H, Zischler H. Sequence evolution, processing, and posttranslational modification of zonadhesin D domains in primates, as inferred from cDNA data. *Gene.* 2005;362(1–2).
109. Tardif S, Cormier N. Role of zonadhesin during sperm-egg interaction: A species-specific acrosomal molecule with multiple functions. Vol. 17, *Molecular Human Reproduction.* 2011.
110. Roberts EK, Tardif S, Wright EA, Platt RN, Bradley RD, Hardy DM. Rapid divergence of a gamete recognition gene promoted macroevolution of Eutheria. *Genome Biol.* 2022;23(1).
111. Effect of CCR3 gene on related inflammatory cells in respiratory allergic diseases. Vol. 35, *Journal of Clinical Otorhinolaryngology Head and Neck Surgery.* 2021.
112. Li B, Dong C, Wang G, Zheng H, Wang X, Bai C. Pulmonary epithelial CCR3 promotes LPS-induced lung inflammation by mediating release of IL-8. *J Cell Physiol.* 2011;226(9).

113. Gabuzda D, He J, Ohagen A, Vallat AV. Chemokine receptors in HIV-1 infection of the central nervous system. *Semin Immunol.* 1998;10(3).
114. Qi T xiong, Gao G hua, Liu S hua. [The expression of periphery blood leucocyte CCR3 and CCR5 in the children with Epstein-Barr virus associated infectious mononucleosis]. *Zhonghua Shi Yan He Lin Chuang Bing Du Xue Za Zhi.* 2010;24(5).
115. Liu X, Zhang H, Chang X, Shen J, Zheng W, Xu Y, et al. Upregulated expression of CCR3 in rheumatoid arthritis and CCR3-dependent activation of fibroblast-like synoviocytes. *Cell Biol Toxicol.* 2017;33(1).
116. Sugasawa H, Ichikura T, Tsujimoto H, Kinoshita M, Morita D, Ono S, et al. Prognostic significance of expression of CCL5/RANTES receptors in patients with gastric cancer. *J Surg Oncol.* 2008;97(5).
117. Liu F, Wu H. Cc chemokine receptors in lung adenocarcinoma: The inflammation-related prognostic biomarkers and immunotherapeutic targets. *J Inflamm Res.* 2021;14.
118. 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).
119. González HE, Leiva A, Tobar H, Böhmwald K, Tapia G, Torres J, et al. Altered chemokine receptor expression in papillary thyroid cancer. *Thyroid.* 2009;19(9).
120. Zhu F, Liu P, Li J, Zhang Y. Eotaxin-1 promotes prostate cancer cell invasion via activation of the CCR3-ERK pathway and upregulation of MMP-3 expression. *Oncol Rep.* 2014;31(5).
121. Ishida Y, Kido A, Akahane M, Kishi S, Tsukamoto S, Fujii H, et al. Mesenchymal stem cells up-regulate the invasive potential of prostate cancer cells via the eotaxin-3/CCR3 axis. *Pathol Res Pract.* 2018;214(9).
122. Gong DH, Fan L, Chen HY, Ding KF, Yu K Da. Intratumoral expression of CCR3 in breast cancer is associated with improved relapse-free survival in luminal-like disease. *Oncotarget.* 2016;7(19).

123. Zhang Q, Qin J, Zhong L, Gong L, Zhang B, Zhang Y, et al. CCL5-Mediated Th2 Immune Polarization Promotes Metastasis in Luminal Breast Cancer. *Cancer Res.* 2015;75(20).
124. Jöhrer K, Zelle-Rieser C, Perathoner A, Moser P, Hager M, Ramoner R, et al. Up-regulation of functional chemokine receptor CCR3 in human renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2005;11(7).
125. Tian M, Chen L, Ma L, Wang D, Shao B, Wu J, et al. Expression and prognostic significance of CCL11/CCR3 in glioblastoma. *Oncotarget.* 2016;7(22).
126. Chiang JYL, Ferrell JM. Up to date on cholesterol 7 alpha-hydroxylase (CYP7A1) in bile acid synthesis. Vol. 4, *Liver Research.* 2020.
127. Kosaka S, Miyashita M, McNamala K, Nomura M, Shima H, Kawai M, et al. Bird's eye view analysis of in situ cholesterol metabolic pathways in breast cancer patients and its clinicopathological significance in their subtypes. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2022;221.
128. Srivastava A, Choudhuri G, Mittal B. CYP7A1 (-204 A>C; rs3808607 and -469 T>C; rs3824260) promoter polymorphisms and risk of gallbladder cancer in North Indian population. *Metabolism.* 2010;59(6).
129. Zammit PS. Function of the myogenic regulatory factors Myf5, MyoD, Myogenin and MRF4 in skeletal muscle, satellite cells and regenerative myogenesis. Vol. 72, *Seminars in Cell and Developmental Biology.* 2017.
130. Di Gioia SA, Shaaban S, Tüysüz B, Elcioglu NH, Chan WM, Robson CD, et al. Recessive MYF5 Mutations Cause External Ophthalmoplegia, Rib, and Vertebral Anomalies. *Am J Hum Genet.* 2018;103(1).
131. Ignatius MS, Chen E, Elpek NM, Fuller AZ, Tenente IM, Clagg R, et al. In Vivo Imaging of Tumor-Propagating Cells, Regional Tumor Heterogeneity, and Dynamic Cell Movements in Embryonal Rhabdomyosarcoma. *Cancer Cell.* 2012;21(5).
132. Tonin PN, Scrable H, Cavenee WK, Shimada H. Muscle-specific Gene Expression in Rhabdomyosarcomas and Stages of Human Fetal Skeletal Muscle Development. *Cancer Res.* 1991;51(19).

133. Shahabipour F, Oskuee RK, Shokrgozar MA, Naderi-Meshkin H, Goshayeshi L, Bonakdar S. CRISPR/Cas9 mediated GFP-human dentin matrix protein 1 (DMP1) promoter knock-in at the ROSA26 locus in mesenchymal stem cell for monitoring osteoblast differentiation. *J Gene Med.* 2020;22(12).
134. Rios HF, Ye L, Dusevich V, Eick D, Bonewald LF, Feng JQ. DMP1 is essential for osteocyte formation and function. *J Musculoskelet Neuronal Interact.* 2005;5(4).
135. Martinez EF, da Silva LAH, Furuse C, de Araújo NS, de Araújo VC. Dentin matrix protein 1 (DMP1) expression in developing human teeth. *Braz Dent J.* 2009;20(5).
136. Lorenz-Depiereux B, Bastepe M, Benet-Pagès A, Amyere M, Wagenstaller J, Müller-Barth U, et al. DMP1 mutations in autosomal recessive hypophosphatemia implicate a bone matrix protein in the regulation of phosphate homeostasis. *Nat Genet.* 2006;38(11).
137. Bastida G, Ramírez F, Exeni G, Costa M, Ávilaa SA. First report in Argentina of a pathogenic DMP1 variant associated with autosomal recessive hypophosphatemic rickets. *Arch Argent Pediatr.* 2023;121(2).
138. Gannagé-Yared MH, Makrythanasis P, Chouery E, Sobacchi C, Mehawej C, Santoni FA, et al. Exome sequencing reveals a mutation in DMP1 in a family with familial sclerosing bone dysplasia. *Bone.* 2014;68.
139. Martin A, Kentrup D. The Role of DMP1 in CKD-MBD. Vol. 19, *Current Osteoporosis Reports.* 2021.
140. Yoon CY, Park J, Seo C, Nam BY, Kim S, Kee YK, et al. Low Dentin Matrix Protein 1 Is Associated With Incident Cardiovascular Events in Peritoneal Dialysis Patients. *J Bone Miner Res.* 2016;31(12).
141. Chaplet M, De Leval L, Waltregny D, Detry C, Fornaciari G, Bevilacqua G, et al. Dentin matrix protein 1 is expressed in human lung cancer. *J Bone Miner Res.* 2003;18(8).
142. Bucciarelli E, Sidoni A, Bellezza G, Cavaliere A, Brachelente G, Costa G, et al. Low dentin matrix protein 1 expression correlates with skeletal metastases development in breast cancer patients and enhances cell migratory capacity in vitro. *Breast Cancer Res Treat.* 2007;105(1).

143. Toyosawa S, Tomita Y, Kishino M, Hashimoto J, Ueda T, Tsujimura T, et al. Expression of dentin matrix protein 1 in tumors causing oncogenic osteomalacia. *Mod Pathol*. 2004;17(5).
144. Jain A, McKnight DA, Fisher LW, Humphreys EB, Mangold LA, Partin AW, et al. Small integrin-binding proteins as serum markers for prostate cancer detection. *Clin Cancer Res*. 2009;15(16).
145. Kalliokoski A, Niemi M. Impact of OATP transporters on pharmacokinetics. Vol. 158, *British Journal of Pharmacology*. 2009.
146. Mahagita C, Grassl SM, Piyachaturawat P, Ballatori N. Human organic anion transporter 1B1 and 1B3 function as bidirectional carriers and do not mediate GSH-bile acid cotransport. *Am J Physiol - Gastrointest Liver Physiol*. 2007;293(1).
147. Van De Steeg E, Stránecký V, Hartmannová H, Nosková L, Hřebíček M, Wagenaar E, et al. Complete OATP1B1 and OATP1B3 deficiency causes human Rotor syndrome by interrupting conjugated bilirubin reuptake into the liver. *J Clin Invest*. 2012;122(2).
148. Yamashiro W, Maeda K, Hirouchi M, Adachi Y, Hu Z, Sugiyama Y. Involvement of transporters in the hepatic uptake and biliary excretion of valsartan, a selective antagonist of the angiotensin II AT1-receptor, in humans. *Drug Metab Dispos*. 2006;34(7).
149. Liu L, Cui Y, Chung AY, Shitara Y, Sugiyama Y, Keppler D, et al. Vectorial transport of enalapril by Oatp1a1/Mrp2 and OATP1B1 and OATP1B3/MRP2 in rat and human livers. *J Pharmacol Exp Ther*. 2006;318(1).
150. Bednarczyk D, Boisselle C. Organic anion transporting polypeptide (OATP)-mediated transport of coproporphyrins I and III. *Xenobiotica*. 2016;46(5).
151. Han JM, Choi KH, Lee HH, Gwak HS. Association between SLCO1B1 polymorphism and methotrexate-induced hepatotoxicity: A systematic review and meta-analysis. *Anticancer Drugs*. 2022;33(1).
152. Pressler H, Sissung TM, Venzon D, Price DK, Figg WD. Expression of OATP family members in hormone-related cancers: Potential markers of progression. *PLoS One*. 2011;6(5).

153. Obaidat A, Roth M, Hagenbuch B. The expression and function of organic anion transporting polypeptides in normal tissues and in cancer. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2012;52.
154. Bui HTT, Fujimoto N, Kubo T, Inatomi H, Matsumoto T. SLCO1B1, SLCO2B1, and SLCO1B3 polymorphisms and susceptibility to bladder cancer risk. *Cancer Invest.* 2014;32(6).
155. Powers CJ, McLeskey SW, Wellstein A. Fibroblast growth factors, their receptors and signaling. Vol. 7, *Endocrine-Related Cancer.* 2000.
156. Sun J, Zhou J, Zhou J, Xu W, Du Y, Jia Z, et al. FGF4 Promotes Skin Wound Repair through p38 MAPK and GSK3 β -Mediated Stabilization of Slug. *J Invest Dermatol.* 2023;143(6).
157. Weber FA, Bartolomei G, Hottiger MO, Cinelli P. Artd1/Parp1 regulates reprogramming by transcriptional regulation of Fgf4 Via Sox2 ADP-Ribosylation. *Stem Cells.* 2013;31(11).
158. Farré J, Roura S, Prat-Vidal C, Soler-Botija C, Llach A, Molina CE, et al. FGF-4 increases in vitro expansion rate of human adult bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Growth Factors.* 2007;25(2).
159. Jiang H, Fang Y, Wang Y, Li T, Lin H, Lin J, et al. FGF4 improves hepatocytes ferroptosis in autoimmune hepatitis mice via activation of C1SD3. *Int Immunopharmacol.* 2023;116.
160. Grillo L, Greco D, Pettinato R, Avola E, Potenza N, Castiglia L, et al. Increased FGF3 and FGF4 gene dosage is a risk factor for craniosynostosis. *Gene.* 2014;534(2).
161. Urbini M, Astolfi A, Indio V, Nannini M, Schipani A, Bacalini MG, et al. Gene duplication, rather than epigenetic changes, drives FGF4 overexpression in KIT/PDGFR α /SDH/RAS-P WT GIST. *Sci Rep.* 2020;10(1).
162. Ye YW, Zhou Y, Yuan L, Wang CM, Du CY, Zhou XY, et al. Fibroblast growth factor receptor 4 regulates proliferation and antiapoptosis during gastric cancer progression. *Cancer.* 2011;117(23).

163. Chen TH, Yang SF, Liu YF, Lin WL, Han CP, Wang PH. Association of Fibroblast Growth Factor Receptor 4 Genetic Polymorphisms With the Development of Uterine Cervical Cancer and Patient Prognosis. *Reprod Sci.* 2018;25(1).
164. Yasuda K, Torigoe T, Mariya T, Asano T, Kuroda T, Matsuzaki J, et al. Fibroblasts induce expression of FGF4 in ovarian cancer stem-like cells/cancer-initiating cells and upregulate their tumor initiation capacity. *Lab Investig.* 2014;94(12).
165. Zhang C, Yang T, Jiang H. miR-511 inhibits proliferation and metastasis of breast cancer cells by targeting FGF4. *J Gene Med.* 2020;22(9).
166. Wang P, Branch DR, Bali M, Schultz GA, Goss PE, Jin T. The POU homeodomain protein OCT3 as a potential transcriptional activator for fibroblast growth factor-4 (FGF-4) in human breast cancer cells. *Biochem J.* 2003;375(1).
167. Shi H, Li Y, Feng G, Li L, Fang R, Wang Z, et al. The oncoprotein HBXIP up-regulates FGF4 through activating transcriptional factor Sp1 to promote the migration of breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2016;471(1).
168. Lou X, Bao R, Zhou CZ, Chen Y. Structure of the thioredoxin-fold domain of human phosphducin-like protein 2. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun.* 2009;65(2).
169. Stirling PC, Srayko M, Takhar KS, Pozniakovsky A, Hyman AA, Leroux MR. Functional interaction between phosphducin-like protein 2 and cytosolic chaperonin is essential for cytoskeletal protein function and cell cycle progression. *Mol Biol Cell.* 2007;18(6).
170. Jamin SP, Hikmet F, Mathieu R, Jégou B, Lindskog C, Chalmel F, et al. Combined RNA/tissue profiling identifies novel Cancer/testis genes. *Mol Oncol.* 2021;15(11).
171. Stravalaci M, Pagani I, Paraboschi EM, Pedotti M, Doni A, Scavello F, et al. Recognition and inhibition of SARS-CoV-2 by humoral innate immunity pattern recognition molecules. *Nat Immunol.* 2022;23(2).
172. Hurler L, Szilágyi Á, Mescia F, Bergamaschi L, Mező B, Sinkovits G, et al. Complement lectin pathway activation is associated with COVID-19 disease severity, independent of MBL2 genotype subgroups. *Front Immunol.* 2023;14.

173. Ruffles T, Basu K, Inglis SK, Bremner S, Rabe H, Memon A, et al. Mannose-binding lectin genotype is associated with respiratory disease in young children: A multicenter cohort study. *Pediatr Pulmonol.* 2022;57(11).
174. Belfrage E, Jinnestål CL, Jönsen A, Bengtsson A, Åkesson A, Schmidtchen A, et al. Role of Mannose-binding Lectin and Association with Microbial Sensitization in a Cohort of Patients with Atopic Dermatitis. *Acta Derm Venereol.* 2023;103.
175. Zupin L, Polesello V, Casalicchio G, Freato N, Maestri I, Comar M, et al. MBL2 polymorphisms in women with atypical squamous cells of undetermined significance. *J Med Virol.* 2015;87(5).
176. Xu CY, Dong JF, Chen ZQ, Ding GS, Fu ZR. MiR-942-3p Promotes the Proliferation and Invasion of Hepatocellular Carcinoma Cells by Targeting MBL2. *Cancer Control.* 2019;26(1).
177. Swierzko AS, Szala A, Sawicki S, Szemraj J, Sniadecki M, Sokolowska A, et al. Mannose-Binding Lectin (MBL) and MBL-associated serine protease-2 (MASP-2) in women with malignant and benign ovarian tumours. *Cancer Immunol Immunother.* 2014;63(11).
178. Han HC, Ying M, Yi HT, Guo Y, McElreavey K, Rong JZ. Transcriptional diversity of DMRT1 (dsx- and mab3-related transcription factor 1) in human testis. *Cell Res.* 2006;16(4).
179. Lima AC, Carvalho F, Gonçalves J, Fernandes S, Marques PI, Sousa M, et al. Rare double sex and mab-3-related transcription factor 1 regulatory variants in severe spermatogenic failure. *Andrology.* 2015;3(5).
180. Emich J, Gaikwad AS, Stallmeyer B, Fietz D, Schuppe HC, Oud MS, et al. Functional assessment of DMRT1 variants and their pathogenicity for isolated male infertility. *Fertil Steril.* 2023;119(2).
181. Krentz AD, Murphy MW, Zhang T, Sarver AL, Jain S, Griswold MD, et al. Interaction between DMRT1 function and genetic background modulates signaling and pluripotency to control tumor susceptibility in the fetal germ line. *Dev Biol.* 2013;377(1).

182. Roth LM, Michal M, Michal M, Cheng L. Protein expression of the transcription factors DMRT1, TCLF5, and OCT4 in selected germ cell neoplasms of the testis. *Hum Pathol.* 2018;82.
183. Timasheva Y, Putku M, Kivi R, Kožich V, Männik J, Laan M. Developmental programming of growth: Genetic variant in GH2 gene encoding placental growth hormone contributes to adult height determination. *Placenta.* 2013;34(11).
184. Zeck W, Widberg C, Maylin E, Desoye G, Lang U, Mcintyre D, et al. Regulation of placental growth hormone secretion in a human trophoblast model - The effects of hormones and adipokines. *Pediatr Res.* 2008;63(4).
185. Mittal P, Espinoza J, Hassan S, Kusanovic JP, Edwin SS, Nien JK, et al. Placental growth hormone is increased in the maternal and fetal serum of patients with preeclampsia. *J Matern Neonatal Med.* 2007;20(9).
186. Christiansen M. Placental growth hormone and growth hormone binding protein are first trimester maternal serum markers of Down syndrome. *Prenat Diagn.* 2009;29(13).
187. Silva C, Zhang K, Tsutsui S, Holden JK, Gill MJ, Power C. Growth Hormone Prevents Human Immunodeficiency Virus-Induced Neuronal p53 Expression. *Ann Neurol.* 2003;54(5).
188. Silva CM, Kloth MT, Lyons CE, Dunn CR, Kirk SE. Intracellular signaling by growth hormone variant (GH-V). *Growth Horm IGF Res.* 2002;12(5).
189. Doyle JM, Gao J, Wang J, Yang M, Potts PR. MAGE-RING protein complexes comprise a family of E3 ubiquitin ligases. *Mol Cell.* 2010;39(6).
190. Ravichandran R, Kodali K, Peng J, Potts PR. Regulation of MAGE -A3/6 by the CRL 4- DCAF 12 ubiquitin ligase and nutrient availability . *EMBO Rep.* 2019;20(7).
191. Yang B, O'Herrin SM, Wu J, Reagan-Shaw S, Ma Y, Bhat KMR, et al. MAGE-A, mMage-b, and MAGE-C proteins form complexes with KAP1 and suppress p53-dependent apoptosis in MAGE-positive cell lines. *Cancer Res.* 2007;67(20).

192. Gaugler B, Van Den Eynde B, Van Der Bruggen P, Romero P, Gaforio JJ, De Plaen E, et al. Human gene MAGE-3 codes for an antigen recognized on a melanoma by autologous cytolytic T lymphocytes. *J Exp Med.* 1994;179(3).
193. Bujas T, Marušić Z, Perić Balja M, Mijić A, Krušlin B, Tomas D. MAGE-A 3/4 and NY-ESO-1 antigens expression in metastatic esophageal squamous cell carcinoma. *Eur J Histochem.* 2011;55(1).
194. Xie C, Subhash VV, Datta A, Liem N, Tan SH, Yeo MS, et al. Melanoma associated antigen (MAGE)-A3 promotes cell proliferation and chemotherapeutic drug resistance in gastric cancer. *Cell Oncol.* 2016;39(2).
195. Yu QY, Wang ZW, Zhou MY, Li SF, Liao XH. MAGE-A3 regulates tumor stemness in gastric cancer through the PI3K/AKT pathway. *Aging (Albany NY).* 2022;14(23).
196. Lausenmeyer EM, Braun K, Breyer J, Gierth M, Denzinger S, Burger M, et al. Strong expression of cancer testis antigens CTAG1B and MAGEA3 is correlated with unfavourable histopathological features and MAGEA3 is associated with worse progression-free survival in urothelial bladder cancer. *Urol Int.* 2019;102(1).
197. Kim SH, Lee S, Lee CH, Lee MK, Kim YD, Shin DH, et al. Expression of cancer-testis antigens MAGE-A3/6 and NY-ESO-1 in non-small-cell lung carcinomas and their relationship with immune cell infiltration. *Lung.* 2009;187(6).
198. Craig AJ, Garcia-Lezana T, de Galarreta MR, Villacorta-Martin C, Kozlova EG, Martins-Filho SN, et al. Transcriptomic characterization of cancer-testis antigens identifies MAGEA3 as a driver of tumor progression in hepatocellular carcinoma. *PLoS Genet.* 2021;17(6).
199. khalvandi A, Abolhasani M, Madjd Z, Shekarabi M, Kouros-Arami M, Mohsenzadegan M. Nuclear overexpression levels of MAGE-A3 predict poor prognosis in patients with prostate cancer. *APMIS.* 2021;129(6).
200. Gao X, Chen G, Cai H, Wang X, Song K, Liu L, et al. Aberrantly enhanced melanoma-associated antigen (MAGE)-A3 expression facilitates cervical cancer cell proliferation and metastasis via actuating Wnt signaling pathway. *Biomed Pharmacother.* 2020;122.

201. Jin J, Jing W, Lei XX, Feng C, Peng S, Boris-Lawrie K, et al. Evidence that Lin28 stimulates translation by recruiting RNA helicase A to polysomes. *Nucleic Acids Res.* 2011;39(9).
202. Heo I, Joo C, Cho J, Ha M, Han J, Kim VN. Lin28 Mediates the Terminal Uridylation of let-7 Precursor MicroRNA. *Mol Cell.* 2008;32(2).
203. Heo I, Joo C, Kim YK, Ha M, Yoon MJ, Cho J, et al. TUT4 in Concert with Lin28 Suppresses MicroRNA Biogenesis through Pre-MicroRNA Uridylation. *Cell.* 2009;138(4).
204. Piskounova E, Polytarchou C, Thornton JE, Lapierre RJ, Pothoulakis C, Hagan JP, et al. Lin28A and Lin28B inhibit let-7 MicroRNA biogenesis by distinct mechanisms. *Cell.* 2011;147(5).
205. Thornton JE, Chang HM, Piskounova E, Gregory RI. Lin28-mediated control of let-7 microRNA expression by alternative TUTases Zcchc11 (TUT4) and Zcchc6 (TUT7). *RNA.* 2012;18(10).
206. Chang M, Oh B, Choi J, Sulistio YA, Woo H, Jo A, et al. LIN 28A loss of function is associated with Parkinson's disease pathogenesis. *EMBO J.* 2019;38(24).
207. Park JH, Park BW, Kang YH, Byun SH, Hwang SC, Kim DR, et al. Lin28a enhances in vitro osteoblastic differentiation of human periosteum-derived cells. *Cell Biochem Funct.* 2017;35(8).
208. Chen J, Liu W. Lin28a induced mitochondrial dysfunction in human granulosa cells via suppressing LARS2 expression. *Cell Signal.* 2023;103.
209. Qiu JL, Huang PZ, You JH, Zou RH, Wang L, Hong J, et al. LIN28 expression and prognostic value in hepatocellular carcinoma patients who meet the Milan criteria and undergo hepatectomy. *Chin J Cancer.* 2012;31(5).
210. Qin R, Zhou J, Chen C, Xu T, Yan Y, Ma Y, et al. LIN28 is involved in glioma carcinogenesis and predicts outcomes of glioblastoma multiforme patients. *PLoS One.* 2014;9(1).
211. Tummala R, Nadiminty N, Lou W, Zhu Y, Gandour-Edwards R, Chen HW, et al. Lin28 promotes growth of prostate cancer cells and activates the androgen receptor. *Am J Pathol.* 2013;183(1).

212. Huang J, Lin H, Zhong M, Huang J, Sun S, Lin L, et al. Role of lin28a/let-7a/c-myc pathway in growth and malignant behavior of papillary thyroid carcinoma. *Med Sci Monit.* 2018;24.
213. Wang Z, Pang J, Ji B, Zhang S, Cheng Y, Yu L, et al. RNA binding protein Lin28A promotes osteocarcinoma cells progression by associating with the long noncoding RNA MALAT1. *Biotechnol Lett.* 2018;40(3).
214. Wang T, He Y, Zhu Y, Chen M, Weng M, Yang C, et al. Comparison of the expression and function of Lin28A and Lin28B in colon cancer. *Oncotarget.* 2016;7(48).
215. Wang T, Han P, He Y, Zhao C, Wang G, Yang W, et al. Lin28A enhances chemosensitivity of colon cancer cells to 5-FU by promoting apoptosis in a let-7 independent manner. *Tumor Biol.* 2016;37(6).
216. Wang Q, Zhou J, Guo J, Teng R, Shen J, Huang Y, et al. Lin28 promotes Her2 expression and Lin28/Her2 predicts poorer survival in gastric cancer. *Tumor Biol.* 2014;35(11).
217. Shen H, Zhao L, Feng X, Xu C, Li C, Niu Y. Lin28A activates androgen receptor via regulation of c-myc and promotes malignancy of ER-/Her2+ breast cancer. *Oncotarget.* 2016;7(37).
218. Korshunov A, Ryzhova M, Jones DTW, Northcott PA, Van Sluis P, Volckmann R, et al. LIN28A immunoreactivity is a potent diagnostic marker of embryonal tumor with multilayered rosettes (ETMR). *Acta Neuropathol.* 2012;124(6).
219. Shannon M, Richardson L, Christian A, Handel MA, Thelen MP. Differential gene expression of mammalian SPO11/TOP6A homologs during meiosis. *FEBS Lett.* 1999;462(3).
220. Ren ZJ, Ren PW, Yang B, Liao J, Liu SZ, Fang K, et al. The SPO11-C631T gene polymorphism and male infertility risk: A meta-analysis. *Ren Fail.* 2017;39(1).
221. Ghalkhani E, Sheidai M, Gourabi H, Noormohammadi Z, Bakhtari N, Malekasgar AM. Study of single nucleotide polymorphism (rs28368082) in SPO11 gene and its association with male infertility. *J Assist Reprod Genet.* 2014;31(9).

222. Robert T, Vrielynck N, Mézard C, de Massy B, Grelon M. A new light on the meiotic DSB catalytic complex. Vol. 54, *Seminars in Cell and Developmental Biology*. 2016.
223. Panula S, Reda A, Stukenborg JB, Ramathal C, Sukhwani M, Albalushi H, et al. Over expression of NANOS3 and DAZL in human embryonic stem cells. *PLoS One*. 2016;11(10).
224. Cauffman G, Van de Velde H, Liebaers I, Van Steirteghem A. DAZL expression in human oocytes, preimplantation embryos and embryonic stem cells. *Mol Hum Reprod*. 2005;11(6).
225. Pan HA, Tsai SJ, Chen CW, Lee YC, Lin YM, Kuo PL. Expression of DAZL protein in the human corpus luteum. *Mol Hum Reprod*. 2002;8(6).
226. Tsai MY, Chang SY, Lo HY, Chen IH, Huang FJ, Kung FT, et al. The expression of DAZL1 in the ovary of the human female fetus. *Fertil Steril*. 2000;73(3).
227. Collier B, Gorgoni B, Loveridge C, Cooke HJ, Gray NK. The DAZL family proteins are PABP-binding proteins that regulate translation in germ cells. *EMBO J*. 2005;24(14).
228. Nailwal M, Chauhan JB. In silico analysis of non-synonymous single nucleotide polymorphisms in human DAZL gene associated with male infertility. *Syst Biol Reprod Med*. 2017;63(4).
229. Chen P, Wang X, Xu C, Xiao H, Zhang WH, Wang XH, et al. Association of polymorphisms of A260G and A386G in DAZL gene with male infertility: A meta-analysis and systemic review. *Asian J Androl*. 2016;18(1).
230. Kuo PL, Wang ST, Lin YM, Lin YH, Teng YN, Hsu CC. Expression profiles of the DAZ gene family in human testis with and without spermatogenic failure. *Fertil Steril*. 2004;81(4).
231. Hsu CC, Kuo PH, Lee IW, Su MT, Tseng JT, Kuo PL. Quantitative trait analysis suggests human DAZL may be involved in regulating sperm counts and motility. *Reprod Biomed Online*. 2010;21(1).
232. Zhang F, Liu R, Zhang H, Liu C, Liu C, Lu Y. Suppressing Dazl modulates tumorigenicity and stemness in human glioblastoma cells. *BMC Cancer*. 2020;20(1).

233. Lifschitz-Mercer B, Elliott DJ, Issakov J, Leider-Trejo L, Schreiber L, Misonzhnik F, et al. Localization of a specific germ cell marker, DAZL1, in testicular germ cell neoplasias. *Virchows Arch.* 2002;440(4).
234. Kounnis V, Chondrogiannis G, Mantzaris MD, Tzakos AG, Fokas D, Papanikolaou NA, et al. Microcystin lr shows cytotoxic activity against pancreatic cancer cells expressing the membrane OATP1B1 and OATP1B3 transporters. *Anticancer Res.* 2015;35(11).
235. Xu J, Suo L, Zhao J, Cai T, Mei N, Du P, et al. MBL2 polymorphism may be a protective factor of autoimmune thyroid disease susceptibility. *Mol Genet Genomics.* 2023;298(1).
236. Zanetti KA, Haznadar M, Welsh JA, Robles AI, Ryan BM, McClary AC, et al. 3'-UTR and functional secretor haplotypes in mannose-binding lectin 2 are associated with increased colon cancer risk in African Americans. *Cancer Res.* 2012;72(6).
237. Subbannayya Y, Mir SA, Renuse S, Manda SS, Pinto SM, Puttamallesh VN, et al. Identification of differentially expressed serum proteins in gastric adenocarcinoma. *J Proteomics.* 2015;127.
238. Pine SR, Mechanic LE, Ambs S, Bowman ED, Chanock SJ, Loffredo C, et al. Lung cancer survival and functional polymorphisms in MBL2, an innate-immunity gene. *J Natl Cancer Inst.* 2007;99(18).
239. Pylayeva-Gupta Y, Lee KE, Hajdu CH, Miller G, Bar-Sagi D. Oncogenic Kras-Induced GM-CSF Production Promotes the Development of Pancreatic Neoplasia. *Cancer Cell.* 2012;21(6).
240. Braun B, Lange M, Oeckler R, Mueller MM. Expression of G-CSF and GM-CSF in human meningiomas correlates with increased tumor proliferation and vascularization. *J Neurooncol.* 2004;68(2).
241. Rebernick RJ, Bell HN, Bauer TM, McEwen D, Werkman DF, Chang AC, et al. Role of IL4 and GMCSF in Predicting Survival in Esophageal Cancer. *J Am Coll Surg.* 2023;236(1).
242. Revoltella RP, Menicagli M, Campani D. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor as an autocrine survival-growth factor in human gliomas. *Cytokine.* 2012;57(3).

243. Lu Z, Kim KA, Suico MA, Uto A, Seki Y, Shuto T, et al. ETS2 is involved in protein kinase C-activated expression of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in human non-small lung carcinoma cell line, A549. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003;303(1).
244. Rudisch A, Dewhurst MR, Horga LG, Kramer N, Harrer N, Dong M, et al. High EMT signature score of invasive Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC) cells correlates with NF κ B driven colony-stimulating factor 2 (CSF2/GM-CSF) secretion by neighboring stromal fibroblasts. *PLoS One.* 2015;10(4).
245. Ruark E, Seal S, McDonald H, Zhang F, Elliot A, Lau K, et al. Identification of nine new susceptibility loci for testicular cancer, including variants near DAZL and PRDM14. *Nat Genet.* 2013;45(6).
246. Cui G, Yuan A, Zhu L, Florholmen J, Goll R. Increased expression of interleukin-21 along colorectal adenoma-carcinoma sequence and its predicating significance in patients with sporadic colorectal cancer. *Clin Immunol.* 2017;183.
247. Hashimoto-Kataoka T, Hosen N, Sonobe T, Arita Y, Yasui T, Masaki T, et al. Interleukin-6/interleukin-21 signaling axis is critical in the pathogenesis of pulmonary arterial hypertension. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015;112(20).
248. Gu YZ, Fan CW, Lu R, Shao B, Sang YX, Huang QR, et al. Forced co-expression of IL-21 and IL-7 in whole-cell cancer vaccines promotes antitumor immunity. *Sci Rep.* 2016;6.
249. Sun C, Zhang YY, Tang CL, Wang SC, Piao HL, Tao Y, et al. Chemokine CCL28 induces apoptosis of decidual stromal cells via binding CCR3/CCR10 in human spontaneous abortion. *Mol Hum Reprod.* 2013;19(10).
250. Haber A, Polania-Baron EJ, Bolaños-Jimenez R, Navas A, Graue Hernandez EO, Garfias Y. Analysis of CCR3 expression in corneal neovascularization in a murine model and human corneas. *Exp Eye Res.* 2020;197.
251. Faghfuri E, Pourfarzi F, Faghfour AH, Abdoli Shadbad M, Hajiasgharzadeh K, Baradaran B. Recent developments of RNA-based vaccines in cancer immunotherapy. Vol. 21, *Expert Opinion on Biological Therapy.* 2021.
252. Guo C, Manjili MH, Subjectk JR, Sarkar D, Fisher PB, Wang XY. Therapeutic cancer vaccines. Past, present, and future. In: *Advances in Cancer Research.* 2013.

253. Polack FP, Thomas SJ, Kitchin N, Absalon J, Gurtman A, Lockhart S, u. a. Safety and Efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 Vaccine. *New England Journal Of Medicine/The New England Journal Of Medicine* [Internet]. 31. Dezember 2020b;383(27):2603–15.
254. DeVita, Hellman, and Rosenberg's Cancer, 10th ed. *Principles & Practice of Oncology*. 1. Januar 2015;116(6):1096.
255. Van Mieghem NM, Unverdorben M, Hengstenberg C, Möllmann H, Mehran R, López-Otero D, u. a. Edoxaban versus Vitamin K Antagonist for Atrial Fibrillation after TAVR. *New England Journal Of Medicine/The New England Journal Of Medicine* [Internet]. 2. Dezember 2021;385(23):2150–60.
256. Swallow DM. Genetics of Lactase Persistence and Lactose Intolerance. *Annual Review Of Genetics* [Internet]. 1. Dezember 2003;37(1):197–219.

Supplementary Data

STabelle 1. Unterschiedliche GetEx Bezeichnungen und deren anatomisches Korrelat.

| GetEx Bezeichnung | Gewebetypus |
|---------------------------------------|---|
| adipose_subcutaneous | Subkutanes Fettgewebe |
| adipose_visceral_omentum | Viscerales Fettgewebe (Omentum majus) |
| adrenal_gland | Nebenniere |
| artery_aorta | Aorta |
| artery_coronary | Koronararterie |
| artery_tibial | Arteria tibialis posterior |
| Bladder | Blase |
| brain_amygdala | Gehirn: Amygdala |
| brain_anterior_cingulate_cortex_ba24 | Gehirn: Cortex cingularis anterior |
| brain_caudate_basal_ganglia | Gehirn: Nucleus caudatus (Basalganglien) |
| brain_cerebellar_hemisphere | Gehirn: Cerebellare Hemisphäre |
| brain_cerebellum | Gehirn: Kleinhirn |
| brain_cortex | Gehirn: Cortex |
| brain_frontal_cortex_ba9 | Gehirn: frontaler Cortex |
| brain_hippocampus | Gehirn: Hippocampus |
| brain_hypothalamus | Gehirn: Hypothalamus |
| brain_nucleus_accumbens_basal_ganglia | Gehirn: nucleus accumbens (Basalganglion) |
| brain_putamen_basal_ganglia | Gehirn: Putamen (Basalganglion) |
| brain_spinal_cord_cervical_c-1 | Gehirn: Rückenmark C1 |
| brain_substantia_nigra | Gehirn: Substantia nigra |
| breast_mammary_tissue | Brustdrüsengewebe |
| cells_cultured_fibroblasts | Fibroblasten aus der Zellkultur |
| cells_ebv-transformed_lymphocytes | EBV-transformierte Lymphozyten |
| cervix_ectocervix | vaginaler Teil des Gebärmutterhalses |
| colon_sigmoid | Colon sigmoideum |
| colon_transverse | Colon transversum |
| esophagus_gastroesophageal_junction | Ösophagus: gastroösophagealer Übergang |
| esophagus_mucosa | Ösophagusschleimhaut |
| esophagus_muscularis | Ösophagus: Tunica muscularis |
| fallopian_tube | Tuba uterina |
| heart_atrial_appendage | Herzohr |
| heart_left_ventricle | Linker Herzkammer |
| kidney_cortex | Nierenrinde |
| kidney_medulla | Nierenmark |
| Liver | Leber |
| Lung | Lunge |
| minor_salivary_gland | Speicheldrüsen |
| muscle_skeletal | Skelettmuskel |
| nerve_tibial | Nervus tibialis |
| Ovary | Eierstöcke |
| Pancreas | Bauchspeicheldrüse |
| Pituitary | Hypophyse |

| | |
|---------------------------------|---|
| Prostate | Prostata |
| skin_not_sun_exposed_suprapubic | Nicht-Sonnenexponierte suprapubische Haut |
| skin_sun_exposed_lower_leg | Sonnenexponierte Haut am unteren Bein |
| small_intestine_terminal_ileum | Terminales Ileum |
| Spleen | Milz |
| Stomach | Magen |
| Testis | Hoden |
| Thyroid | Schilddrüse |
| Uterus | Gebärmutter |
| Vagina | Vagina |
| whole blood | Vollblut |

STabelle 2. Krebsarten in der Datenbank von proteinatlas.org

| Proteinatlas Bezeichnung | Krebsart |
|---------------------------------|---------------------------|
| Glioma | Gliom |
| Thyroid cancer | Schilddrüsenkarzinom |
| Lung cancer | Lungenkarzinom |
| Colorectal cancer | Dickdarmkrebs |
| Head and neck cancer | Kopf-Hals-Tumore |
| Stomach cancer | Magenkrebs |
| Liver cancer | Hepatozelluläres Karzinom |
| Pancreatic cancer | Bauchspeicheldrüsenkrebs |
| Renal cancer | Nierenzellkarzinom |
| Urothelial cancer | Urothelkarzinom |
| Prostate cancer | Prostatakarzinom |
| Testis cancer | Hodenkrebs |
| Breast cancer | Brustkrebs |
| Cervical cancer | Zervixkarzinom |
| Endometrial cancer | Endometriumkarzinom |
| Ovarian cancer | Ovariakarzinom |
| Melanoma | Melanom |

STabelle 3. Unterschiedliche Krebsarten, die in Kmplot gelistet sind und deren biologisch deutsche Bezeichnung.

| KmPlot Bezeichnung | Krebsart | Anzahl |
|------------------------------------|---|---------------|
| Bladder Carcinoma | Harnblasenkarzinom | 405 |
| Breast cancer | Brustkrebs | 1090 |
| Cervical squamous cell carcinoma | Plattenepithelkarzinom der Zervix | 304 |
| Esophageal Adenocarcinoma | Adenokarzinom des Ösophagus | 80 |
| Esophageal Squamous Cell Carcinoma | Plattenepithelkarzinom des Ösophagus | 81 |
| Head-neck squamous cell carcinoma | Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereiches | 500 |
| Kidney renal clear cell carcinoma | Klarzelliges Nierenzellkarzinom | 530 |

| | | |
|---------------------------------------|-------------------------------------|-----|
| Kidney renal papillary cell carcinoma | Papilläres Nierenzellkarzinom | 288 |
| Liver hepatocellular carcinoma | Hepatozelluläres Karzinom | 371 |
| Lung adenocarcinoma | Adenokarzinom der Lunge | 513 |
| Lung squamous cell carcinoma | Plattenepithelkarzinom der Lunge | 501 |
| Ovarian cancer | Ovarialkarzinom | 374 |
| Pancreatic ductal adenocarcinoma | Duktales Adenokarzinom des Pankreas | 177 |
| Pheochromocytoma and Paraganglioma | Pheochromozytom und Paragangliom | 178 |
| Rectum adenocarcinoma | Adenokarzinom des Rektums | 165 |
| Sarcoma | Sarkom | 259 |
| Stomach adenocarcinoma | Adenokarzinom des Magens | 375 |
| Testicular Germ Cell Tumor | Keimzelltumor des Hodens | 134 |
| Thymoma | Thymom | 119 |
| Thyroid carcinoma | Schilddrüsenkarzinom | 502 |
| Uterine corpus endometrial carcinoma | | 543 |