

# **Genexpressionsprofil einer vierfach transient genmodifizierten Nierenkarzinomzelllinie**

---

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie

vorgelegt von

**Kerstin Heinrich**

aus Staßfurt

2014

Gutachter: Herr Prof. Dr. Burghardt Wittig

Gutachterin: PD Dr. Christiane Kleuss

Disputation am 04. Februar 2015

*Für Armin und unsere gemeinsame Tochter Charlotte Luise*

*„In der Wissenschaft gleichen wir alle nur den Kindern, die am Rande des Wissens hier und da einen Kiesel aufheben, während sich der weite Ozean des Unbekannten vor unseren Augen erstreckt“*

*Isaac Newton (1643 – 1727)*

---

## Zusammenfassung

Nierenzellkarzinome gehören zu den am häufigsten auftretenden urologischen Tumorarten. Mit konventionellen Behandlungsmethoden (Bestrahlung, Chemotherapie) werden in der Regel nur unzureichende Behandlungserfolge erzielt. Seit wenigen Jahren kommen nun neue Wirkstoffe zum Einsatz. Diese Thyrosin-Kinase- und Angiogenese-Inhibitoren interagieren mit spezifischen Molekülen die mit dem Wachstum und der Progression des Tumors assoziiert sind und blockieren so dessen Wachstum und Ausbreitung. Dennoch sind vollständige, dauerhafte Remissionen eher selten zu beobachten. Dies macht es notwendig alternative Behandlungsstrategien zu erforschen.

Die Firma Mologen AG arbeitet seit einigen Jahren an der Entwicklung eines zellbasierter Wirkstoffes, der das Prinzip der Tumorstimulation verfolgt. Dabei werden Zellen einer Nierenkarzinomzelllinie (B25-MOL) durch das Einbringen von vier MIDGE®-DNA-Vektoren, die kostimulatorische Moleküle (CD80, CD154) bzw. immunstimulierende Zytokine (IL-7, GM-CSF) kodieren, genetisch modifiziert und als Wirkstoffzellen eingesetzt. Bedingt durch diese genetische Modifikation sowie weiterer Effekte, verursacht durch den Herstellungsprozess (z.B. Bestrahlung), wird der Phänotyp der B25-MOL-Zellen verändert. Unter Verwendung der DNA-Microarray-Technologie (Human GeneChip 1.0 ST, Applied Biosystems) wird in der vorliegenden Arbeit untersucht, wie sich das Genexpressionsprofil der Wirkstoffzellen gegenüber den nativen B25-MOL-Zellen verändert.

Anhand der Ergebnisse der Microarray-Analysen ergibt sich für insgesamt 392 Gene eine differentielle Expression (relative Expressionsänderung > 3). Der Fokus der funktionellen Analysen liegt auf den biologischen Zusammenhängen, die eine Auswirkung auf das angestrebte Wirkprinzip haben könnten. Die vermehrte Produktion von Zytokinen sowie die Expression kostimulatorischer Moleküle durch die Wirkstoffzellen trägt dazu bei, dass sowohl professionelle APC, wie auch Effektorzellen des Immunsystems besser rekrutiert und aktiviert werden können. So zeigen vorläufige Ergebnisse einer laufenden klinischen Studie mit dSLIM® in Kombination mit genetisch modifizierten Tumorzellen, die CD80, CD154, IL-7 und GM-CSF exprimieren, eine vielversprechende Wirksamkeit bei Patienten mit metastasierenden Nierenzellkarzinom (Grünwald et al., 2013). Dies ist in erster Linie auf die Expression dieser vier Moleküle durch die Wirkstoffzellen zurückzuführen. Ebenso trägt vermutlich die sekundär verursachte verstärkte Expression weiterer immunstimulatorischer Moleküle und Zytokine (z.B. CCL5, CXCL10, IL-6) zu diesem Effekt bei. Die verstärkte Expression von Rezeptoren der Tumornekrosefaktoren (Fas, TNFRSF10B) kann zu einer erhöhten Sensitivität gegenüber einer

---

Rezeptor-induzierten Apoptose führen. Eine signifikante Veränderung der Expression von Genen, die an der Antigen-Prozessierung oder -Präsentation beteiligt sind, kann nicht beobachtet werden. Das Expressionsniveau der MHC-Klasse-I-Moleküle in den Wirkstoffzellen bleibt gegenüber den nativen B25-MOL-Zellen unverändert hoch. Die Wirkstoffzellen sind in der Lage Proteinfragmente zelleigener Proteine, unter anderem auch Tumor-assoziierte Antigene (TAA), zu präsentieren und durch die Expression kostimulatorischer Moleküle (z.B. CD80) CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten direkt zu aktivieren. Viele TAA zeigen eine relativ hohe mRNA-Expression in den Wirkstoffzellen. Eine differentielle Genexpression ist dagegen nur bei wenigen zu beobachten (HSPA1A/B, CDKN1A, HIG2, PLIN2, HMMR).

Die Ergebnisse der genomweiten Expressionsanalysen zeigen, dass herstellungsbedingt nur geringfügige Veränderungen des Expressionsprofils zu beobachten sind, die vermutlich keinen negativen Effekt auf das angestrebte Wirkprinzip haben. Die durch das Einbringen der vier MIDGE<sup>®</sup>-DNA-Vektoren verursachten Veränderungen des Expressionsprofils, verstärken voraussichtlich das angestrebte Wirkprinzip, vermindern es jedoch keinesfalls.

---

## Abstract

Renal cell carcinoma (RCC) is one of the most common urological cancer. Conventional treatments (chemotherapy and radiotherapy) result in only limited success. Recently, new agents for targeted cancer therapies were approved. These tyrosine kinases inhibitors and angiogenesis inhibitors block the growth and spread of cancer cells by interfering with specific molecules involved in tumor growth and progression. However, complete and durable remissions are rare. Therefore alternate therapeutic strategies are demanded.

The company Mologen AG has developed a cell-based therapy for tumor vaccination. Thereby cells of a renal cell carcinoma cell line (B25-MOL) are genetically modified by in vitro transfection with four MIDGE® DNA vectors encoding co-stimulatory molecules (CD80, CD154) and cytokines (IL-7, GM-CSF) and serve as active component in the tumor vaccine. As a result of gene modification and further effects, caused by the manufacturing process (e.g. irradiation) the phenotype of B25-MOL cells is changed. Using the DNA-Microarray technology (Human GeneChip 1.0 ST, Applied Biosystems) the overall aim of this thesis was to elucidate the alterations of the gene expression profile of B25-MOL cells and vaccine cells.

The comparison of gene expression profiles of native B25-MOL cells and vaccine cell results in a total of 392 differentially expressed genes (change in intensity of expression > 3). The focus of the research was on the biological context with potential impact on the mode of action of the tumor vaccine. The increased production of cytokines and the expression of co-stimulatory molecules by the vaccine cells may contribute to improved recruitment and activation of APC and immunological effector cells. Corresponding to this, preliminary Data of an on-going clinical study using dSLIM® in combination with modified tumor cells, that express CD80, CD154 and IL-7 and GM-CSF, show promising efficacy in patients with metastatic renal cell carcinoma (Grünwald et al., 2013). This is mainly due to the expression of these four molecules through the vaccine cells. Besides this, increased expression of other immunostimulatory molecules and cytokines (CCL5, CXCL10, IL-6) due to secondary effects probably contributes to this effect. Additionally, the increased expression of certain TNF receptors (Fas, TNFRSF10B), may lead to an increased sensitivity against receptor-mediated apoptosis. No significant change in expression of genes that are involved in processing and presentation of antigens is observed. The expression level of MHC class I molecules on cell surface remains unchanged when comparing native B25-MOL cells with vaccine cells. Expression of co-stimulatory molecules as CD80 enables the vaccine cells to present protein fragments of antigens (including TAA) and, as a consequence, activate effector T-lymphocytes directly. A variety of

---

TAA exhibit a relatively high gene expression level in vaccine cells. In contrast, only a few of these genes show an altered gene expression level (HSPA1A/B, CDKN1A, HIG2, PLIN2, HMMR).

Comparison of B25-Mol cells and vaccine cells by genome-wide expression analysis show mainly stable gene expression profiles. These minor changes in the expression profile induced by the manufacturing process are probably irrelevant for the mode of action. Expression of the four proteins encoded by the MIDGE<sup>®</sup> DNA vectors result in secondary effects that probably enhance the intended mode of action.

---

# Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung .....	I
Abstract .....	III
<b>Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>V</b>
Tabellenverzeichnis.....	IX
Abbildungsverzeichnis.....	XI
Abkürzungsverzeichnis.....	XIV
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1 Das Nierenzellkarzinom.....	1
1.1.1 Charakteristika des Nierenzellkarzinoms .....	1
1.1.2 Immunogenität des Nierenzellkarzinoms .....	3
1.1.3 Therapie des Nierenzellkarzinoms .....	4
1.2 MGN1601 .....	6
1.2.1 MGN1601 Wirkmechanismus .....	7
1.3 DNA-Microarrays als Mittel zur Genexpressionsanalyse .....	12
1.3.1 Human GeneChip® 1.0 ST (Affymetrix Inc.) .....	13
1.3.2 Array-Hybridisierung .....	14
1.3.3 Datenanalyse von Affymetrix GeneChips.....	15
1.3.4 Funktionelle Gen-Annotationsanalyse .....	19
1.4 Zielsetzung der Arbeit .....	23
<b>2 Material .....</b>	<b>25</b>
2.1 Geräte.....	25
2.2 Verbrauchsmaterialien.....	26
2.3 Chemikalien.....	27
2.4 Medien und Zusätze .....	27
2.5 Lösungen, Puffer und Kits .....	28
2.5.1 Zellkultivierung.....	28



---

2.5.2	Zellseparation mit MACS <sup>®</sup> Zell-Separationssystem .....	28
2.5.3	ELISA.....	29
2.5.4	Bead Array.....	29
2.5.5	Molekularbiologische Materialien .....	30
2.6	Zelllinie .....	31
2.7	Software .....	31
2.8	Antikörper .....	31
2.9	Primer und Sonden für Taqman <sup>®</sup> qPCR .....	32
2.10	Taqman <sup>®</sup> Gene Expression Assays .....	33
2.11	Vektoren.....	36
<b>3</b>	<b>Methoden .....</b>	<b>38</b>
3.1	Zellbiologische Methoden.....	38
3.1.1	Kultivierung von B25-MOL-Zellen .....	38
3.1.2	Auftauen von Zellen .....	38
3.1.3	Kryokonservierung von Zellen.....	39
3.1.4	Gentransfer mittels Elektroporation.....	39
3.1.5	Anreichern transfizierter Zellen mittels paramagnetischer Zellseparation .....	39
3.1.6	Bestrahlung der Zellen .....	44
3.1.7	Durchflusszytometrische Analyse von Zelloberflächen-Antigenen.....	44
3.1.8	Nachweis sezernierter Antigene mittels ELISA .....	45
3.1.9	Nachweis sezernierter Antigene mittels Bead Array .....	46
3.2	Molekularbiologische Methoden .....	47
3.2.1	Gesamt-RNA-Extraktion .....	47
3.2.2	RNA Agarose-Gelelektrophorese .....	48
3.2.3	Generierung von cDNA mittels reverser Transkription.....	48
3.2.4	Quantitative Taqman <sup>®</sup> PCR.....	49
3.3	Genexpressionsanalyse mit dem Human GeneChip <sup>®</sup> 1.0 ST .....	53
3.3.1	Bioinformatische Auswertung der Affymetrix GeneChip 1.0 ST .....	53
3.3.2	Bildverarbeitung und Präprozessierung der Affymetrix-Daten.....	54

---

3.3.3	Datenfilterung und Identifizierung differentiell exprimierter Gene .....	55
3.3.4	Zuordnung der Gen-Annotationen.....	57
3.3.5	Funktionelle Gen-Annotationsanalyse .....	57
3.3.6	Heat Map Darstellung .....	59
3.4	Statistische Verfahren zur Ermittlung der Korrelation.....	59
<b>4</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>61</b>
4.1	Optimierung der Gentransfer-Bedingungen .....	61
4.1.1	Transfektionsparameter und Mengen an Vektor-DNA in Einzeltransfektionen .....	62
4.1.2	Vektor-DNA-Mengenverhältnisse im Mix der vierfach Transfektion .....	66
4.2	Generierung der RNA-Proben .....	69
4.3	Quantität und Qualität der RNA-Proben.....	72
4.4	Differentielle Expressionsanalyse unter Verwendung des Affymetrix Human GeneChip <sup>®</sup> ST 1.0 .....	72
4.4.1	Qualitätskontrolle, Präprozessierung und Filterung .....	74
4.5	Analyse der differentiellen Genexpression: Vergleich der nativen B25-MOL-Zellen mit den Wirkstoffzellen .....	77
4.5.1	Identifizierung differentiell exprimierter Gene.....	77
4.5.2	Funktionelle Gen-Annotationsanalyse .....	79
4.6	mRNA-Expressionsnachweis mittels Taqman <sup>®</sup> basierter qPCR.....	103
4.7	Proteinnachweis einiger ausgewählter Gene .....	109
4.7.1	Zelloberflächenproteine.....	109
4.7.2	Sezernierte Proteine .....	114
4.8	Einfluss der einzelnen Herstellungsschritte auf das Expressionsmuster der B25-MOL- Zellen .....	116
4.8.1	Einfluss der Elektroporation.....	118
4.8.2	Einfluss der vier eingebrachten Expressionskassetten .....	119
4.8.3	Einfluss der Bestrahlung.....	121
4.8.4	Einfluss des Einfrier- und Auftauprozesses .....	122
<b>5</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>124</b>
5.1	Experimentelles Design .....	124

---

5.2	Methodische Diskussion.....	126
5.2.1	Quantität und Qualität der verwendeten Proben.....	126
5.2.2	Quantitative Taqman <sup>®</sup> PCR.....	128
5.2.3	Affymetrix GeneChip <sup>®</sup> Human Gene 1.0 ST.....	128
5.2.4	Verifizierung der Microarray-Daten mittels quantitativer Taqman <sup>®</sup> PCR .....	132
5.2.5	Korrelation zwischen RNA- und Proteinexpression.....	137
5.3	Differentielles Genexpressionsprofil der Wirkstoffzellen .....	144
5.3.1	Regulation des Zellzyklus und der Apoptose .....	144
5.3.2	Pro- und anti-inflammatorische Wirkung von Zytokinen und Chemokinen .....	153
5.3.3	Regulation der Aktivierung, Differenzierung und Proliferation von Lymphozyten .....	157
5.3.4	Antigen-Prozessierung und -Präsentation in den Wirkstoffzellen .....	161
5.3.5	Regulation der NK-Zell Immunantwort .....	161
5.3.6	Expression Tumor-assoziiertes Antigene .....	164
5.4	Einfluss der einzelnen Herstellungsschritte auf das Expressionsmuster der Wirkstoffzellen .....	169
5.4.1	Einfluss der Elektroporation auf das Expressionsmuster der Zellen .....	171
5.4.2	Einfluss der vier MIDGE <sup>®</sup> -DNA-Vektoren auf das Expressionsmuster der Zellen .....	172
5.4.3	Einfluss der Bestrahlung und des Einfrierprozesses auf das Expressionsmuster der Zellen .....	173
5.5	„Schleichende“ Veränderungen des Expressionsmusters .....	173
5.6	Schlussfolgerungen .....	175
<b>6</b>	<b>Literatur .....</b>	<b>178</b>
<b>7</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>191</b>
7.1	Tabellen.....	191
	Erklärung .....	207
	Danksagung.....	208

---

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1 Oligonukleotidprimer und Sonden .....	32
Tabelle 2.2 Taqman Gene Expression Assay (Applied Biosystems) .....	33
Tabelle 2.3 MIDGE®-DNA-Vektoren.....	36
Tabelle 3.1 Beispielhafte Darstellung einer TopTable, mit differentiell exprimierten Genen .....	56
Tabelle 4.1 Apoptose-assoziierte funktionelle Gengruppen und Pathways .....	82
Tabelle 4.2 Verstärkt exprimierte Gene, die den überrepräsentierten Apoptose-assoziierten funktionellen Gengruppen angehören.....	83
Tabelle 4.3 Funktionelle Gengruppen und Pathways, die mit Zytokinen und Chemokinen assoziiert sind .....	85
Tabelle 4.4 Verstärkt exprimierte Gene, deren funktionelle Gengruppen, mit Zytokinen und Chemokinen assoziiert sind.....	86
Tabelle 4.5 Funktionelle Gengruppen und Pathways, die eine Assoziation mit der Aktivierung, Differenzierung und Proliferation von Lymphozyten besitzen .....	89
Tabelle 4.6 Verstärkt exprimierte Gene, assoziiert mit der Aktivierung, Differenzierung und Proliferation von Lymphozyten.....	90
Tabelle 4.7 Vermehrt exprimierte Gene des KEGG-Pathway „Natural killer cell mediated cytotoxicity“....	93
Tabelle 4.8 Funktionelle Gengruppen und Pathways, die eine Assoziation mit der Regulation des Zellzyklus besitzen.....	94
Tabelle 4.9 Bedingt durch die Elektroporation überrepräsentierte funktionelle Gengruppen .....	119
Tabelle 4.10 Einfluss der eingebrachten MIDGE®-Vektoren auf Apoptose-assoziierte funktionelle Gengruppen .....	120
Tabelle 4.11 Einfluss der eingebrachten MIDGE®-Vektoren auf Zytokin-assoziierte funktionelle Gengruppen .....	121
Tabelle 4.12 Einfluss der eingebrachten MIDGE®-DNA-Vektoren auf funktionelle Gengruppen die mit der Differenzierung und Aktivierung von Leukozyten assoziiert sind .....	121
Tabelle 4.13 Bedingt durch die Bestrahlung differentiell exprimierte Gene .....	122
Tabelle 5.1 Signalintensitäten der benannten Gene aus Microarray Analysen und Geomean Daten aus der durchflusszytometrischen Analyse nach direkter Antikörperfärbung.....	138
Tabelle 5.2 Signalintensitäten benannter Gene aus Microarray Analyse und ermittelte Proteinmengen im Zellkulturüberstand 24 h nach EPO (Bead Array und ELISA).....	139

---

Tabelle 5.3 Signalintensitäten (MA), Änderung der Genexpression ( <i>fold change</i> ) und Ct-Werte (Taqman®) sowie $\Delta\Delta Ct$ -Werte (Taqman®) der eingebrachten Expressionskassetten .....	141
Tabelle 5.4 Überrepräsentierte funktionelle Gengruppen, die eine Assoziation mit der Apoptose aufweisen .....	145
Tabelle 5.5 Zuordnung der verstärkt exprimierten Gene zur positiven bzw. negativen Regulation der Apoptose .....	146
Tabelle 5.6 MA-Signalintensitäten und Änderungen der Expression von Genen, deren Proteine Kinetochore- und Centrosomen-assoziiert sind .....	151
Tabelle 6.1 Überrepräsentierte funktionelle Gengruppen und Pathways der verstärkt exprimierten Gene (native B25-MOL-Zellen vs. Wirkstoffzellen) .....	191
Tabelle 6.2 Überrepräsentierte funktionelle Gengruppen und Pathways, der vermindert exprimierten Gene (native B25-MOL-Zellen vs. Wirkstoffzellen) .....	194
Tabelle 6.3 Vermindert exprimierte Gene, assoziiert mit dem Zellzyklus und dessen Regulation .....	196
Tabelle 6.4 Tumorassoziierte Antigene mit hoher Expressionsstärke ( $S_{int} > 1024$ ) in Wirkstoffzellen ....	199
Tabelle 6.5 Ergebnisse der Taqman® basierten qPCR-Analysen .....	201
Tabelle 6.6 Liste regulierter Gene - Elektroporation w/o DNA vs. native B25-MOL-Zellen .....	204
Tabelle 6.7 Überrepräsentierte funktionelle Gengruppen und Pathways der verstärkt exprimierten Gene, aus der Gegenüberstellung der Genexpressionslevel elektroporierten (EPO) und vierfach transfizierten (4xTx) B25-MOL-Zellen .....	205

---

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1 Immun-Evasionsmechanismen des Nierenzellkarzinoms.....	3
Abbildung 1.2 Generierung der MGN1601 Wirkstoffzellen.....	7
Abbildung 1.3 Wirkmechanismus Wirkstoffzellen - direkte Aktivierung von CD8 <sup>+</sup> T-Lymphozyten (Mologen, modifiziert) .....	8
Abbildung 1.4 Wirkmechanismus der Wirkstoffzellen - indirekte Aktivierung von T-Lymphozyten über Antigen-präsentierende Zellen (Mologen, modifiziert) .....	9
Abbildung 1.5 Wirkmechanismus der Wirkstoffzellen – Aktivierung von APC.....	11
Abbildung 1.6 Affymetrix GeneChip ( <a href="http://www.affymetrix.com">www.affymetrix.com</a> ) .....	14
Abbildung 1.7 Schematische Darstellung des experimentellen Ablaufes eines Human GeneChip Microarray Experiments.....	15
Abbildung 2.1 Schematische Darstellung eines MIDGE <sup>®</sup> -Vektors .....	37
Abbildung 3.1 Prinzip der paramagnetischen, positiven Zellseparation (MACS <sup>®</sup> ) .....	40
Abbildung 3.2 Anti-FITC Multi Sort Kit .....	42
Abbildung 4.1 Ablauf des Herstellungsprozesses zur Generierung der Wirkstoffzellen .....	61
Abbildung 4.2 Konzentrations-Wirkungsbeziehung der CD80-Expression, 4 h nach Elektroporation .....	63
Abbildung 4.3 Konzentration-Wirkungsbeziehung der CD154-Expression, 4 h nach Elektroporation .....	64
Abbildung 4.4 Konzentration-Wirkungsbeziehung/ Kinetik der IL-7-Expression .....	65
Abbildung 4.5 Konzentration-Wirkungsbeziehung/ Kinetik der GM-CSF-Expression .....	66
Abbildung 4.6 Zelloberflächenexpression CD80 und CD154, 4 h nach Elektroporation.....	67
Abbildung 4.7 IL-7 und GM-CSF im Zellkulturüberstand, 4 h nach Elektroporation.....	68
Abbildung 4.8 Herstellungsprozess und Probenentnahme für Microarray-Experimente .....	69
Abbildung 4.9 Microbead-basierte Sortierung transfizierter B25-MOL-Zellen auf die Expression von CD80 und CD154 unter Verwendung des „Anti-FITC MultiSort Kit“ .....	70
Abbildung 4.10 Versuchsaufbau Microarray .....	73
Abbildung 4.11 Boxplot der normalisierten log <sub>2</sub> basierten Signalintensitäten.....	74
Abbildung 4.12 Hierarchische Clusteranalyse.....	75
Abbildung 4.13 Hauptkomponentenanalyse .....	76

---

Abbildung 4.14 Heat Map. Genexpressionsprofil der 392 differentiell exprimierten Gene (403 Sonden-Sets) .....	78
Abbildung 4.15 Heat Map Darstellung der mRNA-Expressionslevel der MHC-Gene im Verlauf des Herstellungsprozesses.....	92
Abbildung 4.16 Heat Map. Genexpressionslevel von TAA in B25-MOL und Wirkstoffzellen .....	99
Abbildung 4.17 Validierung der ermittelten Steigerung der Expression mittels Taqman® qPCR.....	105
Abbildung 4.18 Validierung vermindert exprimierter Gene mittels Taqman® qPCR.....	106
Abbildung 4.19 Validierung stabil exprimierter Gene (Microarray-Analyse) mittels Taqman® qPCR .....	107
Abbildung 4.20 Vergleich der Microarray und Taqman qPCR basierten ermittelten Veränderungen der Expressionsstärke: Expressionsanalysen ergeben für diese Gene widersprüchliche Ergebnisse ...	108
Abbildung 4.21 Oberflächenexpression CD80 und CD154 auf lebenden nativen B25-MOL und Wirkstoffzellen .....	110
Abbildung 4.22 Zelloberflächenexpression klassische HLA-Klasse-I-Moleküle auf lebenden nativen B25-MOL und Wirkstoffzellen. ....	111
Abbildung 4.23 Oberflächenexpression CD40, ICOSLG und ICAM1 auf lebenden nativen B25-MOL und Wirkstoffzellen. ....	112
Abbildung 4.24 Oberflächenexpression c-Met (MET) und EGFR auf lebenden nativen B25-MOL und Wirkstoffzellen. ....	113
Abbildung 4.25 Zelloberflächenexpression FAS auf lebenden nativen B25-MOL und Wirkstoffzellen. ...	113
Abbildung 4.26 Zytokin-Mengen im Überstand nativer B25-MOL-Zellen und Wirkstoffzellen .....	114
Abbildung 4.27 Zytokinmenge (CCL2, IL-8) im Zellkulturüberstand nach 24stündiger Inkubation .....	115
Abbildung 4.28 Zytokinmenge (IL-6, CXCL10, CCL5, CCL20) im Zellkulturüberstand nach 24stündiger Inkubation .....	116
Abbildung 4.29 Differentiell exprimierte Sonden-Sets .....	117
Abbildung 4.30 Differentiell exprimierte Gene.....	118
Abbildung 5.1 Mögliche Transkripte der Gene ERBB2 (oben) und NRP2 (unten) .....	133
Abbildung 5.2 Korrelation der detektierten mRNA Expressionsstärken.....	134
Abbildung 5.3 Korrelation der relativen Änderung der Expression .....	135
Abbildung 5.4 Ermittelte relative Expressionsänderungen von 94 Genen, ermittelt unter Anwendung von Taqman qPCR bzw. Microarray-Analyse .....	136

---

Abbildung 5.5 Organisation des CD80-Gens im humanen Genom und der CD80-kodierenden Expressionskassette im MOK-hCD80-M.....	142
Abbildung 5.6 Organisation der Gene CD154, IL-7 und GM-CSF im Genom und den kodierenden Expressionskassetten .....	143
Abbildung 5.7 Aktivierung von p53 und damit assoziierter Genregulation .....	152
Abbildung 5.8 Überrepräsentierter KEEG-Pathway " <i>natural killer cell mediated cytotoxicity</i> " .....	162
Abbildung 5.9 Übersicht differentiell exprimierter Gene .....	169
Abbildung 5.10 Mengendiagramm differentiell exprimierter Gene .....	170
Abbildung 5.11 Heat Map. Genexpressionsprofil exemplarisch ausgewählter Gene, deren Expressionstärke durch die Elektroporation verändert wird, die jedoch beim Vergleich des Expressionsniveau der nativen gegen die Wirkstoffzellen keine Veränderung zeigen .....	171
Abbildung 5.12 Heat Map der Genexpressionslevel von Genen, deren Expressionsniveau sich im Verlauf der Herstellung nur langsam verändern (20 exemplarisch ausgewählte Gene) .....	174



---

## Abkürzungsverzeichnis

Ak	Antikörper
APC	Professionelle Antigen-präsentierende Zelle
Av	<i>average</i> (Mittelwert)
BSA	Bovines Serum Albumin
CD	Cluster of Differentiation
CMV	Cytomegalievirus
Ct	cycle threshold
CTL	Zytotoxische T-Lymphozyten
DAVID	Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery
DC	Dendritische Zellen
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DPBS	Dulbelco's Phosphat-gepufferte Saline
DTT	Dithiothreitol
dUTP	Desoxyuridintriphosphat
EASE	modified Fisher Exact P-Value
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked immunosorbant assay
FACS	fluorescence activated cell sorting
FC	fold change
FCS	Fetales Kälber Serum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GCOS	Gene Chip Operating Software
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor
GO	Gen-Ontologie
Gy	Gray
HRP	Merrettich-Peroxidase
IgG	Immunglobulin vom Typ G
IL	Interleukin
IP-10	Interferon gamma-induced protein 10
IQR	Inter-Quartilsabstand
KEEG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
Limma	linear models for microarray data
MA	Microarray
MCP-1	monocyte chemotactic protein 1
MGBNFQ	Minor Groove Binder non-fluorescent Quencher
MIDGE	minimalistic, immunologically defined gene expression
MIP-3 $\alpha$	macrophage inflammatory protein 3 alpha
MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure

---

mRNA	messenger RNA
M-Wert	Minus (Differenz)
NaCl	Natriumchlorid
NZK	Nierenzellkarzinom
PCA	principal component cluster (Hauptkomponentenanalyse)
PCR	Polymerasekettenreaktion
PE	Phycoerythrin
Pen	Penicillin
p-Wert	Signifikanzwert p
qPCR	quantitative PCR
RANTES	regulated upon activation, normal T-cell expressed, and secreted
RCC	renal cell carcinoma
RMA	robust multi array average
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
SA-PE	Streptavidin-Phycoerythrin
SD bzw. s	Standardabweichung
Strep	Streptomycin
TAA	Tumor-assoziierte Antigene
Taq	Taqman®
TCR	T-Zell-Rezeptor
TNF	Tumornekrosefaktor
TNM	TNM-Classification of Malignant Tumors (T – tumor, N – nodes, M – metastasis)
TWEEN	Polyoxyethylen-(20)-sorbitan-monolaurat
t-Wert	Testprüfgröße des t-Test
UNG	Uracil DNA-Glycosilase

# 1 Einleitung

## 1.1 Das Nierenzellkarzinom

In Europa rangieren maligne Nierenerkrankungen unter den 10 häufigsten Tumortypen. Nierenzellkarzinome (*renal cell carcinoma*, RCC) machen etwa 90 % dieser Neoplasien aus, dabei ist eine stetig steigende Inzidenz dieser Tumorerkrankung zu beobachten. Das RCC weist unter den urogenitalen Neoplasien die höchste Mortalitätsrate auf. Die Prognose für Patienten in einem fortgeschrittenen Krankheitsstadium ist mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von unter 10 % schlecht (Ather et al., 2010; Corgna et al., 2007). RCC sind sehr heterogen und entstehen aus unterschiedlichen Zelltypen. Im frühen Stadium zeigen RCC nur selten spezifische Symptome, wie Schmerzen oder Hämaturie, weshalb sie häufig in diesem gut therapiebaren Stadium unerkannt bleiben und 20 – 30 % der Patienten die Diagnose erst nach Ausbilden erster Metastasen gestellt bekommen. Typischerweise sind Metastasen eines RCC in der Lunge, den Knochen, der Leber, im weichen Gewebe, der Haut und im zentralen Nervensystem lokalisiert (Corgna et al., 2007; Ljungberg et al., 2011). Pathophysiologisch werden RCC nach dem TNM-System der „Union Internationale contre le Cancer“ (UICC, *International union against cancer*) bezüglich ihrer Ausbreitung (*staging*) und dem Grad ihrer Entdifferenzierung (*grading*) eingeteilt. Da Nierenzellkarzinome in der Regel resistent gegenüber einer zytostatischen Chemo-, Strahlen- und Hormonbehandlung sind, wird seit Jahren intensiv an alternativen Therapiemethoden geforscht. Seit wenigen Jahren sind nun neue Substanzen im Einsatz (Tyrosin-Kinase-, Multikinase- und Angiogenese-Inhibitoren), die gegenüber den traditionellen Behandlungsmethoden zu deutlich besseren Ergebnissen (Calvo et al., 2013; Negrier et al., 2012; Patel et al., 2012).

### 1.1.1 Charakteristika des Nierenzellkarzinoms

Humane RCC entstehen aus einer Reihe verschiedener spezialisierter Zellen, die entlang des Nephrons lokalisiert sind. Eine Unterscheidung der RCC erfolgt anhand ihrer Morphologie in kompakte, tubulopapilläre und zystische Tumore, sowie anhand zytologischer und molekulargenetischer Parameter in klarzellige, papillare, chromophobe und onkozytische Tumore. Die klarzelligen RCC treten mit einer Inzidenz von 75 – 80 % auf, während die papillare mit 10 – 15 % und die chromophoben mit etwa 5 % deutlich seltener auftreten.

Andere maligne Nierentumore, wie das Ductus-Bellini-Karzinom, zeigen eine sehr geringe Inzidenz von unter 1 % (Motzer et al., 1996).

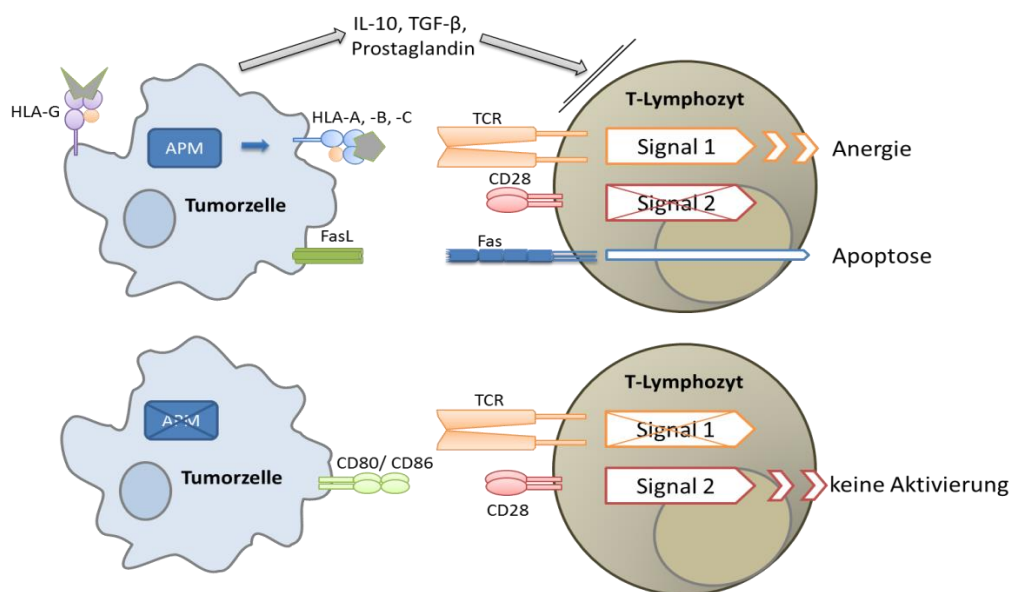
Das klarzellige RCC kann spontan auftreten (> 96 %) oder genetisch vererbt (< 4 %) werden und ist in den meisten Fällen mit der Inaktivierung des VHL-Gens (von Hippel-Landau) assoziiert. Die genetische Alteration, die in spontanen und vererbten klarzelligen RCC beobachtet wird, sind Mutationen des VHL-Tumorsuppressorgens, die eine Inaktivierung des Gens zur Folge haben (Chen et al., 2006; Finke et al., 1998). Dabei werden Hypermethylierungen des Promotors, Rearrangierungen des Gens und Deletionen bzw. Translokationen von Chromosomenabschnitte beobachtet. Das VHL-Protein stellt eine Komponente eines Ubiquitin-Ligase-Komplexes, welcher in die Ubiquitylierung und Degradation zahlreicher zellulärer Proteine involviert ist, einschließlich des Hypoxie-induzierbaren Faktors (*hypoxia-inducible factor*, HIF). Dieser Transkriptionsfaktor HIF spielt eine essentielle Rolle in der Regulation der Genexpression als Reaktion auf eine Mangelversorgung mit Sauerstoff. Eine Inaktivierung des VHL-Gens unterbindet die Degradation von HIF, was zu dessen Akkumulation führt. Dies mündet in einer gesteigerten Transkription verschiedener Gene, die mit Angiogenese, metabolischen Veränderungen, sowie autokriner und parakriner Wachstumsstimulation in Verbindung stehen, wie VEGFR, TGF $\alpha$ , PDGF, EPO und GLUT-1 (Corgna et al., 2007; Finke et al., 1998).

Im erblich bedingten papillären RCC (*hereditary papillary renal carcinoma*, HPRC) sind Alternationen des MET-Gens beschrieben, z. B. eine Trisomie des Chromosom 7, auf dem das MET-Gen lokalisiert ist. Eine Duplikation des MET-Allels, sowie eine *missense* Mutation im MET-Gen, die zu einer Überexpression des resultierenden c-Met Proteins führt (Chen et al., 2006). Da sich das Gen des Liganden von c-Met (*hepatocyte growth factor*, HGF) auf demselben Chromosomenabschnitt befindet, führt eine Trisomie des Chromosom 7 bzw. eine Duplikation des betreffenden Allels zu einer autokrinen Stimulation und damit zu einem Wachstumsvorteil dieser Tumorzellen (Cairns, 2010). In spontan etablierten papillären RCC wird eine Mutation des MET-Gens dagegen nur selten beobachtet. Hier tritt häufig eine Mutation der Furmarat Hydratase (*furmarate hydratase*, FH) auf, ein essentielles Enzym des Krebs-Zyklus. Der Aktivitätsverlust der Furmarat Hydratase führt zur Akkumulation von Furmarat, welche kompetitiv die HIF-Propylhydroxylase (*HIF propyl hydroxylase*, HPH) inhibiert. Dadurch kommt es auch in diesem Fall zur Akkumulation von HIF, mit den bereits beschriebenen Folgen (Finke et al., 1998). Bedingt durch die Amplifikation von Chromosom 8q kann in papillären RCC auch eine Überexpression des MYC-Onkogens beobachtet werden. Generell zeichnet sich das papilläre RCC durch die Modifikation der Anzahl verschiedener Chromosomen bzw. Chromosomenabschnitte aus. (Chen et al., 2006).

Für die Ausbildung eines chromophoben RCC sind zu über 75 % Deletionen von Chromosomen bzw. Chromosomenabschnitte verantwortlich. Mutationen des VHL- oder MET-Gens sind bisher nicht beschrieben. Allerdings kann in ca. 30 % eine Mutation im Tumorsuppressorgen p53 nachgewiesen werden. Andere Studien zeigen eine Überexpression des KIT-Protoonkogens, welche nicht durch eine Punktmutation verursacht wird (Cairns, 2010).

### 1.1.2 Immunogenität des Nierenzellkarzinoms

Eine zelluläre Immunantwort gegen Nierenkarzinomzellen ist in den meisten Fällen eher schwach und ineffektiv. Obwohl in vitro CD8<sup>+</sup> zytotoxische T-Lymphozyten generiert werden können, die autologe humane Tumorzellen erkennen und lysieren, werden nur in wenigen Patienten tumorspezifische zytotoxische T-Lymphozyten nachgewiesen (Banat et al., 2001; Brouwenstijn et al., 1996). Häufig ist eine Infiltration des Tumorgewebes durch mononukleare Zellen zu beobachten, unter denen auch CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten zu finden sind (Finke et al., 1994; Shimabukuro et al., 2008). Verschiedene Immun-Evasionsmechanismen der Nierenkarzinomzellen führen allerdings zu einer Inhibition der zytotoxischen Aktivität und einer verminderten Proliferationsfähigkeit dieser Tumor-infiltrierenden Lymphozyten (Abbildung 1.1).



**Abbildung 1.1 Immun-Evasionsmechanismen des Nierenzellkarzinoms**

Immunevasionsmechanismen können eine effektive Aktivierung des Immunsystems inhibieren; z.B. die konstitutive Expression von nicht klassischen MHC-Molekülen (z.B. HLA-G), die Expression von FasL bzw. die verminderte Expression von Fas, eine fehlende Expression kostimulatorischer Moleküle (CD80, CD86), die Sekretion immunsuppressiver Faktoren (IL-10, TGF-β, Prostaglandin), eine fehlende bzw. verminderte Expression von MHC-Molekülen sowie eine defiziente Antigen-Prozessierung und -Präsentation. (Seliger et al., 2001).

APM – Antigenprozessierungsapparat, TCR – T-Zellrezeptor

Tumorzellen exprimieren meist keine kostimulatorischen Moleküle, wie CD80 oder CD86. Eine direkte Aktivierung der T-Lymphozyten setzt jedoch ein „zweites“ Aktivierungssignal über die Interaktion von CD28 auf den T-Lymphozyten mit einem kostimulatorischen Molekül voraus. Anderen Untersuchungen zufolge sezernieren Nierenkarzinomzellen immunsupprimierende Zytokine, wie IL-10 oder TGF- $\beta$ , die potente Inhibitoren für die Proliferation oder die Aktivierung und Zytotoxizität von Lymphozyten darstellen (Banat et al., 2001). Ebenso ist bekannt, dass Tumorzellen über die Interaktion von CD95 (Fas) mit FasL in der Lage sind, in aktivierten T-Lymphozyten Apoptose zu induzieren (Igney et al., 2002). Molekularbiologische und histochemische Analysen haben gezeigt, dass in Nierenkarzinomzellen Veränderungen der Expressionsstärke von Genen des Antigen-Prozessierungsapparates auftreten. Darunter sind Gene, die für Proteasom-Untereinheiten, des TAP-Transportersystems oder die Chaperone Tapasin und Calretikulin kodieren. Eine aberante Expression dieser Gene beeinflusst letztlich auch die Zelloberflächenexpression der MHC-Klasse-I-Moleküle (Atkins et al., 2004; Seliger, 2005; Seliger et al., 2000). Außerdem ist auf zahlreichen Nierenzellkarzinomen die Expression des nicht-klassischen MHC-Klasse-I-Moleküls G nachgewiesen, welches in der Lage ist, Anergie in NK-Zellen (natürliche Killerzellen) und T-Lymphozyten zu induzieren (Bukur et al., 2003; Ibrahim et al., 2001).

### **1.1.3 Therapie des Nierenzellkarzinoms**

Eine effektive Behandlung von Nierenzellkarzinomen gestaltet sich schwierig, da der Tumor in vielen Fällen lange unentdeckt bleibt und bei der Diagnose häufig bereits metastasiert ist. Bei kleinen (< 4 cm Durchmesser) lokal begrenzten Tumoren ohne Metastasen ist die vollständige bzw. teilweise chirurgische Entfernung der betroffenen Niere (Nephrektomie) bis heute die Standardtherapie. Sind bereits Metastasen vorhanden, wird eine Nephrektomie jedoch nur noch palliativ durchgeführt, um vorhandene Symptome der Erkrankung zu lindern (Bex et al., 2012). Gegenüber einer Radio- oder Chemotherapie haben sich metastasierte Nierenzellkarzinome als weitgehend resistent erwiesen (Ather et al., 2010).

Die Beobachtung, dass Nierenzellkarzinome zwar resistent gegenüber Zytostatika, aber dennoch immunogen sind, führte zur Entwicklung zahlreicher Immuntherapeutika (Kim et al., 1996). Bis vor kurzem stellte die Behandlung mit den Zytokinen IL-2 und/oder IFN- $\alpha$  die Standardtherapie bei metastasierten Nierenzellkarzinom dar. Diese sind jedoch in den meisten Fällen nur mit einer moderaten Zunahme des Gesamtüberlebens des Patienten assoziiert. Seit wenigen Jahren sind vor allem zur Behandlung des metastasierenden Nierenzellkarzinoms neue Substanzen als Standardtherapie im Einsatz. Diese Tyrosin-Kinase-, Multikinase-, und Angiogenese-Inhibitoren, die in der Regel in Kombination mit einer Zytokin-Therapie

eingesetzt werden, führen gegenüber den traditionellen Behandlungsmethoden zu deutlich besseren Ergebnissen (Calvo et al., 2013; Negrier et al., 2012; Patel et al., 2012).

Als vielversprechende Alternativen bieten sich Therapieverfahren an, die das Prinzip der Tumorzellvakzinierung verfolgen. Die ersten Vakzine stellten autologe oder allogene Tumorzellbasierte Vakzine dar, in denen aufbereitete Tumorzellen einen Pool verschiedener Tumorassoziierter Antigene (TAA) zur Immunisierung zur Verfügung stellen sollten. Dabei werden dem Patienten autologe oder allogene, aufbereitete Tumor-assoziierte Antigene (Zelllysate oder Expressionsvektoren) appliziert, die eine Immunantwort gegen die im Körper verbliebenen Tumorzellen induzieren sollen. Die Applikation erfolgt in jedem Fall in Kombination mit Immunmodulatoren, durch die eine Aktivierung des Immunsystems erreicht werden soll. Peptid-basierte Vakzine stellen eine weitere mögliche Vakzinierungsstrategie zur Behandlung von Nierenzellkarzinomen dar. Bisher wurden jedoch nur wenige Studien publiziert, in denen eine solche Behandlung bei Nierenzellkarzinomen angewendet wurde. Eine mögliche Ursache dafür ist vermutlich die Tatsache, dass viele TAA in Nierenzellkarzinomen noch nicht lange bekannt sind. Die Vorteile Peptid-basierter Tumorzellvakzine sind vor allem der relativ geringe Aufwand der Produktion, da hier kein Tumormaterial benötigt wird. Ein Nachteil dieser Strategie besteht jedoch darin, dass in der Hauptsache nur Patienten mit einem bestimmten HLA-Allel behandelt werden können. Da die HLA-Allele für MHC-Moleküle mit unterschiedlichen Bindungseigenschaften kodieren, kann nicht jedes zur Verfügung stehende Peptid binden und präsentiert werden. Aufgrund der enormen Vielfalt der MHC-Moleküle werden hauptsächlich Peptide für solche HLA-Allele eingesetzt, die ein großer Teil der Bevölkerung exprimiert (z.B. HLA-A2 bei etwa 50 % der kaukasischen Europäer).

Unter den zellbasierten Tumorzellvakzinen unterscheidet man drei Formen, i) autologe Tumorzellvakzine, ii) Gen-modifizierte Tumorzellvakzine und iii) auf dendritischen Zellen (DC)-basierende Vakzine. Das Prinzip der Vakzinierung mit autologen Tumorzellen basiert auf der Tatsache, dass die Tumorzellen TAA exprimieren und theoretisch in der Lage sind, eine zelluläre Immunantwort zu induzieren. Um eine stärkere Immunantwort hervorzurufen, die für einen effektiven therapeutischen Effekt notwendig ist, werden sie häufig mit Immunmodulatoren kombiniert.

Um die Immunantwort zu steigern, die durch Tumorzell-basierte Vakzine induziert wird, werden autologe bzw. allogene Tumorzellen gentechnisch modifiziert. Dabei werden Expressionskassetten, die kostimulatorische Moleküle oder immunstimulatorische Zytokine kodieren, in die Tumorzellen eingebracht. Mit Hilfe der kostimulatorischen Moleküle und der lokalen Sekretion von immunstimulatorischer Zytokinen sollen T-Lymphozyten und NK-Zellen

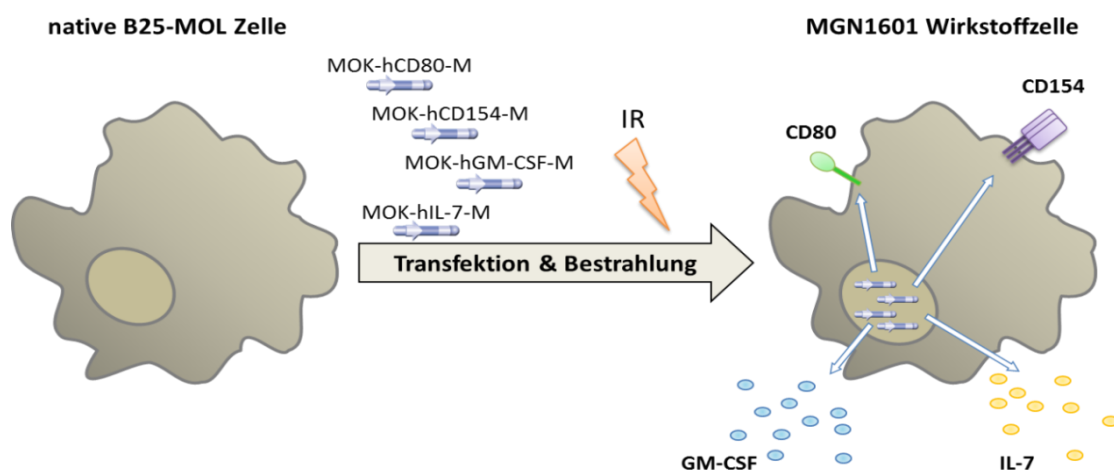
aktiviert werden, die dann in der Lage sind, noch im Körper verbliebene Tumorzellen zu erkennen und zu eliminieren. In autologen Ansätzen ist jedoch die Anzahl der zur Verfügung stehenden Tumorzellen stark limitiert, während allogene Therapieansätze, basierend auf Tumorzelllinien, deutlich bessere Voraussetzungen mitbringen, um die entsprechenden Vakzine in größeren Mengen produzieren zu können.

Bei der Immunisierung mit DC-basierten Vakzinen werden Patienten-eigene Dendritische Zellen mit TAA beladen und anschließend wieder in den Patienten appliziert. Die DC gehören zu den Antigen-präsentierenden Zellen. Sie sind in der Lage, die TAA effektiv zu prozessieren und geeignete Epitope über MHC-Klasse-I- bzw. MHC-Klasse-II-Moleküle an  $CD4^+$  und  $CD8^+$  T-Lymphozyten zu präsentieren. Dies führt zur Aktivierung und Proliferation von zytotoxischen T-Lymphozyten, die in der Lage sind, Tumorzellen zu eliminieren, die ebensolche Antigen-Peptide über ihre MHC-Moleküle präsentieren. Nachteil dieses Therapieverfahrens ist nicht nur die immunologische Komplexität der Biologie der DC und der damit verbundene hohe Aufwand für eine GMP-konforme Herstellung solcher Vakzine, sondern auch das bis dato geringe Verständnis der biologischen Zusammenhänge, die eine wie auch immer begründete Manipulation der Zellen eher ungerichtet erscheinen lässt (Van Poppel et al., 2009).

## 1.2 MGN1601

Die Entwicklung autologer Tumorzell-basierter Vakzine, bei dem die Tumorzellen gentechnisch modifiziert werden, ist ein Ansatz, der bereits vor über 10 Jahren studiert wurde (Antonia et al., 2000). Der hohe technische Aufwand, sowie die hohen Kosten für die Präparation autologer Tumorzellen führten schnell zu den Bemühungen, allogene Tumorzell-Vakzine zu implementieren (Kronfeld et al., 2005). Die Wirkstoffzellen des MGN1601 Wirkstoffes gehören zu dieser Gruppe der allogenen genmodifizierten Tumorzell-basierter Vakzine. Hier handelt es sich um einen Ansatz, bei dem allogene, transfizierte und bestrahlte Nierenkarzinomzellen (etablierte Zelllinie, B25-MOL), die CD80, CD154, IL-7 und GM-CSF exprimieren, als Tumorzell-Vakzine verwendet werden (Abbildung 1.2).





**Abbildung 1.2 Generierung der MGN1601 Wirkstoffzellen**

Durch das Einschleusen von vier MIDGE®-DNA-Vektoren in native B25-MOL-Zellen und anschließende Bestrahlung (IR) werden die Zellen des Wirkstoffes MGN1601 generiert. Sie überexprimieren CD80, CD154, IL-7 und GM-CSF.

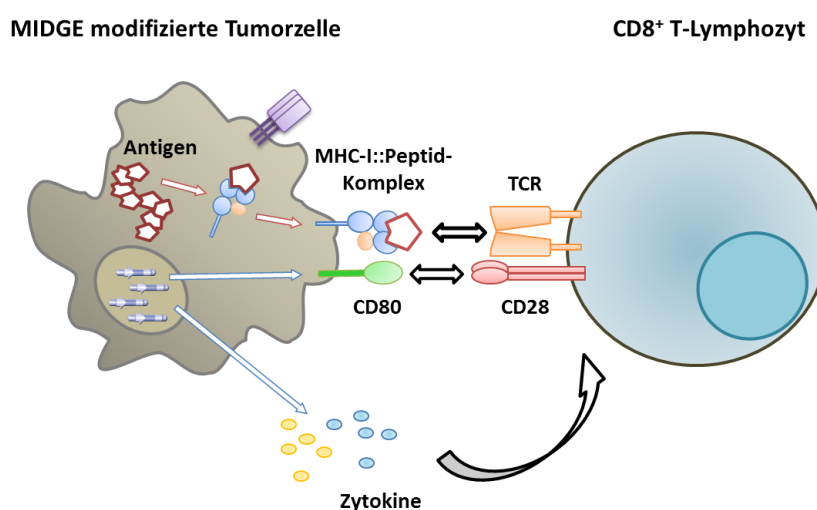
Für die Herstellung dieser Wirkstoffzellen wird eine humane Nierenkarzinomzelllinie verwendet, die aus Patientenmaterial etabliert wurde. In diese Nierenkarzinomzelllinie werden im Rahmen des Herstellungsprozesses vier verschiedene MIDGE®-DNA-Vektoren (*minimalistic immunologically defined gene expression*) zur transienten Expression von CD80, CD154, IL-7 oder GM-CSF eingebracht (Schakowski et al., 2001). Durch eine anschließende Bestrahlung verlieren die Zellen ihre Proliferationsfähigkeit. Diese Wirkstoffzellen, in Kombination mit dem DNA-basierten Immunmodulator dSLIM® (*double stem-loop immune modulator*; (Kochling et al., 2008; Schmidt et al., 2006) bilden zusammen den Wirkstoff MGN1601.

### 1.2.1 MGN1601 Wirkmechanismus

Am Ort der Vakzinierung und in unmittelbarer Umgebung entsteht ein Milieu mit hoher immunmodulierender Aktivität. Aufgrund unmethylierter Cytosin-Guanin-Motive (CpG) ähnelt dSLIM® bakterieller DNA und fungiert als „Gefahrensignal“. Das dSLIM® stimuliert vor allem eine T<sub>H</sub>1-Immunantwort, aber auch die Aktivierung von B-Lymphozyten, NK-Zellen, sowie Dendritische Zellen (Hagner et al., 2004).

Die zweite Komponente des Wirkstoffes sind die genmodifizierten, bestrahlten, allogenen Tumorzellen. Bedingt durch ihren allogenen Charakter werden die polymorphen MHC-Moleküle der Wirkstoffzellen vom adaptiven Immunsystem des Patienten als körperfremd erkannt und führen zu einer Abstoßungsreaktion. Bedingt durch die Syntheseleistung der Wirkstoffzellen entsteht am Ort der Vakzinierung eine hohe Konzentration der Zytokine IL-7 und GM-CSF, sowie eine hohe Dichte der kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD154. Die Präsentation allogener MHC-Molekül::Peptid-Komplexe bewirkt eine direkte Aktivierung von

CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten, vermittelt über die Interaktion der MHC-Klasse-I-Molekül::Peptid-Komplexe mit TCR (T-Zellrezeptor). Das durch diese Interaktion ausgelöste Signal in den Lymphozyten wird durch die simultane Bindung von CD80 auf den Wirkstoffzellen und CD28 auf den CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten verstärkt. Durch die Aktivierung des TCR-Komplexes werden intrazelluläre Signalkaskaden ausgelöst, wodurch die Differenzierung der naiven CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten in zytotoxische CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten induziert wird (Abbildung 1.3). Diese zytotoxischen T-Lymphozyten sind in der Lage analoge allogene MHC-Klasse-I::Peptid-Komplexe auf den Wirkstoffzellen zu erkennen und diese Zellen zu lysieren.

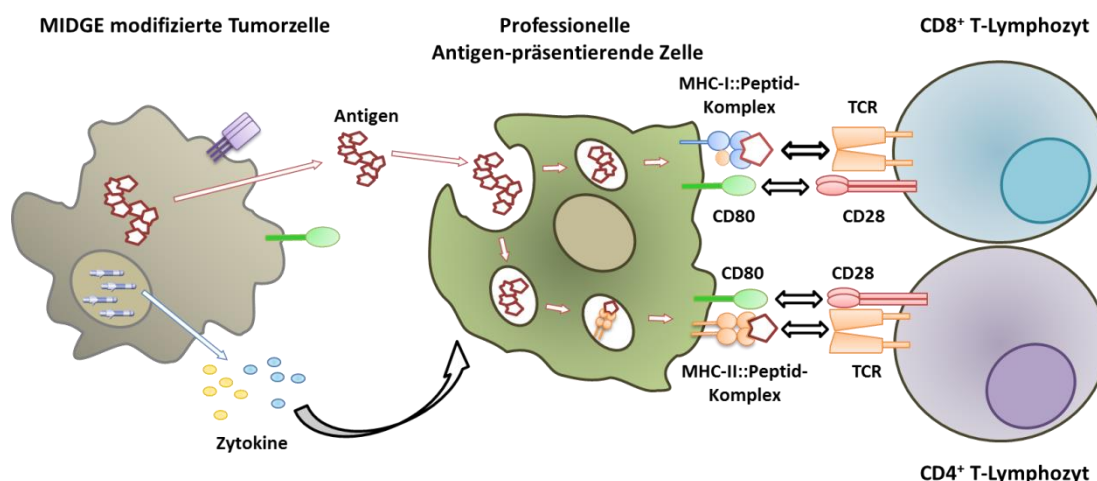


**Abbildung 1.3 Wirkmechanismus Wirkstoffzellen - direkte Aktivierung von CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten (Mologen, modifiziert)**

Bedingt durch die Aktivierung werden die CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten zur Sezernierung von IL-2 angeregt sowie zur Expression des hoch-affinen IL-2-Rezeptors CD25. Dies führt zu einer autokrinen Stimulation, welche die klonale Expansion und die Differenzierung in zytotoxische T-Lymphozyten fördert (Frankenberger et al., 2005; Kronfeld et al., 2005). Verschiedene Studien haben gezeigt, dass genmodifizierte Tumorzellen, welche kostimulatorische Moleküle exprimieren (CD80/ CD86) in der Lage sind, in tumorspezifischen zytotoxischen T-Lymphozyten (CTL)-Immunantworten zu induzieren. (Frankenberger et al., 2005; Joki et al., 1999; Jung et al., 1999; Kronfeld et al., 2005; Lee et al., 2001). Ebenso werden allogene MHC-Molekül::Peptid-Komplexe durch NK-Zellen erkannt und eliminiert. Dabei interagieren die allo-genen MHC-Molekül::Peptid-Komplexe mit Killerzell-Immunglobulin-ähnlichen Rezeptoren (KIR, *killer immunoglobulin like receptor*) auf den NK-Zellen. Das daraus resultierende aktivierende Signal führt schließlich zur Aktivierung der NK-Zelle und Eliminierung der allo-genen Tumorzelle (Caligiuri, 2008).

Professionelle Antigen-präsentierende Zellen (APC) phagozytieren Zelltrümmer abgetöteter Wirkstoffzellen und prozessieren vorhandene Antigene, um diese über ihre zelleigenen MHC-

Moleküle geeigneten T-Lymphozyten zu präsentieren. Naïve T-Lymphozyten erkennen über ihren T-Zellrezeptor (TCR) den Komplex aus körpereigenem MHC-Molekül und präsentiertem Antigenpeptid und erhalten so das primäre Aktivierungssignal. Für eine vollständige Aktivierung ist jedoch ein zweites Signal über eine Interaktion mit kostimulatorischen Molekülen notwendig, welches ebenfalls von den APC gestellt wird. Die Aktivierung von  $CD4^+$  T-Lymphozyten erfolgt über MHC-Klasse-II-Moleküle, während  $CD8^+$  T-Lymphozyten über MHC-Klasse-I-Moleküle aktiviert werden („cross presentation“, Abbildung 1.4).



**Abbildung 1.4 Wirkmechanismus der Wirkstoffzellen - indirekte Aktivierung von T-Lymphozyten über Antigen-präsentierende Zellen (Mologen, modifiziert)**

Antigen-präsentierende Zellen (APC) phagozytieren und prozessieren Antigene der Wirkstoffzellen. In der Regel erfolgt die Präsentation der prozessierten Antigenpeptide über MHC-Klasse-II-Moleküle, wodurch  $CD4^+$  T-Lymphozyten aktiviert werden. Über einen Prozess der als „Cross presentation“ bezeichnet wird, werden die prozessierten Antigenpeptide auch auf MHC-Klasse-I-Molekülen präsentiert, wodurch  $CD8^+$  T-Lymphozyten aktiviert werden können.

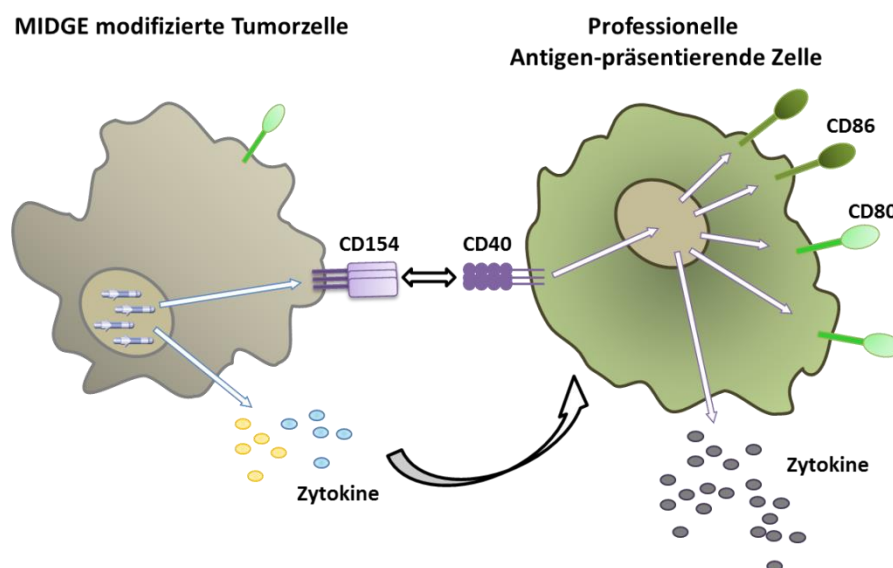
In Folge einer direkten Aktivierung von  $CD8^+$  T-Lymphozyten eliminieren die differenzierten  $CD8^+$  Effektorzellen andere körperfremde Zellen, welche den gleichen MHC-Klasse-I-Molekül::Peptid-Komplex tragen. Während  $CD8^+$  T-Lymphozyten, die nach einer indirekten Aktivierung über APCs zu Effektorzellen differenzieren, körpereigene Zellen lysieren, die die gleichen Antigenpeptide über körpereigene MHC-Klasse-I-Moleküle präsentieren. Die aktivierten  $CD4^+$  T-Lymphozyten differenzieren in  $T_H1$ - bzw.  $T_H2$ -Lymphozyten. Während die  $T_H1$ -Lymphozyten eine zellvermittelte Immunantwort unterstützen, ruft die Generierung von  $T_H2$ -Lymphozyten eher eine humorale Immunantwort hervor. Die Anwesenheit von dSLIM® und die durch die Wirkstoffzellen sezernierten Zytokine (IL-7, GM-CSF) verlagern das Gleichgewicht der Differenzierung der  $CD4^+$  T-Lymphozyten zu Gunsten einer  $T_H1$ -basierten zellvermittelten Immunantwort.

Das Membranprotein CD80 wird in erster Linie von APCs und B-Lymphozyten exprimiert. Es fungiert als kostimulatorisches Signalmolekül bei der Aktivierung von T-Lymphozyten. Diese

benötigen zwei Signale für eine vollständige Aktivierung. Zunächst das primäre Signal, welches über die Interaktion eines MHC-Molekül::Peptid-Komplexes mit dem TCR vermittelt wird. Dieses primäre Signal allein mündet in einem Zustand der als Anergie bezeichnet wird, in dem der T-Lymphozyt nicht mehr auf eine Aktivierung durch ein spezifisches Antigen aktiviert werden kann. Eine vollständige Aktivierung wird nur durch ein sekundäres Signal erreicht, vermittelt durch das auf naiven T-Lymphozyten exprimierte CD28-Antigen. Diese Aktivierung erfolgt durch die Interaktion mit CD80 (bzw. CD86) auf den APCs (Abbildung 1.3 und Abbildung 1.4). In Folge des Einschleusens eines CD80-kodierenden MIDGE®-DNA-Vektors exprimieren die Wirkstoffzellen dieses kostimulatorische Molekül. Die Präsentation zelleigener Antigenpeptide über die MHC-Moleküle in Kombination mit der Expression von CD80, sind die Wirkstoffzellen in Lage naiven T-Lymphozyten nicht nur das primäre, sondern auch das sekundär aktivierende Signal zu vermitteln und bewirken in Folge dessen eine vollständige Aktivierung von T-Lymphozyten. Neben dieser positiven Regulation der T-Lymphozyten-Aktivierung spielt CD80 außerdem eine Rolle in der Repression der T-Lymphozyten-Aktivierung. Dabei interagiert CD80 mit dem Oberflächenmolekül CTLA-4, dessen Expression durch die Aktivierung des T-Lymphozyten verstärkt wird. Da CTLA-4 eine höhere Affinität für CD80 (bzw. CD86) besitzt als CD28, interagiert es bevorzugt mit CD80, wodurch die Proliferation des T-Lymphozyten beendet wird (Green, 2000). In einer Studie von Antonia et al. (2000) konnte belegt werden, dass in Mäusen einer Überexpression von CD80 in autologen Tumorzellen zu einer erhöhten Anzahl reaktiver T-Lymphozyten führt, sowie zu einer durch T-Lymphozyten vermittelten Eliminierung parentaler Tumorzellen. Ebenso konnte auch im Menschen bereits nachgewiesen werden, dass CD80 genmodifizierte allogene Tumorzellen, vor allem in Kombination mit Zytokinen wie IL-2, IL-7 oder GM-CSF zu einer Expansion Tumorzell-spezifischer T-Lymphozyten führt (Frankenberger et al., 2005).

Das kostimulatorische Molekül CD154 wird hauptsächlich auf aktivierten CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten exprimiert und vermittelt Aktivierungssignale an APC und B-Lymphozyten. Durch das Einschleusen entsprechender MIDGE®-DNA-Vektoren exprimieren auch die Wirkstoffzellen dieses kostimulatorische Molekül und sind so in der Lage diese aktivierende Funktion zu imitieren. Eine Interaktion mit CD40 auf B-Lymphozyten fördert je nach Differenzierungsstadium die Proliferation, Differenzierung, Immunglobulin-Produktion bzw. den Immunglobulin-Klassenwechsel. Außerdem hat die Expression von CD154 einen direkten Effekt auf die Expression von Adhäsionsmolekülen sowie weiterer kostimulatorischer Moleküle (CD54, CD23, CD80, CD86); es regt die Produktion zahlreicher Zytokine (IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ ) an und führt weiterhin zu einer vermehrten Expression von MHC-Molekülen auf B-Lymphozyten (van Kooten et al., 2000). Monozyten und Makrophagen werden nach einer Interaktion von

CD40 und CD154 dazu angeregt, Zytokine, wie TNF- $\alpha$ , MIP-1 $\alpha$  (CCL3) und IL-12 zu sezernieren. Ebenso wird eine gesteigerte Expression kostimulierender Moleküle (CD80, CD86) auf den APC (Abbildung 1.5) induziert. Damit erhöht sich das Potential der APC, T-Lymphozyten zu aktivieren und die Immunantwort der CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten zu Gunsten einer T<sub>H</sub>1-basierten zellulären Immunantwort zu verschieben (Elgueta et al., 2009; van Kooten et al., 2000).



**Abbildung 1.5 Wirkmechanismus der Wirkstoffzellen – Aktivierung von APC**

Das Zytokin IL-7 spielt eine essentielle Rolle in der Entwicklung der B- und T-Lymphozyten. Durch die Inhibition der Bcl-2-vermittelten Apoptose unterstützt IL-7 das Überleben von naiven T-Lymphozyten im peripheren lymphatischen Gewebe. Die Eigenschaft, dass IL-7 die Immunreaktion auf schwache oder niedrig affine Antigene durch Förderung der T-Lymphozyten-Proliferation (Abbildung 1.3) und Sezernierung weiterer Zytokine steigert, macht es als potentielles Immuntherapeutikum gegen Tumorzellen besonders interessant. So konnten Fike et al. (1997) bereits zeigen, dass genmodifizierte, IL-7 exprimierende primäre Tumorzellen in der Lage sind die Sensitivität von Tumorzellen gegenüber Tumorzell-spezifischen zytotoxischen T-Lymphozyten in einem autologen Ansatz zu verstärken.

GM-CSF gehört zu den hämatopoetischen Zytokinen. Es stimuliert die Proliferation von Vorläuferzellen der Granulozyten und/oder Makrophagen, beeinflusst deren Differenzierung, induziert ihre Reifung und stimuliert die funktionelle Aktivität reifer hämatopoetischer Zellen. Monozyten differenzieren unter Einfluss von GM-CSF zu Typ 1 Dendritischen Zellen (DC), welche die Differenzierung von CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten in T<sub>H</sub>1-Zellen fördern, wodurch wiederum eine zellvermittelte Anti-Tumorreaktion forciert wird (Arellano et al., 2008). Aktivierte, reife DC sind professionelle APC, die ebenso CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten effektiv aktivieren können. Damit fördert GM-CSF eine potente, spezifische Anti-Tumor-Immunantwort, die über CD8<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten vermittelt wird. Verschiedene Studien belegen eine GM-CSF vermittelte

Induktion einer effektiven Anti-Tumorreaktion und Tumorregression (Dranoff et al., 1993; Rini et al., 1998; Wos et al., 1996). Die Kombination der Zytokine IL-7 und GM-CSF in einer Immuntherapiestudie in Mäusen (Li et al., 2007) zeigt eine deutlich höhere Anzahl aktivierter Effektor-T-Lymphozyten in den Tumoren der Versuchstiere, sowie eine höhere Lebenserwartung, gegenüber der Einzeltherapie. Weiterhin konnte die Anzahl der T-Lymphozyten erhöht werden, die spezifisch für schwache Antigene sind. Im Menschen erfolgte eine Pilotstudie mit autologen Tumorzellen, die mit IL-7 und GM-CSF kodierenden Vektoren transfiziert wurden, in Kombination mit dem immunstimulierenden Oligonukleotid dSLIM<sup>®</sup>. Dabei wurde ein verändertes Zytokin-Muster im Serum und eine erhöhte Anzahl an CD8<sup>+</sup> und CD56<sup>+</sup> Lymphozyten im Blut der behandelten Patienten festgestellt, was insgesamt auf die Induktion einer Anti-Tumor-Immunantwort *in vivo* schließen lässt (Wittig et al., 2001).

Der Wirkstoff MGN1601 stimuliert eine effektive Anti-Tumor-Immunantwort auf verschiedenen Ebenen. Während das immunstimulatorische Adjuvanz dSLIM<sup>®</sup> zu einer unspezifischen Aktivierung des Immunsystems führt, induzieren die Wirkstoffzellen eine spezifische T-Lymphozyten-vermittelte Anti-Tumorantwort. Dabei stellen die allogenen MHC-Moleküle bzw. die darauf präsentierten Wirkstoffzell-assoziierten Antigenpeptide das primäre Aktivierungssignal, während das sekundäre Aktivierungssignal von den durch die Wirkstoffzellen exprimierten, kostimulatorischen Molekülen (CD80, CD154) gestellt wird. Die hohe lokale Konzentration der Zytokine IL-7 und GM-CSF intensiviert die Aktivierung des Immunsystems zusätzlich und forcieren eine zellvermittelte Immunantwort.

### **1.3 DNA-Microarrays als Mittel zur Genexpressionsanalyse**

Durch die Genmodifikation der B25-MOL-Zellen zur Herstellung der Wirkstoffzellen wird das Proteom dieser Zellen, durch das Einschleusen CD80-, CD154-, IL-7- und GM-CSF-kodierender MIDGE<sup>®</sup>-DNA-Vektoren verändert. Es ist davon auszugehen, dass es außerdem zu sekundären Veränderungen des Expressionsmusters kommt. Zum einen bedingt durch den Herstellungsprozess selbst und zum anderen durch die Adaptation der Zellen auf die eingeschleusten MIDGE<sup>®</sup>-DNA-Vektoren und ihrer Genprodukte. Um zu ermitteln, wie sich das Expressionsmuster der Wirkstoffzellen von dem der nativen B25-MOL-Zellen unterscheidet, ist es notwendig, die relativen Mengen der mRNA möglichst vieler Gene zu bestimmen und einander gegenüberzustellen. Da dies mittels etablierter Methoden wie der quantitativen RT-PCR aufgrund der hohen Anzahl an Einzelexperimenten nicht praktikabel ist, wird im Rahmen der vorliegenden Arbeit auf eine alternative Hochdurchsatz-Methode zurückgegriffen, die Microarray-Technologie. Diese bietet die Möglichkeit, bei geringem Material- und Zeitaufwand

die relativen Mengen der mRNA zehntausender Gene gleichzeitig zu bestimmen und damit Rückschlüsse auf die veränderte Aktivität von Genen bzw. den veränderten Phänotyp der Wirkstoffzellen zu ziehen.

Das Prinzip der DNA-Microarray-Technologie beruht analog zum Southern Blot auf einer spezifischen Bindung komplementärer, einzelsträngiger Polynukleotide. Im Gegensatz zu dieser Methode wird bei der DNA-Microarray-Technologie die Sonde (einzelsträngiges Oligonukleotid mit bekannter Sequenz) auf einem Träger ortsspezifisch immobilisiert, während die zu untersuchende Probe (einzelsträngiges Nukleinsäure-Fragmente aus Probenmaterial) markiert und frei beweglich ist. Komplementäre Nukleinsäure-Fragmente binden spezifisch an ihre entsprechende Sonde auf dem Trägermaterial. Die Fluorophor- oder Silber-markierten hybridisierten Nukleinsäure-Fragmente werden anschließend mittels eines geeigneten Scanners detektiert und quantifiziert. Die vom Scanner erfassten Signale können einzelnen Sonden und damit bestimmten Nukleotidsequenzen zugeordnet werden. Die Intensität der detektierten Signale stellt dabei ein Maß für die entsprechend vorhandene Menge des hybridisierten Nukleinsäure-Fragments aus dem Probenmaterial dar.

Die kommerziell erhältlichen DNA-Microarrays lassen sich in drei Gruppen unterscheiden, i) den „*short oligonucleotides*“ basierten, bei denen Sonden verwendet werden, die 25 Nukleotide lang sind (Affymetrix), ii) „*long oligonucleotides*“ basierten, bei denen die Länge der Sonden 50 - 80 Nukleotide beträgt (Agilent, Illumina, Amersham) und iii) den „*spotted-cDNA amplicons*“, bei denen kurze PCR-Amplifikate als Sonden dienen (NIA).

### **1.3.1 Human GeneChip® 1.0 ST (Affymetrix Inc.)**

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wird der Human GeneChip® 1.0 ST der Firma Affymetrix Inc. verwendet. Hierbei handelt es sich um einen „*short oligonucleotides*“ basierten humanen Gesamt-Transkriptom-Array, der die Expressionsstärke von über 28.000 Genen mit Hilfe von über 764.000 verschiedenen Sonden abbildet. Dabei wird das Ergebnis der Gen-Level-Analyse von multiplen Sonden auf verschiedenen Transkriptbereichen eines Gens zu einem Wert zusammengefasst, der die Expressionsstärke aller Transkripte desselben Gens repräsentiert (GeneChip Gene 1.0 ST Array System for Human, Mouse and Rat, 2007).

Die Herstellung dieser GeneChips erfolgt in situ durch Photolithographie, wobei die einzelnen Sonden direkt auf dem Träger (Glas) synthetisiert werden. Durch diese Art der Herstellung wird eine sehr hohe Dichte der Sonden auf dem Träger erreicht, weshalb die Chips eine relativ geringe Größe besitzen. Eine exemplarische Darstellung der Affymetrix GeneChips ist in Abbildung 1.6 zu sehen. Derzeit beträgt die Länge der Oligonukleotide, die auf den Affymetrix

Chips synthetisiert werden, 25 Nukleotide. In der Regel ist für jedes Oligonukleotid (PM-Oligo, *perfect match*) auf dem Chip ein spezifisches MM-Oligo (*miss match*) vorhanden, bei dem die mittlere Base durch ihr jeweiliges Komplement ersetzt ist. Zusammen wird ein solcher Satz an Sonden bei Affymetrix als „ProbeSet“ und im Folgenden als Sonden-Set bezeichnet.



Abbildung 1.6 Affymetrix GeneChip ([www.affymetrix.com](http://www.affymetrix.com))

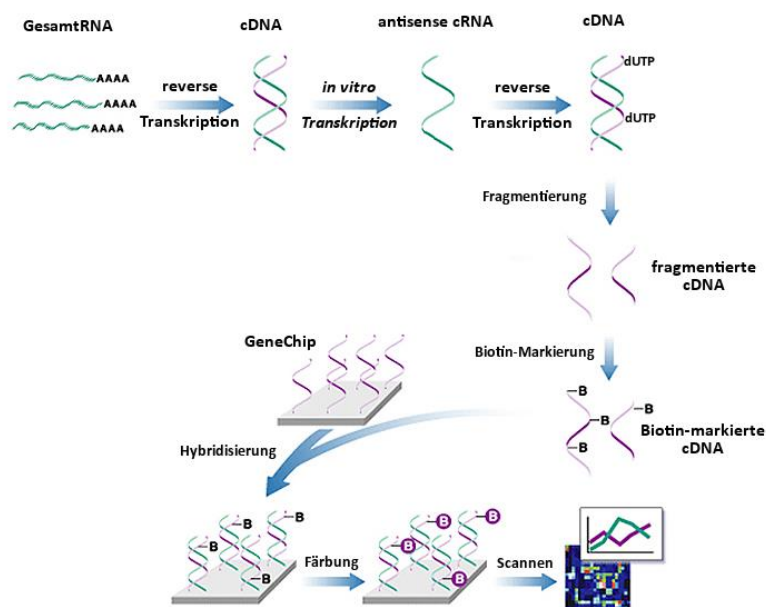
### 1.3.2 Array-Hybridisierung

Für die Durchführung eines Microarray-Experimentes muss in einem ersten Schritt aus den zu untersuchenden Zellen die RNA extrahiert werden. Anschließend wird die aufgereinigte RNA in mehreren Schritten amplifiziert und markiert.

Ausgehend von der Gesamt-RNA erfolgt als erstes eine reverse Transkription mit anschließender Zweitstrangsynthese, aus der doppelsträngige cDNA hervorgeht. Diese fungiert im folgenden Schritt als Transkriptions-Template; die vorhandene cDNA wird *in vitro* in cRNA umgeschrieben. Mittels nukleinsäure-bindender Beads wird die Probe von vorhandenen Enzymen, Salzen und nicht eingebauten dNTP getrennt. Daran schließt sich eine weitere reverse Transkription an, bei der das Nukleotid-Analogon dUTP in die resultierende cDNA eingebaut wird. Nach einer RNase H Behandlung zur Hydrolyse der cRNA und einem weiteren Reinigungsschritt wird die einzelsträngige cDNA fragmentiert. Unter Verwendung der Uracil-DNA-Glykosylase (UDG) und der A-Purin-A-Pyrimidin-Endonuklease (APE1) werden die zuvor eingebauten dUTP in der cDNA erkannt und an dieser Position fragmentiert. Anschließend erfolgt eine terminale Polyadenylierung und Biotin-Markierung der fragmentierten cDNA. Im folgenden Schritt wird die markierte cDNA in einem mehrstündigen Prozess unter Northern-Blot-ähnlichen Bedingungen mit den Sonden auf der Chipoberfläche hybridisiert. Anschließend wird der Chip gewaschen und gefärbt. Dabei wird ein fluoreszierendes Streptavidin-Phycoerythrin-Konjugat aufgebracht. Über die nicht-kovalente Biotin-Streptavidin-Bindung wird die hybridisierte cDNA auf der Chip-Oberfläche gefärbt. Nach einem letzten Waschschrift werden die Fluoreszenzintensitäten mittels eines Laserscanners ausgelesen und Softwarebasiert für jedes Sonden-Set eine numerische Signalintensität berechnet. Diese erlaubt nach



der Präprozessierung der Daten, auf die im folgenden Abschnitt näher eingegangen wird, eine genspezifische Bestimmung der relativen Menge von RNA-Transkripten innerhalb der zu untersuchenden Probe und stellt damit ein Maß für die Expressionsstärke der Transkripte dar (GeneChip® Expression Analysis Technical Manual, 2009).



**Abbildung 1.7** Schematische Darstellung des experimentellen Ablaufes eines Human GeneChip Microarray Experiments

Die extrahierte RNA wird zunächst in doppelsträngige cDNA konvertiert, um anschließend in cRNA transkribiert zu werden. Unter Verwendung eines dUTP/dNTP Mixes erfolgt dann eine weitere reverse Transkription. Die resultierende cDNA wird hydrolytisch fragmentiert und Biotin-markiert. Im nächsten Schritt erfolgen die Hybridisierung an die Sonden auf der Chip-Oberfläche, die Färbung und schließlich das Laser-gestützte Auslesen der Fluoreszenzintensitäten. (modifiziert, [www.affymetrix.com](http://www.affymetrix.com))

### 1.3.3 Datenanalyse von Affymetrix GeneChips

Die Oligo-Microarray-Technologie wird seit etwa Ende der 1990er Jahre routinemäßig eingesetzt. Obwohl seitdem zahllose Microarray-Experimente von Forschergruppen weltweit durchgeführt wurden, konnte man sich bisher nicht auf eine zuverlässige allgemeingültige Methode zur Auswertung der gewonnenen Daten einigen. Vielmehr existiert eine Reihe von Datenanalyse-Methoden nebeneinander, und laufend werden neue Verfahren entwickelt. In zahlreichen Publikationen werden Datenanalyse-Methoden miteinander verglichen, jedoch führen diese Vergleiche je nach verwendetem Chip, analysierten Parametern und angelegten Maßstäben zu unterschiedlichen Ergebnissen (Boes et al., 2005; Bolstad et al., 2003; Irizarry et al., 2006; Qin et al., 2006). Entsprechend schwierig gestaltet sich die Auswahl einer objektiven Methode zur Datenanalyse.

Zur Auswertung der großen Datenmengen stehen verschiedene kommerzielle Softwarelösungen zur Verfügung, die vor allem von den Herstellerfirmen der Microarrays vertrieben werden (Partek, MAS5.0, Microarray Software Suite TM4, Mayday). Daneben existieren auch nicht-kommerzielle Softwareprogramme zur Analyse solcher Datensätze, die auf verschiedene Chip-Plattformen angewendet werden können und im Vergleich zu den kommerziell vertriebenen Programmen nicht so kostenintensiv sind. Während die kommerziellen Software-Lösungen meist nur eine Methode zur Qualitätskontrolle, Präprozessierung und Identifikation differentiell exprimierter Gene zur Verfügung stellen, sind die nicht-kommerziellen Software-Lösungen weitaus flexibler und bieten verschiedene Methoden und Algorithmen zur Auswertung an.

Eines dieser nicht-kommerziellen Softwareprogramme ist das Bioconductor-Projekt ([www.bioconductor.org](http://www.bioconductor.org)), ein internationales *open-source* und *open-development* Software-Projekt für die Analyse großer Datensätze aus Microarray-Experimenten. Es basiert auf der Programmiersprache R, welche für statistische Berechnungen und Generierung von Grafiken entwickelt wurde ([www.r-project.org](http://www.r-project.org)). Das Bioconductor-Projekt besitzt einen modularen Aufbau, was eine unabhängige und parallele Weiterentwicklung der Software erlaubt. Für die Datenanalyse stehen hier eine Vielzahl verschiedener Softwarepakete und Module zur Verfügung, so dass basierend auf den Eigenschaften des Datensatzes ein geeignetes Modul für die Auswertung ausgewählt werden kann (Gentleman et al., 2004).

### **1.3.3.1 Präprozessierung**

Um eine Aussage darüber treffen zu können, welche Auswirkungen bestimmte experimentelle Bedingungen auf das Expressionsmuster von Zellen haben, ist es notwendig, die Expressionsdaten der unveränderten Zellen mit denen der finalen Zellen aus dem Experiment zu vergleichen.

Bei der Verwendung der aufwendigen und komplizierten Microarray-Technologie können zufällige und systematische Fehler auftreten. Da die zahlreichen technischen Arbeitsschritte nie exakt wiederholt werden können, sind die detektierten Signale und damit die Ergebnisse eines Microarray-Experimentes nie identisch zu den Ergebnissen eines zweiten Microarray-Experiments. Weiterhin kann eine Variabilität, bedingt durch unterschiedliche Bearbeiter oder verschiedene Herstellungschargen der benötigten Komponenten entstehen. Zusätzlich können Gen-spezifische Effekte beobachtet werden, da die Hybridisierung des Probenmaterials mit den Sonden auf den Chips von Gen zu Gen unterschiedlich effizient sein kann. Letztlich wird auf jedem Chip ein gewisses Hintergrundsignal beobachtet (Hintergrundrauschen und Artefakte). Deshalb muss als erster Schritt in der Präprozessierung einer Microarray-

Datenanalyse grundsätzlich eine Qualitätskontrolle der detektierten Signale durchgeführt werden, um grobe Verunreinigungen oder andere Mängel aufzudecken und betroffene Microarray-Experimente gegebenenfalls aus der Datenanalyse auszuschließen (Russell et al., 2009). Dabei werden die erhobenen Datensätze aller durchgeführten Microarray-Experimente auf zwei Ebenen analysiert: i) auf Array-Ebene, dabei wird anhand des gescannten Bildes die Qualität des detektierten Signals eines jeden Spots und dessen Umgebung analysiert, außerdem werden die vorhandenen Kontrollspots ausgewertet und schließlich die Uniformität zwischen Sonden des gleichen Typs analysiert; ii) auf experimenteller Ebene werden alle durchgeführten Microarray-Experimente miteinander verglichen, um so Ausreißerexperimente zu identifizieren und diese von der eigentlichen Datenanalyse ausschließen zu können.

Trotz Qualitätskontrolle bleibt jedoch eine gewisse, unerwünschte Variabilität zwischen den Microarrays, welche durch die genannten Effekte verursacht wird. Aus diesem Grund werden die Expressionsdaten (.CEL Dateien, welche die Sonden-Set-spezifischen Signalintensitäten enthalten) vor der statistischen Analyse zur Identifizierung der differentiellen Genexpression bereinigt. Für dieses als Präprozessierung bezeichnetes Verfahren wurden zahlreiche Methoden entwickelt. Für die Präprozessierung von Affymetrix Daten kommen meist MAS5 (Statistical Algorithms Reference Guide, 2007), PLIER (Guide to Probe Logarithmic Intensity Error (PLIER) Estimation, 2001), RMA oder GCRMA (Irizarry et al., 2003b) zur Anwendung. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die von Irizarry et al. (2003b) publizierte Präprozessierungsmethode RMA (*robust multi-array average*) angewendet. Diese setzt sich aus drei essentiellen Schritten zusammen: i) die Korrektur des Hintergrundrauschens, über ein globales Modell einer normalverteilten Hintergrundintensität, ii) die Quartilnormalisierung, wodurch die Verteilung der Expressionsintensitäten der Microarrays einander angeglichen werden und iii) das Zusammenfassen der Einzelintensitäten zu Probe-Sets und damit Zuordnung eines Expressionswertes zu einem Gen. Das Ergebnis dieser Präprozessierung ist ein Datensatz, welcher die Expressionsstärke jedes mit Hilfe des GeneChips analysierten Gens aller analysierten Versuchsproben enthält.

### **1.3.3.2 Filterung der Daten**

Bevor die Daten einer statistischen Analyse zur Bestimmung der differentiellen Expression der analysierten Gene in unterschiedlich behandelten Zellpopulationen zugeführt werden, ist es sinnvoll, eine Datenfilterung durchzuführen, um den vorhandenen Datensatz des globalen Expressionsprofils auf die Daten einzugrenzen, die für die gegebene Fragestellung von Interesse sind. Die Reduktion der Anzahl der betrachteten Gene führt bei der Identifizierung

der differentiell exprimierten Gene zu statistisch besser abgesicherten Ergebnissen. Dabei unterscheidet man unspezifische und spezifische Filtermethoden.

Bei den spezifischen Filtermethoden wird der globale Datensatz der Expression aller Gene anhand einer Liste von Gen gefiltert, die beispielsweise auf einer bestimmten Gen-Ontologie (*Gene Ontologies*, GO) beruhen. Hier beschränkt sich das Interesse auf einen bzw. wenige biologische Prozesse oder eine bestimmte Gengruppe. Nach der Filterung der Daten bleiben nur die Gene im Datensatz erhalten, die zur gewählten Gengruppe gehören, alle übrigen Gene, egal ob differentiell exprimiert oder nicht, bleiben unberücksichtigt. So können schnell differentiell exprimierte Gene identifiziert werden, die mit einem bestimmten Phänotyp assoziiert sind.

Die nichtspezifischen Filtermethoden zielen darauf ab, Gene aus der Analyse zu entfernen, die über alle analysierten GeneChips nur eine sehr geringe Signalintensität oder eine geringe Varianz aufweisen. Die Filterung der Gene erfolgt dabei unabhängig von Genclustern oder funktionellen Gengruppen. Dabei ist die Filterung der Daten basierend auf der Variabilität generell besser, als die Filterung der Daten allein basierend auf der Signalintensität (Russell et al., 2009).

### **1.3.3.3 Identifizierung differentiell exprimierter Gene**

Wie für die Präprozessierung, stehen auch für die Identifizierung differentiell exprimierter Gene verschiedene statistische Verfahren zur Verfügung. Zwar ist bekannt, dass das Expressionsmuster einer Zelle ein koordiniertes System darstellt, die Gene dementsprechend nicht unabhängig voneinander reguliert werden. Dennoch beschränken sich die meisten Verfahren aufgrund der hohen Dimensionalität der Daten und des allgemein fehlenden Wissens über die genauen Wechselwirkungen zwischen den Genen auf univariate Analysen (Scholtens et al., 2005). Die einfachste Möglichkeit für die Berechnung der differentiellen Expression sind Quotienten (Verhältnisse) der Expressionsmittelwerte zwischen den zu untersuchenden Proben Gruppen. Also die Berechnung der relativen Expressionsänderung (*fold change*, FC). Bei einer geringen Anzahl an durchgeführten Microarray-Experimenten pro Proben Gruppe, wie auch in der vorliegenden Arbeit, ist der FC wohl die beste Möglichkeit zur Ermittlung und Bewertung der differentiellen Expression. Dieser hat jedoch den entscheidenden Nachteil, dass die experimentelle Variabilität nicht berücksichtigt werden kann. Es wurden jedoch auch Verfahren entwickelt, welche die Varianzabschätzung verbessern, indem sie die Informationen der Streuung aller Gene über mehrere mit unterschiedlichen Proben hybridisierten Chips miteinbeziehen. Dazu gehören unter anderem die „*Significance Analysis of Microarrays*“ (SAM) von Tusher et al. (2001) und „*linear models*

for *microarray data*“ (limma) von Smyth (2004). In beiden Methoden wird die Varianz eines Gens durch eine globale Varianzabschätzung bestimmt, wodurch die resultierenden t-Statistiken (moderate t-Statistik) stabiler werden (Hummel, 2009). Beide Verfahren liefern auch bei einer relativ geringen Anzahl an Versuchsproben und Replikaten verlässliche Aussagen. Für die Identifizierung der differentiell exprimierten Gene wird im Rahmen der vorliegenden Arbeit „limma“ verwendet, welches in OnechannelGUI, einem Modul des Bioconductors, implementiert ist.

### **1.3.4 Funktionelle Gen-Annotationsanalyse**

Um die differentiell regulierten Gene funktionellen Gengruppen zuordnen und so die biologische Relevanz der Ergebnisse zu analysieren, kann eine funktionelle Gen-Annotationsanalyse mit Hilfe des Internet-basierten DAVID-Programms durchgeführt werden. Diese Auswertungsmethode ermöglicht die Identifizierung überrepräsentierter funktioneller Gengruppen gegenüber dem genomweiten Expressionsprofil. Unter Berücksichtigung der vermuteten Wirkungsweise z. B. der Tumorstoffe können dann funktionelle Gengruppen als besonders interessant eingestuft werden.

#### **1.3.4.1 Zellzyklus und Apoptose**

Voraussetzung für eine physiologische Teilung von Zellen ist ein intakter und korrekt regulierter Ablauf des Zellzyklus, der durch eine Vielzahl von Aktivatoren und Inhibitoren kontrolliert wird. Im Verlauf der Zellteilung (Mitose) verdoppelt sich das Genom und verteilt sich exakt auf die beiden entstehenden Tochterzellen. Kontrollmechanismen ermöglichen einerseits eine Reparatur eventuell vorhandener DNA-Schäden, gleichzeitig können sie eine Zelle durch Apoptose eliminieren (Wyllie et al., 1999). Weiterhin kann eine Expression bestimmter Rezeptoren (z.B. Rezeptoren für Tumornekrosefaktoren) eine erhöhte Sensitivität der Wirkstoffzellen gegenüber extrinsischen Apoptosesignalen bewirken. Die Genexpressionsanalysen sollen zeigen, ob ein herstellungsbedingt verändertes Expressionsprofil zu einem vermehrten Absterben der Wirkstoffzellen führt. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit soll so der Einfluss des Herstellungsprozesses auf die Apoptose-Rate der Wirkstoffzellen untersucht werden.

### **1.3.4.2 Aktivierung, Proliferation und Differenzierung von Lymphozyten**

Die Aktivierung, Proliferation und Differenzierung von Lymphozyten stellt einen komplexen Prozess dar, an dem eine Vielzahl verschiedener Moleküle beteiligt ist. Die Wirkstoffzellen exprimieren essentielle immunstimulatorische Oberflächenmoleküle (CD80, CD154) und sezernieren GM-CSF und IL-7. In Kombination mit der Expression allogener MHC-Klasse-I-Moleküle sind die Wirkstoffzellen in der Lage mit CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten zu interagieren und diese direkt zu aktivieren. Außerdem sollen Antigenpräsentierende Zellen (APC) aktiviert werden, welche Wirkstoffzell-assoziierte Antigene phagozytieren, prozessieren und daraus resultierende Peptidfragmente T-Lymphozyten präsentieren (vgl. 1.2.1 MGN1601 Wirkmechanismus). An der Interaktion mit T-Lymphozyten sind weitere Oberflächenmoleküle beteiligt, deren verändertes Expressionsprofil sich positiv oder negativ auswirken kann. Insbesondere zählen dazu Moleküle, die an der Ausbildung der immunologischen Synapse beteiligt sind; z.B. Adhäsionsmoleküle wie ICAM1, ICOSLG oder DC-SIGN. Eine verminderte Expression dieser Gene hätte zur Folge, dass es zu Störungen bei der Ausbildung der immunologischen Synapse kommt und damit zu einer verminderten Fähigkeit der Wirkstoffzellen mit T-Lymphozyten zu interagieren.

### **1.3.4.3 Zytokine und Chemokine**

Eine erfolgreiche Aktivierung, Proliferation und Differenzierung von Lymphozyten ist abhängig von lokalen und systemischen Zytokin-Mustern. Chemotaktische Zytokine, die auch als Chemokine bezeichnet werden, vermitteln die Adhäsion und Migration von Immunzellen. Neben den bereits erwähnten Zytokinen IL-7 und GM-CSF, die von den Wirkstoffzellen sezerniert werden, könnte die Expression weiterer Zytokine sowohl positive, wie negative Effekte hervorrufen. Eine verstärkte Expression weiterer immunstimulatorischer Zytokine (z.B. IL-2, CCL5, IL-6) kann dazu beitragen Antigenpräsentierende Zellen oder Lymphozyten anzulocken und zu aktivieren. Dagegen würde sich eine verstärkte Expression immunsuppressiver Zytokine (z.B. TNF- $\beta$ , TGF- $\beta$ , IL-10) negativ auf das angestrebte Wirkprinzip des Tumorstoffzells auswirken (Janeway et al., 2002).

### **1.3.4.4 Antigenprozessierung und Antigenpräsentation**

Für eine effektive Aktivierung von Lymphozyten und APC ist die Expression von MHC-Molekülen essentiell. Diese präsentieren Antigene des zelleigenen Proteinrepertoires (MHC-Klasse-I-Moleküle) sowie phagozytierter und prozessierter Antigene (MHC-Klasse-I-Moleküle und MHC-Klasse-II-Moleküle). Geeignete T-Lymphozyten sind in der Lage über die Interaktion ihres TCR mit dem präsentierten MHC-Molekül::Peptid-Komplex zu differenzieren, ob es sich

um eine körpereigene oder körperfremde, bzw. um eine gesunde, infizierte oder maligne Zelle handelt. Über MHC::TCR-Komplexe werden, in Kombination mit der Expression des kostimulatorischen Moleküls CD80, CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten direkt aktiviert. Diese sind anschließend in Lage weitere Tumorzellen, die denselben MHC-Klasse-I-Molekül::Peptid-Komplex präsentieren, über ihren TCR zu erkennen und zu eliminieren (Janeway et al., 2002). Dagegen würde sich eine verminderte oder gar fehlende Expression von MHC-Molekülen negativ auswirken, da dann eine direkte Aktivierung geeigneter T-Lymphozyten ausbleibt. In Nierenzellkarzinomen und anderen Neoplasien wird in Kombination mit einer verminderten Expression von MHC-Klasse-I-Molekülen häufig eine verstärkte Expression des nicht-klassischen MHC-Moleküls HLA-G beobachtet (Bukur et al., 2003; Lefebvre et al., 2002; Paul et al., 1998). Eine Zelloberflächenexpression von HLA-G führt zur Resistenz der Zelle gegenüber einer NK-Zell und T-Lymphozyten vermittelten Zytotoxizität, was erhebliche negative Folgen für das angestrebte Wirkprinzip der Tumorstoffzelle hätte. In diesem Fall können die Wirkstoffzellen T-Lymphozyten nicht mehr direkt aktivieren; ein essentieller Teil des Wirkprinzips der Tumorstoffzelle würde nicht mehr funktionieren.

#### **1.3.4.5 Tumorassoziierte Antigene (TAA)**

Bedingt durch die Mutationen und epigenetischen Veränderungen unterscheiden sich Tumorzellen in ihrem Expressionsmuster entscheidend von gesunden Zellen. Daraus resultiert ein verändertes Repertoire der Peptidfragmente, die über MHC-Moleküle präsentiert werden. Geeignete CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten sind in der Lage entsprechende MHC::Peptid-Komplexe auf solchen Zellen zu erkennen und diese zu eliminieren. Da jeder Tumor ein eigenes Repertoire verschiedener TAA exprimiert, ist es wichtig, dass die Wirkstoffzellen ein möglichst breites Spektrum verschiedener TAA exprimieren und so eine effektive Anti-Tumorantwort generiert werden kann. Die Genexpressionsanalysen sollen helfen herauszufinden, welche TAA von den Wirkstoffzellen exprimiert werden. Die Kenntnis darüber kann außerdem helfen, weitere Tumorarten zu identifizieren, die mit diesem oder einem leicht veränderten Tumorstoffzelle behandelt werden können.

#### **1.3.4.6 NK-Zellinteraktion**

Häufig zeigen Tumorzellen eine verminderte Oberflächenexpression von MHC-Klasse-I-Molekülen; ein Escape-Mechanismus, der es diesen abnormen Zellen ermöglicht, der Detektion zytotoxischer T-Lymphozyten zu entgehen. Die NK-Zellen stellen die zytotoxischen Zellen des angeborenen Immunsystems dar und besitzen ein eigenes Repertoire inhibitorischer und aktivierender Rezeptoren. Die Diskriminierung von Tumorzellen durch NK-Zellen beruht

auf deren Fähigkeit, ebensolche Zellen mit einer verminderten Oberflächenexpression von MHC-Klasse-I-Molekülen zu erkennen. Durch eine verminderte Expression von MHC-Molekülen fehlen den inhibitorischen Rezeptoren auf der NK-Zelle die Liganden, wodurch die Signale der aktivierenden Rezeptoren überwiegen und die NK-Zelle aktiviert wird. Infolge dessen werden Perforin, Serin-Esterasen und Proteoglykane aus zytotoxischen Granula in Richtung Zielzelle entlassen; diese verursachen eine osmotische Lyse. Außerdem sind die NK-Zellen in der Lage, mittels spezifischer Rezeptoren wie Fas und TRAIL Apoptose in der Zielzelle zu induzieren (Moretta et al., 2001; Purdy et al., 2009). Allerdings kann in einer Reihe verschiedener Neoplasien neben einer verminderten MHC-Molekül-Expression eine Oberflächenexpression von HLA-G beobachtet werden (vgl. 1.3.4.4 Antigenprozessierung und Antigenpräsentation), ein Escape-Mechanismus, der zur Resistenz der Tumorzelle gegenüber einer NK-Zell bzw. T-Zell vermittelten Zytotoxizität führen kann.

Die Lyse der Wirkstoffzellen durch NK-Zellen könnte Teil des vermuteten Wirkmechanismus sein. Ein Angriff von NK-Zellen auf die Wirkstoffzellen führt dann zu einer vermehrten Freisetzung von Antigenen, die von Antigenpräsentierenden Zellen aufgenommen, prozessiert und mittels MHC-Molekülen zytotoxischen T-Lymphozyten präsentiert werden. Die so aktivierten CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten sind dann in der Lage, andere Tumorzellen, die das gleiche Antigen präsentieren, zu erkennen und zu eliminieren. Anhand der Genexpressionsanalysen kann eventuell ein erhöhtes oder vermindertes Interaktionspotential der Wirkstoffzellen gegenüber NK-Zellen abgeleitet werden. Die Genexpressionsanalysen dieser Arbeit könnten solche durch NK-Zellen vermittelten Wechselwirkungen mit den Wirkstoffzellen aufklären helfen.



## 1.4 Zielsetzung der Arbeit

Maligne Nierenerkrankungen rangieren unter den 10 häufigsten Tumorerkrankungen der westlichen Welt; darunter machen die Nierenzellkarzinome (RCC) den weitaus größten Teil dieser Neoplasien aus. RCC sind sehr heterogen und entstehen aus unterschiedlichen Zelltypen. Häufig werden mit konventionellen Behandlungsmethoden (Bestrahlung, Chemotherapie) nur unzureichende Behandlungserfolge erzielt, weshalb seit einigen Jahren neue Therapieansätze erforscht werden.

Es wurden alternative Therapiemethoden entwickelt, welche unter anderem das Prinzip der Tumorstimulation verfolgen. Eine dieser vielversprechenden Methoden zur Behandlung von RCC entwickelt die Firma Mologen AG, eine zellbasierte Gentherapie mit dem Wirkstoff MGN1601. Dabei werden allogene Tumorzellen (immortalisierte Nierenkarzinomzelllinie) genutzt, um das Immunsystem des Patienten zu aktivieren, so dass die körpereigenen Tumorzellen effektiv bekämpft werden können. Um diese Aktivierung weiter zu steigern, werden vier MIDGE®-DNA-Vektoren, die verschiedene Gene kodieren (CD80, CD154, IL-7, GM-CSF) in die allogenen Tumorzellen mittels Transfektion eingeschleust.

Das bis dato relativ geringe Verständnis biologischer Zusammenhänge ist ursächlich dafür, dass eine wie auch immer begründete Manipulation eher ungerichtet ist und damit auch die resultierenden Effekte als ungerichtet betrachtet werden müssen. Diese Effekte, ausgedrückt im Expressionsmuster der Zellen, nach Manipulation können in i) technisch bedingte Effekte durch die physikalischen Auswirkungen der Transfektion und anschließende Bestrahlung im Verlauf der Wirkstoffherstellung; ii) direkt und beabsichtigte Effekte durch die Expression der vier eingebrachten Vektoren; und iii) sekundäre Effekte, die durch die Expression der vier Vektoren und die zelluläre Adaptation darauf entstehen, unterteilt werden.

Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist die Genexpressionsanalyse der Zellen des Wirkstoffes MGN1601 im Vergleich zu den nativen B25-MOL-Zellen, welche als Ausgangsmaterial für die Herstellung der Wirkstoffzellen dienen, um die resultierenden Effekte, die sich aus der Manipulation dieser Zellen ergeben zu identifizieren und so eine Grundlage für die weitere Optimierung und Fortentwicklung dieser zellbasierten Tumorstimulation zu legen.

In einem ersten Schritt wurden zunächst die Bedingungen der Vektor-DNA-Transfektion für eine hohe Transfektionseffizienz an dem zur Verfügung stehenden Gerät optimiert. Anschließend sollten Microarray-Analysen durchgeführt werden, anhand derer die Expressionsmuster der Zellen im Verlauf des Herstellungsprozesses untersucht und

miteinander verglichen werden sollen. Ein Teil der so identifizierten Genregulationen sollte zur Absicherung und besseren Quantifizierung mittels Taqman® basierter qPCR-Analyse verifiziert werden. Inwieweit sich die veränderte Genexpression tatsächlich in den Proteinprodukten widerspiegelt, sollte für einige Gene mittels proteinbiochemischer Nachweismethoden ermittelt werden.

Mit Hilfe dieser Daten sollten dann die Gene im Kontext von zellulären Signalwegen und Genclustern bestimmt werden, deren Expression durch die Manipulation der Zellen beeinflusst wird.

## 2 Material

### 2.1 Geräte

7500 Real Time PCR	Life Technologies, Applied Biosystems, USA
Biofuge pico	Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland
Cary 1E UV-Visible Spektrophotometer	Varian Deutschland GmbH, Darmstadt
Coulter Counter Z1	Beckman Coulter Inc., Brea CA, USA
Einfrierboxen	Thermo Scientific, Nunc GmbH & Co. KG, Langensfeld, Deutschland
Equibio "EasyJet" Plus Electroporation System	Eurogentec Deutschland GmbH, Köln
FACSCalibur™	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Megafuge 1.0R	Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland
MilliQ Plus Ultra Pure Water System	Merck Millipore, Billerica, MA, USA
Mithras Multimode Reader LB940	Berthold Technologies GmbH & Co. KG, Bad Wildbad, Deutschland
MultiStand	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland
QuadroMACS™ Separator	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland
Sicherheitswerkbank	BDK Luft- und Reinraumtechnik, Sonnenbühl, Deutschland
Steri-cult 200 Inkubator	Thermo Scientific, Deutschland
Thermomixer comfort	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Vortex Genie™	Bender & Hobein AG, Bruchsal, Deutschland
Wasserbad	GFL GmbH, Burgwedel, Deutschland
Thermocycler	Biometra, Göttingen, Deutschland
Vakuumpumpe	Vacuubrand GmbH, Deutschland
Plattenschüttler Titramax 100	Heidolph GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland
BIO-RAD Mini Sub® Cell GT	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
BIO-RAD PowerPac 200	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Zellkultur Inkubator	Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland
Kühlzentrifuge, Biofuge fresco	Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland
Feinwaage	Satorius AG, Göttingen, Deutschland

## 2.2 Verbrauchsmaterialien

Präparationsfilter (30 µm)	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland	Cat. No. 130-041-407
100 mm Zellkulturschalen	Corning Life Science, Corning NY, USA	Cat. No. 2396
96-well Mikrotiterplatten (Flachboden)	Thermo Scientific, Deutschland	Cat. No. 269620
MicroAmp® optische 96-well Reaktion Platte	Life Technologies, Applied Biosystems, USA	Cat. No. N8010560
Sterile Spritzen 50 ml	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland	Cat. No. T552.1
0.22 µm Sterilfilter	Corning Life Science, Corning NY, USA	Cat. No. 431219
Sterile Filterpipettenspitzen	Sorenson Bioscience Inc., Salt Lake City, UT, USA	Cat. No. 28200 Cat. No. 15020 Cat. No. 36060 Cat. No. 30510 Cat. No. 14200
6-well Platten	SPL Life Science Inc., Korea	Cat. No. 30004
0,5 bzw. 1,5 ml Safe-Lock Reaktionsgefäße	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland	Cat. No. 0030 123.301 Cat. No. 0030 123.328
Serologische Pipetten 2, 5, 10, 25 ml	Corning Life Science, Corning NY, USA	Cat. No. 4021 Cat. No. 4051 Cat. No. 4101 Cat. No. 4251
4 mm Elektroporationsküvetten	Eurogentec Deutschland GmbH, Köln	Cat. No. CE-0004-50
LS Columns (MACS)	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland	Cat. No. 130-042-401
50 ml konische Zentrifugenröhrchen	SPL Life Science Inc., Korea	Cat. No. 50050
15 ml konische Zentrifugenröhrchen	SPL Life Science Inc., Korea	Cat. No. 50015
5 ml Röhrchen	VWR, West Chester, USA	Cat. No. 60818292
75 cm <sup>2</sup> Zellkulturflaschen	SPL Life Science Inc., Korea	Cat. No. 70075
175 cm <sup>2</sup> Zellkulturflaschen	SPL Life Science Inc., Korea	Cat. No. 71175
2er Zellkulturstacks (1.271 cm <sup>2</sup> )	Corning Life Science, Corning NY, USA	Cat. No. 3269
Kryoröhrchen	Thermo Scientific, Nunc GmbH & Co. KG, Langenselbold, Deutschland	Cat. No. 10577391
96-well Mikrotiterplatten mit Filter	Corning Life Science, Corning NY, USA	Cat. No. 3511

## 2.3 Chemikalien

Aqua Spül Lösung (Ampuwa®)	Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland	Cat. No. 7151-5
RNAzol® RT	Molecular Research Center, Cincinnati, OH, USA	Cat. No. RN190
Ethanol absolut	AppliChem, Darmstadt, Deutschland	Cat. No. A3678
Propidiumiodid (1 mg/ml)	Sigma Aldrich, St. Gallen, Schweiz	Cat. No. P4864
FACSRinse™	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland	Cat. No. 340346
FACSClean™	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland	Cat. No. 340345
FACSFlow™	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland	Cat. No. 342003
Bovines Serum Albumin	Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland	Cat. No. 8076.3
Dithiothreitol (DTT)	Life Technologies, Invitrogen, USA	Cat. No. P2325
7-AAD	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland	Cat. No. 559925
Formaldehyd	Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland Roth	Cat. No. 4979.1
Schwefelsäure (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	Cat. No. X945.1
MOPS (pH 7)	Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland	Cat. No. 6979.4
Natriumacetat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	Cat. No. 1.0628.1000

## 2.4 Medien und Zusätze

Fetales Kälberserum (FCS), hitze-inaktiviert	Linaris GmbH, Dossenheim, Deutschland	Cat. No. SBF3111YK
Penicillin/ Streptomycin 10000 U/ml	Lonza, Basel, Schweiz	Cat. No. DE17-6025
D-Glucose (45 %)	Sigma-Aldrich, St. Gallen, Schweiz	Cat. No. G8769
Natriumbikarbonat (7,5 %)	Lonza, Basel, Schweiz	Cat. No. BE 17-613
L-Glutamin (200 mmol/l)	Lonza, Basel, Schweiz	Cat. No. BE 17-605
10 x Trypsin/EDTA	Lonza, Basel, Schweiz	Cat. No. BE02-007E
DPBS ohne Ca <sup>2+</sup> und Mg <sup>2+</sup>	Lonza, Basel, Schweiz	Cat. No. BE17-512F
Leibovitz's L-15 Medium	Lonza, Basel, Schweiz	Cat. No. BE12-700F
MEM Vitamine (100x)	Lonza, Basel, Schweiz	Cat. No. 13-607C
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland	Cat. No. D2650
EDTA	Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland	Cat. No. 8043.2

Natriumchlorid (NaCl)	Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland	Cat. No. 3957.3
Tris-HCl	Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland	Cat. No. 9090.3

## 2.5 Lösungen, Puffer und Kits

### 2.5.1 Zellkultivierung

Normalmedium	10 %	FCS
	1 %	Pen/ Strep 10000 U/ml
	1,5 %	Natriumbicarbonat (7,5 %)
	1 %	MEM Vitamine
	0,5 %	L-Glutamin
	0,25 %	D-Glucose
		in L-15 Medium
FACS-PBS		DPBS
	2 %	FCS
TNE (Tris-Natrium-EDTA)	40 mM	Tris-HCl pH7.5
	1 mM	EDTA
	150 mM	NaCl
Einfriermedium	80 %	Normalmedium
	10 %	FCS
	10 %	DMSO

### 2.5.2 Zellseparation mit MACS® Zell-Separationssystem

Dead Cell Removal Kit	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland	Cat. No. 130-090-101
Anti-FITC MultiSort Kit	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland	Cat. No. 130-058-701
CD154 MicroBead Kit (human)	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland	Cat. No. 130-092-658
MACS-Puffer	1 x	DPBS
	2 %	FCS
	2 mM	EDTA

Bindungspuffer	Aqua Spül Lösung
	5 % 20 x Binding Buffer

### 2.5.3 ELISA

Duoset ELISA human IL7	R&D Systems Inc., Minneapolis, MN USA	Cat. No. DY207
Duoset ELISA human GM-CSF	R&D Systems Inc., Minneapolis, MN USA	Cat. No. DY215
Duoset ELISA human MIP-3 $\alpha$	R&D Systems Inc., Minneapolis, MN USA	Cat. No. DY360
Color Reagent	R&D Systems Inc., Minneapolis, MN USA	Cat. No. DY999
HRP-Lösung (Meerrettich-Peroxidase-Lösung)	R&D Systems Inc., Minneapolis, MN USA	Cat. No. 890803
Waschpuffer	1 x DPBS	
	0,05 % TWEEN 20	
Stopplösung	2 N H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	
Reagent Diluents'	1 x DPBS	
	1 % BSA	
	steril filtriert	
Substrat-Lösung	50 % Color Reagent A (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	
	50 % Color Reagent B (Tetramethylbenzidin)	

### 2.5.4 Bead Array

Flow Cytomix Basic Kit	Bender MedSystems GmbH, Wien, Österreich	BMS8420FF
TNF- $\alpha$ Simplex Kit	Bender MedSystems GmbH, Wien, Österreich	BMS8223FF
RANTES Simplex Kit	Bender MedSystems GmbH, Wien, Österreich	BMS8287FF
Il-6 Simplex Kit	Bender MedSystems GmbH, Wien, Österreich	BMS8213FF
Il-8 Simplex Kit	Bender MedSystems GmbH, Wien, Österreich	BMS8204FF
MCP-1 Simplex Kit	Bender MedSystems GmbH, Wien, Österreich	BMS8281FF
IP-10 Simplex Kit	Bender MedSystems GmbH, Wien, Österreich	BMS8284FF

SA-PE Lösung	2,5 %	SA-PE (Streptavidin-Phycoerythrin-Konzentrat) in Assay Puffer
Assay Puffer	10 %	10 x Assay Puffer (10 % BSA in PBS) in Aqua Spül Wasser
Reagent Dilution Puffer		Ready to use

### 2.5.5 Molekularbiologische Materialien

Taqman Universal PCR Master Mix		Life Technologies, Applied Biosystems, USA	Cat. No. 4324020
SuperScript™ II Reverse Transcriptase		Life Technologies, Invitrogen, USA	Cat. No. 18064-022
Taqman® Universal PCR Mix, no AmpErase® UNG		Life Technologies, Applied Biosystems, USA	Cat. No. 4324018
2 x Loading Dye (RNA)		Thermo Scientific, Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland	Cat. No. R0641
Random Hexamer Primer		Thermo Scientific, Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland	Cat. No. S0142
RNA-Marker		Thermo Scientific, Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland	Cat. No. SM1821
RNase out		Life Technologies, Invitrogen, USA	Cat. No. 10777-019
dNTP 10 mM each		Roche Holding GmbH, Grenzach Wyhlen, Deutschland	Cat. No. 03622614001
10 x MOPS RNA-Gelelektrophorese Puffer	200 mM	MOPS (pH 7)	
	50 mM	Natriumacetat	
	10 mM	EDTA	
1 x MOPS RNA-Gelelektrophorese Puffer	100 ml	10 x MOPS RNA-Gelelektrophorese Puffer	
	20 ml	Formaldehyd (37 %)	
	880 ml	Aqua Spül Lösung	
RNA-Gel (100 ml)	1,2 g	Agarose	
	10 ml	10 x MOPS RNA-Gelelektrophorese Puffer	
	90 ml	Aqua Spül Lösung	
	1,7 ml	Formaldehyd (37 %, nach dem Aufkochen dazugeben)	



## 2.6 Zelllinie

Die im Rahmen dieses Projektes verwendete Zelllinie B25-MOL-1 wurde von Mitarbeitern der Firma Mologen AG aus Patientenmaterial etabliert und wird im Folgenden als B25-MOL bezeichnet. Sie stammt ursprünglich von einer Biopsie eines Nierenzellkarzinoms einer Frau kaukasischer Abstammung.

## 2.7 Software

MS Office 2007/2010		Microsoft Corporation®, USA
FlowJo 8.8.4		Tree Star Inc., Ashland, OR, USA
Sequence Detection Software 1.4		Life Technologies, Applied Biosystems, USA
Bioconductor R Version 2.13.0		The R Foundation for Statistical Computing (www.r-project.com)
oneChannelGUI	R Paket	R. A. Calogero, Bioinformatics and Genomics Unit, Dept. of Clinical and Biological Sciences Torino, Italy
FlowCytomix™ Pro Software		eBioscience, San Diego CA, USA
PrimerExpress 3.0		Life Technologies, Applied Biosystems, USA
DAVID Bioinformatics Resources 6.7		National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID), NIH, USA
Multi Experiment Viewer 4.9.0		TM4 Software Suite (Saeed et al., 2003)

## 2.8 Antikörper

FITC Mouse Anti-Human CD80 (mouse IgG1)	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland	Cat. No. 557226
APC Mouse Anti-Human CD154 (mouse IgG1)	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland	Cat. No. 55702
Human CD80 (B7-1) Antibody Biotin (mouse IgG1)	eBioscience, San Diego, CA, USA	Cat. No. 13-0809
Human CD227 (Mucin-1) Antibody Alexa Fluor® 488 (mouse IgG1)	eBioscience, San Diego, CA, USA	Cat. No. 53-9893
PE Mouse Anti-Human CD40 (mouse IgG1)	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland	Cat. No. 555589
CD54-FITC conjugated Antibody (mouse IgG1)	Beckman Coulter Comp., Marseille Cedex 9, Frankreich	Cat. No. PN IM0726U
Anti-Human CD95- FITC (mouse IgG1)	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland	Cat. No. 555673
Human c-Met (HGF Receptor) Antibody FITC (mouse IgG1)	eBioscience, San Diego, CA, USA	Cat. No. 11-8858-41
Anti-Human HLA-ABC Antigen/ RPE (mouse IgG2a)	Dako Denmark A/S, Glostrup, Dänemark	Cat. No. R7000

PE Mouse Anti-Human EGFR (mouse IgG2b)	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland	Cat. No. 555997
PE Mouse Anti-Human CD275 (mouse IgG2b)	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland	Cat. No. 552502
FITC Mouse IgG1 (Isotypkontrolle)	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland	Cat. No. 555748
PE Mouse IgG1 (Isotypkontrolle)	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland	Cat. No. 550617
APC Mouse IgG1 (Isotypkontrolle)	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland	Cat. No. 555751
PE Mouse IgG2a (Isotypkontrolle)	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland	Cat. No. 555574
PE Mouse IgG2b (Isotypkontrolle)	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland	Cat. No. 555573
Streptavidin-APC	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland	Cat. No. 554067

## 2.9 Primer und Sonden für Taqman® qPCR

Alle Primer und Sonden werden unter Verwendung des PrimerExpress 3.0 (Applied Biosystems) entworfen und von der Firma Microsynth (Landau) bezogen.

**Tabelle 2.1 Oligonukleotidprimer und Sonden**

fwd – forward Primer; rev – reverse Primer; Probe – Sonde; FAM – 6-Carboxy-Fluorescein; TAMRA – 6-Carboxy-Tetramethylrhodamin

Bezeichnung	Sequenz (5' – 3')	5' Mod.	3' Mod.	Finale Konzentration
AURKA-RNA-fwd	TCTTCCAGGAGGACCACTCTCT			300 nM
AURKA-RNA-rev	TGCATCCGACCTTCAATCATT			300 nM
AURKA-RNA-Probe	CACCCTGGACTACCTGCCCCCTG	FAM	TAMRA	200 nM
GIN51-RNA-fwd	TCGACGCTGCACTGTAGCAT			300 nM
GIN51-RNA-rev	CGCTACCATATTCCCATCTGAGT			300 nM
GIN51-RNA-Probe	CCTGTATGACCGCTTGCTTCGGATCA	FAM	TAMRA	200 nM
CCNA2-RNA-fw	CTGCTCCAACAGTAAATCAGTTTCTT			300 nM
CCNA2-RNA-rev	CTTAATTCTCCCAAAAACATTGCTAA			300 nM
CCNA2-RNA-Probe	CCCAATACTTTCTGCATCAGCAGCCTG	FAM	TAMRA	200 nM
CENPE-RNA-fw	CCAGATTAAGAAGCTACAGGAATACATAGA			150 nM
CENPE-RNA-rev	GGCTACAGTTTCAGCATCAAACA			150 nM
CENPE-RNA-Probe	CATTGGAAAGCATTGAAGACCCAAAACAAA	FAM	TAMRA	200nM
EGFR-RNA-fw	CCAGAAACTGACCAAAATCATCTG			300 nM
EGFR-RNA-rev	CCTGCAGCACACTGGTTGTG			300 nM

Bezeichnung	Sequenz (5' – 3')	5' Mod.	3' Mod.	Finale Konzentration
EGFR-RNA-Probe	CTGCCGTGGCAAGTCCCCCA	FAM	TAMRA	200 nM
HLAG-RNA-fw	CACGCACAGACTGACAGAATGAA			300 nM
HLAG-RNA-rev	AACTGGCCTCGCTCTGGTT			300 nM
HLAG-RNA-Probe	TGCAGACCCTGCGCGGCTACT	FAM	TAMRA	200 nM
ICOSLG-RNA-fw	GCTGATACTCAGGAGAAGGAAGTCA			300 nM
ICOSLG-RNA-rev	GACTCACTGGTTTGCCAATATACG			300 nM
ICOSLG-RNA-Probe	AGCTCAGCTGCGCTTGCCCTGA	FAM	TAMRA	200 nM
POLE2-RNA-fw	GAAGATCAAGTGTTTCATGTCAATGC			300 nM
POLE2-RNA-rev	CACAGATGTATTAGAAGGACCTCCAA			300 nM
POLE2-RNA-Probe	TGGATTTCCACCCACTGAGCCCTCTAGTA	FAM	TAMRA	200 nM

## 2.10 Taqman® Gene Expression Assays

Für die Custom-made Taqman® Gene Expression Array Plate werden die in Tabelle 2.2 aufgeführten Taqman Gene Expression Assays bei der Firma Applied Biosystems (Life Technologies) bestellt. Geliefert wird eine 96-well Reaktionsplatte, in der die entsprechenden Primer und Sonden lyophilisiert vorliegen.

Tabelle 2.2 Taqman Gene Expression Assay (Applied Biosystems)

Assay ID	Gensymbol	Beschreibung
Hs01101127_m1	ANGPTL4	angiopoietin-like 4
Hs00559441_m1	APAF1	apoptotic peptidase activating factor 1
Hs01066280_m1	APOL1	apolipoprotein L, 1
Hs00188713_m1	BAG3	BCL2-associated athanogene 3
Hs00708019_s1	BCL2L11	BCL2-like 11 (apoptosis facilitator
Hs00609632_m1	BID	BH3 interacting domain death agonist
Hs00357350_m1	BIRC2	baculoviral IAP repeat containing 2
Hs00977611_g1	BIRC5	baculoviral IAP repeat containing 5
Hs00203383_m1	HIG-2 (C7orf68)	chromosome 7 open reading frame 68
Hs00154242_m1	CASP2	caspase 2, apoptosis-related cysteine peptidase
Hs00154250_m1	CASP6	caspase 6, apoptosis-related cysteine peptidase
Hs01594281_m1	CASP8AP2	caspase 8 associated protein 2
Hs00234140_m1	CCL2	chemokine (C-C motif) ligand 2

Assay ID	Gensymbol	Beschreibung
Hs01011368_m1	CCL20	chemokine (C-C motif) ligand 20
Hs00219797_m1	CCL28	chemokine (C-C motif) ligand 28
Hs00174575_m1	CCL5	chemokine (C-C motif) ligand 5
Hs00765553_m1	CCND1	cyclin D1, Gene hCG2016647 Celera Annotation
Hs99999080_m1	CCR7	chemokine (C-C motif) receptor 7
Hs99999100_s1	CD40	CD40 molecule, TNF receptor superfamily member 5
Hs00163934_m1	CD154	CD154 molecule (CD40 ligand)
Hs01075861_m1	CD44	CD44 molecule (Indian blood group)
Hs01560662_m1	CD58	CD58 molecule
Hs00174297_m1	CD70	CD70 molecule
Hs00175478_m1	CD80	CD80 molecule
Hs01023894_m1	CDH1	cadherin 1, type 1, E-cadherin (epithelial)
Hs00989783_m1	CEACAM1	carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1
Hs01116280_m1	CFLAR	CASP8 and FADD-like apoptosis regulator
Hs99999084_m1	CSF1	colony stimulating factor 1 (macrophage)
Hs00929873_m1	CSF2	colony stimulating factor 2 (granulocyte-macrophage)
Hs00171086_m1	CX3CL1	chemokine (C-X3-C motif) ligand 1
Hs00236937_m1	CXCL1	chemokine (C-X-C motif) ligand 1 (melanoma growth stimulating activity, alpha)
Hs01124251_g1	CXCL10	chemokine (C-X-C motif) ligand 10
Hs00222859_m1	CXCL16	chemokine (C-X-C motif) ligand 16
Hs00601975_m1	CXCL2	chemokine (C-X-C motif) ligand 2
Hs00607029_g1	CXCL5	chemokine (C-X-C motif) ligand 5
Hs00234489_m1	DAPK1	death-associated protein kinase 1
Hs00370206_m1	DEDD2	death effector domain containing 2
Hs00171656_m1	EPHA2	EPH receptor A2
Hs01001580_m1	ERBB2	v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2
Hs00531110_m1	FAS	Fas (TNF receptor superfamily, member 6)
Hs99999173_m1	GADD45A	growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha
Hs00168325_m1	GUCY1A3	guanylate cyclase 1, soluble, alpha 3
Hs01058806_g1	HLA-A	major histocompatibility complex, class I, A
Hs00741005_g1	HLA-B	major histocompatibility complex, class I, B
Hs00740298_g1	HLA-C	major histocompatibility complex, class I, C

Assay ID	Gensymbol	Beschreibung
Hs03045171_m1	HLA-E	major histocompatibility complex, class I, E
Hs01587837_g1	HLA-F	major histocompatibility complex, class I, F
Hs00365950_g1	HLA-G	major histocompatibility complex, class I, G
Hs00359147_s1	HSPA1A, HSPA1B	heat shock 70kDa protein 1A, heat shock 70kDa protein 1B
Hs00164932_m1	ICAM1	intercellular adhesion molecule 1
Hs00168405_m1	IL12A	interleukin 12A (natural killer cell stimulatory factor 1, cytotoxic lymphocyte maturation factor 1, p35)
Hs00233688_m1	IL12B	interleukin 12B (natural killer cell stimulatory factor 2, cytotoxic lymphocyte maturation factor 2, p40)
Hs00174131_m1	IL6	interleukin 6 (interferon, beta 2)
Hs99999033_m1	IL7	interleukin 7
Hs99999034_m1	IL8	interleukin 8
Hs00241497_m1	KITLG	KIT ligand
Hs01055668_m1	LIF	leukemia inhibitory factor (cholinergic differentiation factor)
Hs01123581_m1	LIFR	leukemia inhibitory factor receptor alpha
Hs00607097_m1	MAGEA1	melanoma antigen family A 1
Hs00366532_m1	MAGEA3	melanoma antigen family A 3
Hs01565584_m1	MET	met proto-oncogene (hepatocyte growth factor receptor)
Hs00792952_m1	MICB	MHC class I polypeptide-related sequence B
Hs00159357_m1	MUC1	mucin 1, cell surface associated
Hs03037952_m1	NAIP	NLR family, apoptosis inhibitory protein
Hs00196101_m1	NDC80	NDC80 homolog, kinetochore complex component
Hs00765730_m1	NFKB1	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1
Hs00174517_m1	NFKB2	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 2 (p49/p100)
Hs00153283_m1	NFKBIA	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha
Hs00182115_m1	NFKBIB	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, beta
Hs00234431_m1	NFKBIE	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, epsilon
Hs00765634_m1	PLIN2	perilipin 2, ADFP
Hs00560402_m1	PMAIP1	phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1
Hs00231279_m1	REL	v-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog
Hs00153294_m1	RELA	v-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog A
Hs00232399_m1	RELB	v-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog B
Hs00180054_m1	RGS2	regulator of G-protein signaling 2, 24kDa
Hs01572686_m1	RIPK2	receptor-interacting serine-threonine kinase 2

Assay ID	Gensymbol	Beschreibung
Hs00388675_m1	TAP1	transporter 1, ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP)
Hs99999022_m1	TERT	telomerase reverse transcriptase
Hs01014511_m1	TLR2	toll-like receptor 2
Hs99999043_m1	TNF	tumor necrosis factor
Hs00269491_m1	TNFRSF10A	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10a
Hs00366278_m1	TNFRSF10B	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10b
Hs01042313_m1	TNFRSF1A	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1A
Hs00205419_m1	TNFRSF21	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 21
Hs00155512_m1	TNFRSF9	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 9
Hs00921974_m1	TNFSF10	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10
Hs00610488_m1	TP53BP2	tumor protein p53 binding protein 2
Hs00225909_m1	ULBP3	UL16 binding protein 3
Hs01003372_m1	VCAM1	vascular cell adhesion molecule 1
Hs99999901_s1	18S	eukaryotic 18S rRNA
Hs99999905_m1	GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
Hs99999908_m1	GUSB	glucuronidase, beta
Hs99999909_m1	HPRT1	hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1

## 2.11 Vektoren

Für die Herstellung der Wirkstoffzellen aus den nativen B25-MOL-Zellen werden vier verschiedene MIDGE®-DNA-Vektoren (*minimalistic, immunologically defined gene expression*) verwendet, welche in der folgenden Tabelle 2.3 aufgelistet sind.

**Tabelle 2.3 MIDGE®-DNA-Vektoren**

Bezeichnung	Molmasse (g/mol)	Länge (bp)	Beschreibung
MOK-hCD80-M	1,27E+06	2057	kodiert humanes CD80-Molekül, MIDGE-Vektor, CMV-Promotor
MOK-hCD154-M	1,30E+06	1976	kodiert humanes CD154-Molekül, MIDGE-Vektor, CMV-Promotor
MOK-hIL7-M	1,10E+06	1724	kodiert humanes Interleukin 7, MIDGE-Vektor, CMV-Promotor
MOK-hGM-CSF-M	1,06E+06	1625	kodiert humanes GM-CSF, MIDGE-Vektor, CMV-Promotor

MIDGE®-DNA-Vektoren sind lineare, kovalent geschlossene DNA-Moleküle, die von der Mologen AG entwickelt und vermarktet werden. Sie enthalten eine Expressionskassette, bestehend aus Promotor, den kodierenden Genabschnitten (Exons) und der Poly-Adenin-Nukleotidkette, flankiert von zwei kurzen Haarnadel-Nukleotidmolekülen (Abbildung 2.1). Andere sonst obligate Vektorbestandteile sind hier auf ein Minimum reduziert, wodurch die MIDGE®-DNA-Vektoren gegenüber DNA-Plasmiden einige Vorteile aufweisen. Im Gegensatz zu den Plasmiden besitzen sie keine prokaryotischen Gene oder Steuerungselemente, wie Antibiotika-Resistenzgene oder einen Replikationsursprung. Aus diesem Grund sind die MIDGE®-DNA-Vektoren im Vergleich zu den DNA-Plasmiden deutlich kleiner. Durch das Verzicht auf diese Vektorbestandteile, welche in der Regel dem Herstellungsprozess dienen, können außerdem unerwünschte Wirkungen unterbunden werden, da einige dieser Bestandteile als starke Antigene wirken und eine Immunreaktion auslösen können (Schakowski et al., 2001).



**Abbildung 2.1** Schematische Darstellung eines MIDGE®-Vektors

Minimalistischer, linearer, kovalent geschlossener Vektor mit CMV-Promotor, Transgen und Poly-Adenylsequenz (Knäblein et al., 2005)

## 3 Methoden

### 3.1 Zellbiologische Methoden

#### 3.1.1 Kultivierung von B25-MOL-Zellen

Die Kultivierung der Zellen erfolgt in Inkubatoren bei einer konstanten Temperatur von 37°C, einer relativen Luftfeuchtigkeit von 90 % und in einer CO<sub>2</sub>-angereicherten Atmosphäre (5 %). Es werden Zellkulturflaschen mit beschichteter Bodenfläche unterschiedlicher Größe (75, 175, 1.271 cm<sup>2</sup>) zur Zellanzucht verwendet. Als Kulturmedium für die Tumorzelllinie B25-MOL wird Normalmedium auf der Basis von Leibovitz Medium L-15 verwendet (vgl. 2.4 Medien und Zusätze; S.27). Ein Mediumwechsel erfolgt mindestens zweimal pro Woche. Die Zellen werden regelmäßig mikroskopisch untersucht; erreichen die adhären Zellen in der Zellkulturflasche eine Konfluenz von über 90 % wird die Zellpopulation gesplittet. Hierzu wird das Medium entfernt und die Zellen einmal mit DPBS gewaschen. Anschließend werden die Zellen mit einer Trypsin-EDTA-Lösung benetzt und für 3 - 5 min bei 37°C inkubiert. Um die Einwirkzeit der Trypsin-EDTA-Lösung möglichst gering zu halten, wird das Ablösen der Zellen durch leichtes Klopfen gegen die Zellkulturflasche beschleunigt. Wenn sich die Zellen vom Untergrund gelöst haben, wird der Suspension wieder Normalmedium zugesetzt, um die Wirkung des Trypsins auf die Zellen abzustoppen. Mit Hilfe eines Coulter Counter Z1 wird die Gesamtzellzahl dieser Zellsuspension bestimmt. Anschließend werden die Zellen in einer Dichte von  $2 - 3 \times 10^4$  Zellen/cm<sup>2</sup> in neue Zellkulturflaschen in frischem Normalmedium ausgelegt und unter Kultivierungsbedingungen inkubiert (37°C, 5 % CO<sub>2</sub>, 95 % Luftfeuchtigkeit).

#### 3.1.2 Auftauen von Zellen

Für die Neukultivierung von Zellen werden kryokonservierte Zellen dem Stickstofftank entnommen und im Wasserbad bei 37°C aufgetaut. Im Anschluss daran werden die Zellen so schnell wie möglich in 5 – 10 ml Normalmedium aufgenommen und abzentrifugiert (300 × g, 3 min). Durch das Abnehmen des Überstandes kann eine Schädigung der Zellen durch eine zu hohe DMSO-Konzentration vermieden werden. Anschließend werden die Zellen in frischem Normalmedium resuspendiert, in Zellkulturflaschen ausgesät und unter Kultivierungsbedingungen inkubiert (37°C, 5 % CO<sub>2</sub>, 95 % Luftfeuchtigkeit).



### 3.1.3 Kryokonservierung von Zellen

Zur Kryokonservierung der Zellen werden diese zunächst gezählt und für 3 min bei  $300 \times g$  abzentrifugiert. Anschließend werden die Zellen in einem definierten Volumen Einfriermedium (vgl. 2.4 Medien und Zusätze; S. 27) aufgenommen, so dass eine Zelldichte von etwa  $1 \times 10^7$  Zellen/ml erreicht wird. Die Zellsuspension wird in Kryoröhrchen gefüllt und anschließend in spezielle Einfrierboxen überführt, in denen die Zellen mit einem Temperaturgradienten von  $1 \text{ }^\circ\text{K}$  pro Minute auf  $-80^\circ\text{C}$  heruntergekühlt werden. Nach zwei Tagen können die Kryoröhrchen zur Langzeitlagerung von  $-80^\circ\text{C}$  in einen mit Stickstoff gefüllten Tank überführt werden.

### 3.1.4 Gentransfer mittels Elektroporation

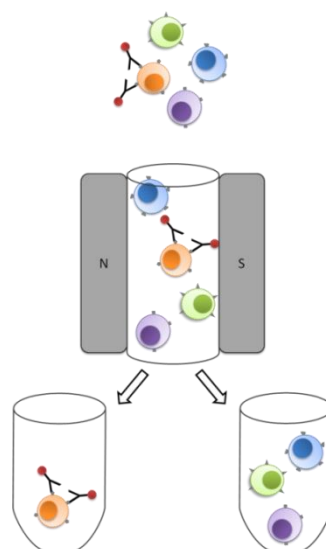
Für den Transfer der MIDGE®-DNA-Vektoren in die B25-MOL-Zellen wird die Elektroporation verwendet, eine einfache und gut reproduzierbare Methode, um DNA-Moleküle in lebende Zellen einzuschleusen. Dabei werden die Zellen einem elektrischen Feld ausgesetzt, was zu einer verstärkten, transient veränderten Membranpermeabilität führt, wodurch die DNA in die Zelle gelangen kann. Dazu werden B25-MOL-Zellen verwendet, die in den Zellkulturflaschen eine Konfluenz von 90 - 100 % aufweisen. Für das Abarbeiten der adhärennten Zellen wird zunächst das Medium abgenommen und die Zellen mit DPBS gewaschen. Das Ablösen erfolgt analog dem unter „3.1.1 Kultivierung von B25-MOL-Zellen“ beschriebenen Verfahren. Nach der Bestimmung der Zellzahl, werden die Zellen abzentrifugiert ( $300 \times g$ , 3 min) und in einem definiertem Volumen Transfektionsmedium (L-15 Medium ohne Zusätze) aufgenommen. In 1,5 ml Reaktionsgefäße wird jeweils die zu transfizierende DNA vorgelegt. Dazu wird ein definiertes Volumen der Zellsuspension (500  $\mu\text{l}$ ) gegeben, mit der vorgelegten DNA gemischt und anschließend bei RT für 10 min inkubiert. Der gesamte Ansatz wird dann in eine Elektroporationsküvette überführt und unter festgelegten Bedingungen (270 V, 1200  $\mu\text{F}$ ) elektroporiert. Anschließend werden die Zellen in eine vorbereitete Zellkulturschale mit Normalmedium überführt und bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert.

### 3.1.5 Anreichern transfizierter Zellen mittels paramagnetischer Zellseparation

Trotz Optimierung entscheidender Parameter der Transfektionsmethode und einer guten Reproduzierbarkeit der Elektroporationsergebnisse kann keine einheitliche Population an vierfach transfizierten Zellen generiert werden. Dies macht eine Anreicherung der transfizierten Zellpopulation erforderlich, bevor diese der RNA-Extraktion zugeführt werden

kann. Mit Hilfe dieses Prozesses soll eine möglichst reine Population an lebenden, mehrfach transfizierten Zellen isoliert werden. Für die Anreicherung von lebenden transfizierten Zellen wird das MACS® Zell-Separationssystem (Miltenyi Biotec) verwendet.

Die MACS® Technologie basiert auf der Verwendung von paramagnetischen Mikrosphären (*microbeads*, ca. 50 nm Durchmesser), die direkt bzw. indirekt an spezifische Oberflächenstrukturen/ -antigene der Zellen binden. Die Separation der Microbead-gebundenen Zellen erfolgt in speziellen mit Stahlkügelchen gefüllten MACS®-Säulen, in denen mit Hilfe des MACS®-Separators ein Magnetfeld induziert wird. Dieses ist stark genug, um die Microbead-gebundenen Zellen in der Säule zurückzuhalten, während die nicht markierten Zellen die Säule ungehindert passieren können. Nach dem Entfernen der MACS®-Säule aus dem magnetischen Feld, können auch die Microbead-gebundenen Zellen aus der Säule ausgespült und aufgefangen werden (Abbildung 3.1). Da die Microbeads, nach den Angaben des Herstellers die Vitalität, Struktur, Funktion und Aktivität der Zellen nicht beeinflussen, wird ein Einfluss auf Folgeversuche ausgeschlossen (*MACS® Technology Gold standard in cell separation*). Entsprechend können die Microbead-gebundenen Zellen, wie auch die nicht markierten Zellen, in sich an die Separation anschließenden Versuchen verwendet werden.



**Abbildung 3.1 Prinzip der paramagnetischen, positiven Zellseparation (MACS®)**

Die positive Zellseparation stellt eine hoch spezifische Methode zur Isolation von Zielzellen aus einer heterogenen Zellsuspension dar. Spezifische Antikörper, die an die Microbeads (rote Sphären) gebunden sind, interagieren mit bestimmten Oberflächenmolekülen oder indirekt mit bereits gebundenen Antikörpern, ohne dass sie die Vitalität oder Funktion der Zellen beeinflussen. Die so markierten Zellen verbleiben in einer, mit Stahlkügelchen gefüllten Säule, die in einem paramagnetischen Feld positioniert ist, während nicht markierte Zellen sich ungehindert durch die Säule bewegen. Die in der Säule verbleibenden Zellen werden in einem anschließenden Elutionsschritt, außerhalb des magnetischen Feldes, ausgespült. So können beide Zellpopulationen effektiv voneinander getrennt werden.

### **3.1.5.1 Eliminierung der toten Zellen**

Die Zellen sind bei der Elektroporation, der Bestrahlung und dem Auftauprozess großem Stress ausgesetzt, entsprechend ist der Anteil an toten bzw. apoptotischen Zellen relativ hoch. Da tote und apoptotische Zellen unspezifisch an die Microbeads binden können, ist es notwendig, zunächst die lebenden von den toten Zellen zu trennen. Hierzu wird der „Dead Cell Removal Kit“ (Miltenyi Biotec) verwendet. Dabei werden aus dem Ansatz gezielt die toten und apoptotischen Zellen sowie Zelltrümmer depletiert; dies geschieht mit Hilfe von Microbeads, die an ein spezifisches Antigen (vom Hersteller nicht näher benannt) in der Zellmembran von apoptotischen bzw. toten Zellen binden.

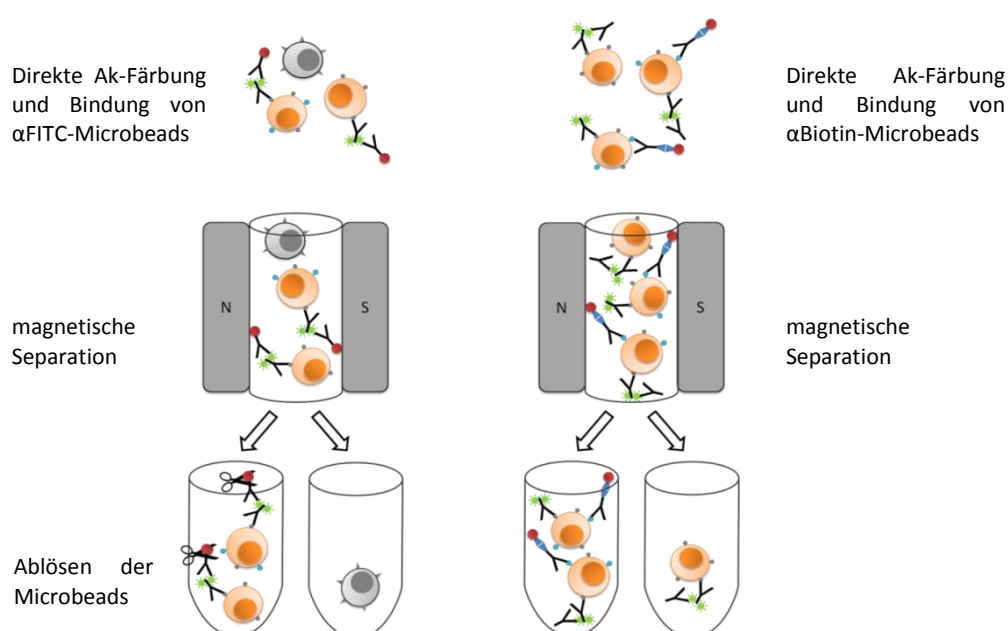
Zunächst werden die geernteten Zellen dreimal mit 10 ml DPBS und einmal in 250  $\mu$ l 1  $\times$  Bindungspuffer gewaschen und abzentrifugiert (3 min, 300  $\times$  g, Tischzentrifuge). Jeweils 1  $\times$  10<sup>7</sup> Zellen werden in 100  $\mu$ l „Dead Cell Removal Microbeads“ resuspendiert und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wird die Zellsuspension mit 1  $\times$  Bindungspuffer auf ein Volumen von 500  $\mu$ l aufgefüllt und auf eine MACS<sup>®</sup>-Säule gegeben, die zur Equilibrierung zuvor einmal mit MACS<sup>®</sup>-Puffer gespült wurde. Die toten und apoptotischen Zellen sowie Zelltrümmer werden auf Grund der gebundenen Microbeads in der Matrix der MACS<sup>®</sup>-Säule zurückgehalten, während die lebenden Zellen die Säulenmatrix passieren und als Durchfluss aufgefangen werden. Die Säulenmatrix wird nach dem Passieren der Zellsuspension mit insgesamt 1,5 ml 1  $\times$  Bindungspuffer gespült. Dieser Durchfluss wird ebenfalls der Lebendzellfraktion zugeführt.

### **3.1.5.2 Anreichern der CD80 und CD154 exprimierenden Zellen**

Die Anreicherung der transfizierten Zellen erfolgt auf der Basis der Expression der beiden Oberflächenantigene CD80 und CD154 mit Hilfe des „Anti-FITC MultiSort Kit“ (Miltenyi Biotec), sowie des „CD154 Microbead Kit“ (Milteyi Biotec).

Das Prinzip des „Anti-FITC MultiSort Kit“ beruht auf einer indirekten magnetischen Markierung der Zellen, die es erlaubt Zellen nacheinander auf spezifische Oberflächenantigene zu sortieren. Das Ergebnis dieser Prozedur ist eine nahezu reine Population lebender Zellen, welche beide Oberflächenantigene exprimieren. Dabei erfolgt zunächst die Markierung des ersten Oberflächenantigens (CD80) mit Hilfe eines FITC-konjugierten  $\alpha$ CD80 Antikörpers, gefolgt von der magnetischen Markierung mit  $\alpha$ FITC Multisort Microbeads, speziellen Microbeads, die gegen FITC gerichtet sind. Im magnetischen Feld der Säulenmatrix werden ausschließlich die Zellen zurückgehalten, welche an die paramagnetischen Microbeads gebunden sind, was zu einer Anreicherung der FITC-markierten Zellen führt. Diese werden

nach einem intensiven Waschschrift und dem Entfernen der Säule aus dem magnetischen Feld von der Säulenmatrix eluiert. Die an die Zellen gebundenen paramagnetischen Microbeads werden anschließend unter Verwendung des „Multisort Release Reagent“ und des „Multisort Stop Reagent“ von den Zellen abgelöst. So wird eine zweite magnetische Markierung und Separation der Zellen auf ein weiteres Oberflächenantigen (CD154) ermöglicht. Hierzu wird das „CD154 Microbead Kit“ (Miltenyi Biotec) verwendet. Dabei werden die Zellen zunächst mit einem Biotin-konjugiertem  $\alpha$ CD154 Antikörper markiert und anschließend mit  $\alpha$ -Biotin Microbeads markiert. Im magnetischen Feld der Säulenmatrix werden die CD154-positiven Zellen zurückgehalten und nach einem intensiven Waschschrift und dem Entfernen der Säule aus dem magnetischen Feld von der Säule eluiert (Abbildung 3.2).



**Abbildung 3.2 Anti-FITC Multi Sort Kit**

Als erstes erfolgt eine direkte Antikörperfärbung unter Anwendung eines FITC-konjugierten  $\alpha$ CD80 Antikörpers. An das FITC (grüne Markierung an den Antikörpern) binden im folgenden Schritt  $\alpha$ FITC-Microbeads (rote Sphären mit gebundenem Antikörper). Mittels paramagnetischer Separation und anschließender Elution der spezifisch gebundenen Zellen, werden die CD80-positiven Zellen von allen anderen getrennt. Mit Hilfe des „Multisort Release Reagent“ werden die gebundenen Microbeads von den Zellen abgetrennt (Schere). Anschließend werden die CD154-exprimierenden Zellen unter Verwendung eines Biotin-konjugierten  $\alpha$ CD154 Antikörpers markiert. Die paramagnetische Separation der CD154 positiven Zellen ermöglichen  $\alpha$ Biotin Microbeads. Letztlich erhält man eine Zellpopulation, die zu sehr hohen Anteilen sowohl CD80 als auch CD154 exprimiert.

Die Lebendzellfraktion wird zunächst abzentrifugiert (3 min,  $300 \times g$ ) und deren Zellzahl bestimmt. In allen folgenden Schritten beziehen sich Puffer- und Antikörpermengen auf die hier ermittelte Zellzahl. Jeweils  $1 \times 10^7$  Zellen werden in  $90 \mu\text{l}$  MACS®-Puffer aufgenommen,  $10 \mu\text{l}$   $\alpha$ CD80-FITC Antikörper hinzugegeben und 20 min bei  $4 - 8^\circ\text{C}$  inkubiert. Anschließend erfolgt ein Waschschrift; der Ansatz wird mit MACS®-Puffer auf 2 ml aufgefüllt und abzentrifugiert (3 min,  $300 \times g$ ). Die Zellen werden dann in  $90 \mu\text{l}$  MACS®-Puffer aufgenommen, mit  $10 \mu\text{l}$   $\alpha$ FITC-

Microbeads versetzt und für weitere 15 min bei 4 – 8°C inkubiert. Ungebundene Microbeads werden durch einen weiteren Waschschrift mit MACS®-Puffer entfernt und die Zellen schließlich in 500 µl MACS®-Puffer resuspendiert.

Die MACS®-Säule wird zunächst mit 4 - 8°C kalten MACS®-Puffer konditioniert (dreifaches Säulenvolumen) und im Magnetfeld eines VarioMACS® Separators positioniert. Die Zellsuspension wird über einen Nylon-Gaze-Filter (Pre-Separation Filter, Miltenyi Biotec) auf die Säule aufgetragen. Zellaggregate mit einer Größe von über 30 µm werden von diesem Filter zurückgehalten, um so einem Verschluss der Säule vorzubeugen. Zum Ausspülen nicht-markierter Zellen (CD80 negativ) wird die Säule dreimal mit jeweils 500 µl MACS®-Puffer gewaschen und der Durchfluss als Negativfraktion aufgefangen. Nach dem Entfernen der Säule aus dem magnetischen Feld werden weitere 1000 µl MACS®-Puffer auf die Säule gegeben und die Microbead-gebundenen Zellen unter Verwendung des mitgelieferten Stempels von der Säule eluiert. Im folgenden Schritt werden die magnetischen Microbeads von den Zellen enzymatisch gelöst; dazu wird die Zellsuspension mit 20 µl des „Multisort Release Reagent“ versetzt und anschließend für 10 min bei 4 – 8°C inkubiert. Dann werden die Zellen, wie oben beschrieben, gewaschen und dann in MACS®-Puffer in einer finalen Konzentration von  $1 \times 10^7$  Zellen pro 50 µl Puffer aufgenommen. Schließlich wird der Zellsuspension 30 µl „Multisort Stop Reagent“ pro  $1 \times 10^7$  Zellen zugesetzt und gemischt. Anschließend kann direkt mit der Markierung des zweiten Oberflächenantigens (CD154) fortgefahren werden. Dazu wird der (CD80<sup>+</sup>) Zellsuspension 10 µl αCD154-Biotin-Antikörper zugesetzt und 15 min bei 4 – 8°C inkubiert. Es folgt ein Waschschrift mit 2 ml MACS®-Puffer, bevor die Zellen in einem Volumen von 80 µl MACS®-Puffer und 20 µl αBiotin-Microbeads pro  $1 \times 10^7$  Zellen aufgenommen und für weitere 15 min bei 4 – 8°C inkubiert werden. Nach einem letzten Waschschrift, bei dem nichtgebundene αBiotin-Microbeads entfernt werden, werden die Zellen in einem Volumen von 500 µl MACS®-Puffer auf eine zuvor mit MACS®-Puffer konditionierte Säule aufgetragen, die im Magnetfeld eines VarioMACS® Separators positioniert ist. Während die nicht markierten Zellen die Säulenmatrix ungehindert passierten, verbleiben die Microbead-gebundenen CD154<sup>+</sup> Zellen in der Säule. Die Reinheit der in der Säule verbliebenen Zellfraktion wird durch Spülen der Säulenmatrix mit insgesamt 1,5 ml MACS®-Puffer zusätzlich erhöht. Nach dem Entfernen der Säule aus dem magnetischen Feld werden die markierten Zellen unter Verwendung von 1 ml MACS®-Puffer und dem mitgelieferten Stempel aus der Säule gespült. Anschließend erfolgt zur Qualitätskontrolle eine durchflusszytometrische Analyse der Zellen.

### 3.1.6 Bestrahlung der Zellen

Um eine Vermehrung der Zellen des Wirkstoffes MGN1601 im Körper des Patienten zu verhindern, werden die transfizierten B25-MOL-Zellen durch eine hohe Dosis  $\gamma$ -Strahlen inaktiviert. Um dem zellbasierten Gentherapeutikum möglichst ähnlich zu sein, werden die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Zellen ebenfalls einer Röntgenstrahlung von 100 Gy ausgesetzt.

Dazu werden die angereicherten, transfizierten Zellen in ein verschließbares 50 ml Röhrchen überführt und zweimal mit je 25 ml FACS-PBS gewaschen und abzentrifugiert (3 min,  $300 \times g$ ). Im Anschluss wird das Zellpellet in 25 ml FACS-PBS aufgenommen, gut gekühlt (auf Eis) verpackt und zur Bestrahlung gegeben. Diese wird im DRK-Blutspendedienst Ost GmbH, ITM Berlin durchgeführt. Die Bestrahlung der Zellen erfolgt in vier Zyklen á 25 Gy (insg. 100 Gy).

### 3.1.7 Durchflusszytometrische Analyse von Zelloberflächen-Antigenen

Eine durchflusszytometrische Analyse der Zellen erfolgt zur Analyse regulierter bzw. stabil exprimierter Oberflächenantigene auf nativen B25-MOL-Zellen und Wirkstoffzellen.

Die Qualitätskontrolle der selektierten Zellen erfolgt jeweils direkt im Anschluss an die magnetische Zellseparation. Für eine Analyse der Wirkstoffzellen wird ein entsprechendes Kryoröhrchen aus dem Stickstofftank entnommen und die Zellen wie unter „2.5.1 Zellkultivierung“ (S.28) aufgetaut und für 6 h inkubiert, bevor sie einer direkten Antikörperfärbung unterzogen werden. Die Oberflächenantigene werden unter Verwendung Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelter Antikörper (vgl. 2.8 Antikörper; S.31) markiert und in einem FACS Calibur (BD) analysiert.

Die Zellen für die durchflusszytometrische Analyse werden zunächst gewaschen und anschließend in FACS-PBS aufgenommen. Etwa  $1 - 10 \times 10^5$  Zellen werden in ein FACS-Röhrchen überführt und abzentrifugiert (3 min,  $300 \times g$ ). Das Zellpellet wird in 50  $\mu$ l FACS-PBS aufgenommen und die entsprechende Antikörperlösung hinzu pipettiert. Nach einer Inkubationsphase von 20 – 30 min auf Eis unter Lichtausschluss werden die Zellen ein weiteres Mal unter Zugabe von FACS-PBS gewaschen, um nichtgebundenen Antikörper aus der Probe zu entfernen. Schließlich werden die Zellen in 400  $\mu$ l FACS-PBS aufgenommen und bis zur Analyse auf Eis unter Lichtausschluss aufbewahrt. Die Diskriminierung der toten Zellen erfolgt unter Verwendung von Propidiumiodid in einer finalen Konzentration von 0,05  $\mu$ g/ml bzw. 7-AAD in einer finalen Konzentration von 0,5  $\mu$ g/  $5 \times 10^5$  Zellen. Die durchflusszytometrische Analyse wird mit Hilfe eines FACS Calibur® durchgeführt.

### 3.1.8 Nachweis sezernierter Antigene mittels ELISA

Die Detektion sezernierter, löslicher Antigene erfolgt aus dem Überstand kultivierter Zellen unter Verwendung eines DuoSet ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*, vgl. 2.5.3 ELISA; S.29) der Firma R&D Systems. Ein auf dem Prinzip des „Sandwich“-ELISA beruhendes Nachweissystem. Dazu werden die gesammelten Überstände zweimal abzentrifugiert (3 min, 300 × g, 1 min 10.000 × g), um Zelltrümmer möglichst vollständig zu entfernen, in neue Reaktionsgefäße überführt und bis zur Analyse bei -80°C aufbewahrt.

Das zu analysierende Antigen bindet an einen primären monoklonalen Antikörper, der auf einer 96-Well-Platte immobilisiert ist. Ein zweiter biotinylierter Detektions-Antikörper bindet anschließend an ein anderes Epitop des Antigens. Schließlich erfolgt die Zugabe einer Streptavidin-konjugierten Meerrettich-Peroxidase-Lösung (HRP-Lösung). Es bilden sich „Sandwich“-Komplexe, bestehend aus primären Fang-Antikörper, Antigen, biotinylierten Detektions-Antikörper und Streptavidin-konjugierter Meerrettich-Peroxidase. Unter Zugabe eines geeigneten Substrates (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/ Tetramethylbenzidin), wird dieses durch die Peroxidase in ein korrespondierendes, farbiges Produkt umgesetzt. Diese Reaktion wird durch die Zugabe von 2 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> abgestoppt. Die Durchführung der DuoSet ELISA erfolgt nach den Angaben des Herstellers. Die Absorption der Proben wird bei einer Wellenlänge von 450 nm photometrisch (Mithras LB 940, Berthold Technologies) bestimmt. Anhand von mitgeführten Standards wird die Antigenkonzentration unter Anwendung des nichtlinearen 4 Parameter Regressionsmodells ermittelt.

$$f(x) = \left( \frac{A - D}{1 + \left(\frac{x}{C}\right)^B} \right) + D$$

A= Minimum (Absortionswert der Negativkontrolle)

B= Steigung der sigmoiden Standardkurve

C= Wendepunkt der sigmoiden Standardkurve

D= Maximum (Absortionswert des Standards mit der größten Konzentration)

x= detektierte Absorption der zu untersuchenden Probe

f(x)= Konzentration des Analytes in der zu untersuchenden Probe

### 3.1.9 Nachweis sezernierter Antigene mittels Bead Array

Eine weitere Nachweismethode zur Detektion löslicher Antigene bietet der „Bead Array Flow Cytomix“ (Bender MedSystems). Dieser ermöglicht den gleichzeitigen Nachweis mehrerer löslicher Antigene in einer Probe mittels durchflusszytometrischer Analyse. Dazu werden die gesammelten Zellkulturüberstände zweimal abzentrifugiert (3 min  $300 \times g$ , 1 min  $10.000 \times g$ ), um Zelltrümmer möglichst vollständig zu entfernen, anschließend in neue Reaktionsgefäße überführt und bis zur Analyse bei  $-80^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

Die Beads sind mit spezifischen Antikörpern gegen ein Antigen markiert, während die Detektionslösung einen zweiten, spezifischen, Biotin-konjugierten sekundären Antikörper enthält. Mittels einer Streptavidin-Phycoerythrin-Lösung (SA-PE) erfolgt der Nachweis des Biotin-konjugierten Antikörpers. Anhand der Größe und Eigenfluoreszenz der verwendeten Beads lassen sich die analysierten Antigene identifizieren. Über die Signalintensität der PE-Fluoreszenz wird die Konzentration des Antigens in der Probe ermittelt. Inkubiert man die zu untersuchende Probe mit Detektionslösung und SA-PE-Konjugat entsprechend den Vorgaben des Herstellers, entstehen „Sandwich“-Komplexe (Bead-Antigen-Detektorantikörper-Biotin-Streptavidin-PE). Mit Hilfe der Durchflusszytometrie können diese Komplexe anschließend detektiert werden. Die Durchführung des Bead Arrays erfolgt nach den Angaben des Herstellers (Human Basic Kit FlowCytomix, 2011). Für die durchflusszytometrische Analyse findet ein FACS Calibur<sup>®</sup> Verwendung mit einem Argon-Laser bei einer Wellenlänge von 488 nm. Die Detektion der Fluoreszenz zur Quantifizierung des Antigens erfolgt bei einer Wellenlänge von 575 nm (Nachweis der PE-Fluoreszenz) und 700 nm zur Identifizierung der Bead-Population.

Als erstes wird mit Hilfe der im jeweiligen SimplexKit enthaltenen Standards eine Verdünnungsreihe pipettiert, die bei der späteren Auswertung zur Erstellung der Standardkurven der einzelnen Analyte herangezogen wird. Zur Herstellung des Beadmix-Reagent werden 85  $\mu\text{l}$  jedes benötigten Bead-Reagent in ein Reaktionsgefäß pipettiert und mit 1190  $\mu\text{l}$  „Reagent Dilution“-Puffer zu einem Gesamtvolumen von 1700  $\mu\text{l}$  aufgefüllt. Für die Herstellung des Biotin-Antikörper-Konjugats werden 170  $\mu\text{l}$  der jeweiligen Biotin-Antikörper-Konjugate und 2380  $\mu\text{l}$  „Reagent Dilution“-Puffer gemischt, um ein Endvolumen von 3400  $\mu\text{l}$  zu erreichen.

Zur Equilibrierung der Mikrotiterplatte wird zunächst in jede Vertiefung 50  $\mu\text{l}$  des Assay-Puffer pipettiert und dieser mit Hilfe einer Vakuumabsaugpumpe wieder entfernt. Noch vorhandene Restflüssigkeit wird mit Hilfe eines Tuches vorsichtig entfernt. In die Vertiefungen werden dann jeweils 25  $\mu\text{l}$  der Standards, der Negativkontrolle (Blank, Assay-Puffer) und der Proben



pipettiert. Dazu werden anschließend jeweils 25 µl des Beadmix-Reagent und 50 µl des Biotin-Antikörper-Konjugates gegeben. Die Mikrotiterplatte wird mit einer selbstklebenden Folie abgedeckt und unter Lichtausschluss bei Raumtemperatur für 2 h auf einem Plattenschüttler (400 rpm) inkubiert. Innerhalb der Inkubationszeit wird die Streptavidin-Phycoerythrin-Lösung (SA-PE) durch Verdünnen von 85 µl des SA-PE-Konzentrats in 3315 µl Assay-Puffer angesetzt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wird die Flüssigkeit in den Vertiefungen der Mikrotiterplatte abgesaugt. Anschließend werden die Vertiefungen 2-mal mit jeweils 100 µl Assay-Puffer gewaschen. Die Waschlösung wird jeweils durch Absaugen entfernt. Nach dem zweiten Waschschrift wird die noch vorhandene Flüssigkeit unterhalb der Vertiefungen vorsichtig mit einem Tuch entfernt. Im Anschluss werden in jede Vertiefung der Mikrotiterplatte 50 µl der SA-PE-Lösung pipettiert. Dann wird die Mikrotiterplatte erneut mit Folie abgedeckt und unter Lichtausschluss für eine weitere Stunde auf einem Plattenschüttler bei Raumtemperatur (400 rpm) inkubiert. Nach dem Absaugen der Flüssigkeit folgen zwei weitere Waschschriffe mit jeweils 100 µl Assay-Puffer. Nun wird in jede Vertiefung 200 µl Assay-Puffer gegeben, die Ansätze gut gemischt und in vorbereitete Costaröhrchen überführt und diese bis zur Messung auf Eis aufbewahrt. Vor Beginn der Messung am Durchflusszytometer wird ein Setup mit geeigneten Setup-Beads durchgeführt. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgt unter Anwendung der FlowCytomix™ Software (eBioscience).

## 3.2 Molekularbiologische Methoden

### 3.2.1 Gesamt-RNA-Extraktion

Für die Extraktion von Gesamt-RNA wird im Rahmen der vorliegenden Arbeit RNAzol® RT (Molecular Research Center) verwendet. Die Extraktion der RNA unter Verwendung dieses Reagens basiert auf einem denaturierenden Zellaufschluss und anschließender Flüssigkeitsphasenverteilung der zellulären Komponenten in Gegenwart von Phenol und Guanidin und führt zu hochreiner, intakter RNA, welche ohne eine DNase-Behandlung in Microarray-Experimente eingesetzt werden kann. Frische oder tiefgefrorene Zellpellets ( $1 \times 10^6$  Zellen) werden zunächst in 500 µl RNAzol® aufgeschlossen. Durch die Zugabe von 200 µl RNase freiem Wasser präzipitieren DNA, Proteine, Polysaccharide sowie andere Moleküle aus dem Homogenat innerhalb von 5 – 15 min bei Raumtemperatur. Mit Hilfe eines Zentrifugationsschrittes für 15 min bei  $12.000 \times g$  werden diese sedimentiert. Die RNA bleibt im Überstand zurück und wird durch eine anschließende Ethanol fällung isoliert. Dazu wird dem Überstand das gleiche Volumen 75 % Ethanol zugesetzt, 10 min bei Raumtemperatur inkubiert

und bei  $12.000 \times g$  für 8 min zentrifugiert. Nach zwei aufeinander folgenden Waschschritten mit jeweils 500  $\mu\text{l}$  75 % Ethanol, wird das RNA-Pellet in 30 – 40  $\mu\text{l}$  RNase freiem Wasser aufgenommen. Die Bestimmung der RNA-Konzentration und des Reinheitsgrades erfolgt mit Hilfe eines Spektrophotometers (Cary 1E UV-Visible Spektrophotometer). Für die Bestimmung des Reinheitsgrades wird neben der spektrophotometrischen Analyse der Quotient aus der Absorption bei 260 nm ( $A_{260}$ ) und 280 nm ( $A_{280}$ ) gebildet, der einen Rückschluss auf den Reinheitsgrad der RNA-Proben zulässt. RNA-Proben mit einer  $A_{260}/A_{280}$  Ratio von unter 1,8 gelten als potentiell mit organischen Verbindungen (Peptide, Phenol, RNAzol®) verunreinigt.

### 3.2.2 RNA Agarose-Gelelektrophorese

Die Integrität der extrahierten RNA wird anhand einer elektrophoretischen Auftrennung analysiert. Als Matrix dient ein Gel aus elektrisch neutraler Agarose (1,2 %), der Formaldehyd als denaturierendes Reagenz zugesetzt wird, um die Ausbildung von Sekundärstrukturen der RNA zu unterbinden. Das Verfahren wird unter Verwendung des MOPS-Puffersystems durchgeführt (Bryant et al., 1998). Jedes Gel enthält außerdem Ethidiumbromid in einer finalen Konzentration von 1,5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , um die RNA nach der Gelelektrophorese mittels UV (312 nm) angeregter Fluoreszenz visualisieren zu können. Vor dem Auftragen werden die Proben mit einem 2-fach Ladepuffer (2  $\times$  Loading Dye, Fermentas) versetzt. Als Referenz dient ein RNA-Marker der Firma Fermentas (#SM1821). Sowohl der RNA-Marker als auch die mit Ladepuffer versetzten Proben werden vor dem Auftragen für 10 min auf 70°C erhitzt. Die Auftrennung der RNA Proben erfolgt bei einer Spannung von 5 -7 V/cm für 1 h.

### 3.2.3 Generierung von cDNA mittels reverser Transkription

Für die Verwendung in der quantitativen Real-time PCR (qRT-PCR) wird die extrahierte Gesamt-RNA in cDNA transkribiert. Zu diesem Zweck wird die Superscript® II Reverse Transkriptase (Invitrogen) verwendet.

In einem Ansatz werden jeweils 2  $\mu\text{g}$  Gesamt-RNA in cDNA umgeschrieben. Dazu wird das entsprechende Volumen der extrahierten RNA, 1  $\mu\text{l}$  dNTP (10 mM) und 1  $\mu\text{l}$  Random Hexamer Primer (Thermo Fisher Scientific) mit Aqua Spül Lösung auf ein Gesamtvolumen von 12  $\mu\text{l}$  aufgefüllt. Dieser Ansatz wird für 5 min bei 65°C im Thermocycler inkubiert und dann auf Eis abgekühlt. Anschließend werden dem Ansatz weitere Komponenten hinzugefügt: 4  $\mu\text{l}$  des 5  $\times$  First Stand Puffers, 2  $\mu\text{l}$  DTT (0,1 M), sowie 0,5  $\mu\text{l}$  RNaseOUT™. Nach einer weiteren Inkubationsphase für 2 min bei 25°C wird dem Ansatz 1  $\mu\text{l}$  der SuperScript® II Reverse Transkriptase hinzugefügt und mit Aqua Spül Lösung auf ein Gesamtvolumen von 20  $\mu\text{l}$

aufgefüllt. Nach einer Inkubationsphase von 10 min bei 25°C, in der die Random Hexamer Primer an die RNA hybridisieren, erfolgt die Reaktion der eigentlichen reversen Transkription im Verlauf einer Inkubationsphase für 50 min bei 42°C. Zur Inaktivierung der Reversen Transkriptase wird der Ansatz schließlich für 15 min bei 70°C inkubiert. Die generierten cDNA-Proben werden bis zu ihrem Einsatz in die quantitative Real-time PCR bei -80°C aufbewahrt.

### 3.2.4 Quantitative Taqman® PCR

Die quantitative Real-time PCR (qPCR) unter Anwendung der Taqman® Technologie stellt eine zuverlässige Methode zur Detektion und Quantifizierung von mRNA dar und eignet sich daher als Verfahren, um das Expressionsniveau von Genen präzise zu untersuchen und so Microarray-Daten zu validieren.

In eine solche Reaktion wird neben den spezifischen Primern, welche für die Amplifikation notwendig sind, zusätzlich eine fluoreszenz-markierte Sonde eingesetzt, die ebenfalls spezifisch an die zu amplifizierende Sequenz zwischen den beiden Primern hybridisiert. Die Sonde besteht aus einem Oligonukleotid, dessen 5'-Ende mit einem Fluorophor markiert ist, während das 3'-Ende einen nichtfluoreszierenden Quencher trägt. Wird eine intakte Sonde durch Licht einer bestimmten Wellenlänge angeregt, so wird die Fluoreszenz des Reporterfarbstoffes aufgrund der räumlichen Nähe zum Quencher durch einen Fluoreszenz-Energietransfer unterbunden. Im Verlauf eines Amplifikationsschrittes wird die hybridisierte Sonde durch die Exonukleaseaktivität der Taq-Polymerase hydrolysiert. Dadurch entfernen sich der Reporter- und der Quencherfarbstoff räumlich voneinander, wodurch ein Energietransfer vom Reporter zum Quencher nicht mehr möglich ist; damit wird die Fluoreszenz des Reporterfarbstoffes detektierbar. In Abhängigkeit von der Menge des generierten Amplifikates steigt die Fluoreszenz des Reporterfarbstoffes mit jedem Reaktionszyklus weiter an. Das detektierbare Fluoreszenzsignal ist sequenzspezifisch; Sonden eines unvollständigen Hybriden werden verdrängt, bevor die Taq-Polymerase diese hydrolysieren kann. Die gemessene Zunahme der Fluoreszenz in der exponentiellen Phase der PCR-Reaktion ist direkt proportional zur Menge des entstandenen Amplifikats. Diese ist ihrerseits proportional zur Menge des eingesetzten Templates. Die Intensität der Fluoreszenz wird von einem entsprechenden Detektionssystem (ABI PRISM 7500, Applied Biosystems) am Ende jedes Reaktionszyklus quantifiziert.

Die Firma Life Technologies bietet ein großes Spektrum Primer/Sonden-Kombinationen (TaqMan® Gene Expression qPCR Assays, Applied Biosystems) zur Detektion von mRNA sowie nicht-kodierender RNA für verschiedene Organismen an.

Für insgesamt 90 Gene und vier endogene Kontrollen werden geeignete „TaqMan® Gene Expression Assays“ ausgewählt (Tabelle 2.2; S.33), deren Primer und Sonden lyophilisiert auf einer 96-Well Custom Taqman® Gene Expression Array Plate vorliegen. Jeder der verwendeten Assays ist optimiert, um unter standardisierten Real-Time-Reaktionsbedingungen optimale Ergebnisse zu erzeugen. In jedem Ansatz liegt eine finale Konzentration von 250 nM der Sonde und 900 nM von jedem Primer vor. Als Template werden jeweils 10 ng cDNA pro Reaktionsansatz eingesetzt; das finale Reaktionsvolumen beträgt 20 µl pro Reaktionsansatz. Der Taqman® Universal Master Mix (Applied Biosystems), der neben der AmpliTaq Gold® DNA Polymerase auch dNTP, alle Pufferkomponenten, MgCl<sub>2</sub>, einen passiven Referenzfarbstoff (Rox®) und AmpErase®UNG enthält, wird nach den Angaben des Herstellers eingesetzt. Die qPCR-Reaktion läuft unter folgenden Bedingungen, nach Angaben des Herstellers ab: ein Schritt bei 50°C für 2 min, gefolgt von einem weiteren Schritt zur Denaturierung der cDNA für 10 min bei 95°C und 40 Zyklen zur Amplifikation, mit jeweils einem Denaturierungsschritt für 15 sec bei 95°C und einem Hybridisierungs- und Elongationsschritt für 1 min bei 60°C (TaqMan® Array Plates, 2009).

Für einige Gene werden zusätzlich Primer und Sonden mit Hilfe der PrimerExpress 3.0 (Applied Biosystems) Software entworfen. Dabei wird darauf geachtet, dass möglichst die Sonde oder einer der Primer Exon-überspannend ist, so dass in der qPCR-Reaktion ausschließlich mRNA nachgewiesen wird. Genomische DNA, welche unter Umständen als Kontamination in der RNA-Präparation enthalten sein kann, enthält Gensequenzen, die aus Introns und Exons bestehen, während sich die cDNA nur aus Exons zusammensetzt. Durch die Verwendung von Exon-überspannenden Sonden bzw. Primern wird gewährleistet, dass ausschließlich die cDNA als Zielsequenz für die Generierung spezifischer Amplifikate in der qPCR-Reaktion dient. Die Information über die Lokalisation der Exon-Exon-Grenzen wurden auf der PUBMED-Internetseite <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/> recherchiert. Eine Liste dieser Primer und Sonden ist in Tabelle 2.1 (S.32) aufgeführt. Analog zu den Taqman® Gene Expression Assays werden jeweils 10 ng Gesamt-cDNA als Template in jeden Reaktionsansatz eingesetzt; das Reaktionsvolumen beträgt auch hier 20 µl. Die finalen Konzentrationen von Primer und Sonden werden empirisch ermittelt und sind in Tabelle 2.1 ebenfalls aufgeführt. Wie für die „TaqMan® Gene Expression Assays“ kommt für diese Reaktionsansätze der gleiche Taqman® Universal Master Mix (Applied Biosystems) zum Einsatz. Die qPCR-Reaktion wird unter Bedingungen analog zu den „TaqMan® Gene Expression Assays“ durchgeführt.

### 3.2.4.1 Bestimmung der qPCR-Effizienz

Für eine präzise Quantifizierung der cDNA-Menge in einer qPCR ist die PCR-Effizienz von entscheidender Bedeutung. Sie charakterisiert den Anteil des Zieltranskriptes (cDNA), der während der Elongationsphase der qPCR vervielfältigt wird. Bei einer Effizienz von 100 % findet pro PCR-Zyklus eine Verdoppelung und nach 3,333 Zyklen eine Verzehnfachung der cDNA-Ausgangsmenge statt. Beeinflusst wird die Effizienz durch die Amplikonlänge, die Sekundärstruktur der cDNA und Qualität der cDNA sowie der Primer und Sonden.

Zur Bestimmung der Effizienz werden cDNA-Proben unterschiedlicher Konzentration eingesetzt. Ausgehend von einer Konzentration von 1 µg/µl RNA wird zunächst eine cDNA-Synthese durchgeführt (vgl. 3.2.3 Generierung von cDNA mittels reverser Transkription). Die synthetisierte cDNA wird auf eine Konzentration von 10 ng/µl eingestellt, anschließend wird eine 7-stufige Verdünnungsreihe mit einem Verdünnungsfaktor von 10 erstellt und diese als technisches Triplikat in einer Taqman® qPCR-Reaktion zusammen mit einer Negativkontrolle (Aqua Spül Lösung) eingesetzt. Nach Ablauf der Reaktion werden die Ausgangsmengen der cDNA in einer logarithmischen Funktion als Regressionsgerade gegen den Ct-Wert dargestellt. Die Steigung dieser Regressionsgeraden dient als Indikator für die Amplifikationseffizienz der qPCR-Reaktion. Bei einer Effizienz von 100 % beträgt die Steigung der Geraden -3,333 und wird umso kleiner, je geringer die Effizienz der qPCR ist. Im Rahmen dieser Arbeit wird ein Toleranzbereich der qPCR-Effizienz von 90 % < Effizienz < 110 % festgelegt.

Der Korrelationseffizient ( $R^2$ ) beschreibt die Kontinuität der Steigung, in Bezug auf die verschiedenen Verdünnungsstufen und beträgt im Idealfall 1. In der vorliegenden Arbeit wird ein Korrelationseffizient von  $\geq 0,998$  gefordert.

### 3.2.4.2 Auswertung der Taqman® qPCR-Ergebnisse

Nach Beendigung des qPCR-Programms erzeugt die SDS Software (Applied Biosystems), welche mit dem Thermocycler gekoppelt ist, die Amplifikationskurven der Transkripte. Anschließend werden die *Baseline* und der *Threshold* festgelegt, anhand derer die endgültigen Ct-Werte (*threshold cycle*) ermittelt werden. Er beschreibt die jeweilige Zyklusanzahl, die notwendig ist, um ein konstant definiertes Fluoreszenzniveau zu überschreiten und dient als Maß für die Quantifizierung der Ausgangsmenge an spezifischer cDNA. Alle qPCR-Reaktionen eines Taqman® Experimentes befinden sich an diesem Punkt in der exponentiellen Phase. Dabei verhält sich der Ct-Wert umgekehrt proportional zur amplifizierten DNA-Menge. Je höher der Ct-Wert (d. h. je höher die Zykluszahl, bei der die Amplifikationskurve den Threshold überschreitet), desto weniger cDNA befand sich in der Probe. Für die Datenanalyse wird aus

mehreren Ct-Werten ein arithmetisches Mittel (Av) gebildet und die entsprechende Standardabweichung (SD) berechnet, welche in jedem Fall  $< 1$  sein sollte.

### 3.2.4.3 Komparative $\Delta\Delta Ct$ -Methode

Im Rahmen dieser Arbeit wird die komparative  $\Delta\Delta Ct$ -Methode zur relativen Quantifizierung der Genexpression verwendet (Guide to Performing Relative Quantification of Gene Expression Using Real-Time Quantitative PCR, 2008; Schmittgen et al., 2008). Dafür muss die Genexpression eines Zielgens, mit der eines nichtregulierten *Housekeeping*-Gens (im Folgenden als Referenzgen bezeichnet) normalisiert werden. Für die Berechnung des relativen Expressionsunterschiedes wird im ersten Schritt der Mittelwert der dreifach bestimmten Ct-Werte des Referenzgens von dem des Zielgens subtrahiert.

$$\Delta Ct = Ct_{\text{Zielgen}} - Ct_{\text{Referenzgen}}$$

Die Standardabweichung (SD) des  $\Delta Ct$ -Wertes lässt sich aus den Standardabweichungen der Ct-Werte des Ziel- und Referenzgens berechnen.

$$SD = (SD_{\text{Zielgen}}^2 + SD_{\text{Referenzgen}}^2)^{1/2}$$

Nach dieser Normalisierung wird vom  $\Delta Ct$ -Wert eines Gens aus der behandelten Probe, der  $\Delta Ct$ -Wert des gleichen Gens aus der nativen Probe subtrahiert; man erhält den  $\Delta\Delta Ct$ -Wert. Die Standardabweichung des  $\Delta\Delta Ct$ -Wertes entspricht der des  $\Delta Ct$ -Wertes der behandelten Probe.

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{behandelt}} - \Delta Ct_{\text{nativ}}$$

Der relative Expressionsunterschied (*fold change*, FC) lässt sich aus der negativen Potenz des  $\Delta\Delta Ct$ -Wertes zur Basis 2 berechnen.

$$FC = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Bei einer verminderten Expression eines Gens in den behandelten Proben ergibt sich aus der Berechnung ein positiver  $\Delta\Delta Ct$ -Wert kleiner 1 ( $0 < \Delta\Delta Ct < 1$ ). Um die verminderte Genexpression anschaulich darzustellen, wird der relative Expressionsunterschied aus dem negativen Kehrwert des  $\Delta\Delta Ct$ -Wertes berechnet.

$$FC = \frac{-1}{2^{-\Delta\Delta Ct}}$$

Im Rahmen der hier durchgeführten Experimente gilt ein Gen als differentiell exprimiert, wenn der sich ergebene FC dieses Gens zwischen den analysierten Versuchsproben größer bzw. kleiner als 3 ist; anderenfalls wird das Gen als unverändert exprimiert bezeichnet.

### 3.3 Genexpressionsanalyse mit dem Human GeneChip® 1.0 ST

Die DNA-Microarray Technologie erlaubt eine simultane Expressionsanalyse einer sehr großen Anzahl von Genen. Ziel dieser Analyse ist es, Gene zu identifizieren, die unter verschiedenen biologischen bzw. experimentellen Bedingungen eine differentielle Expression aufweisen. Auf einem Träger sind Sonden in hoher Dichte ortsspezifisch immobilisiert. Der Nachweis der an diese Sonden hybridisierenden Transkripte erfolgt mittels Transkript-gekoppelter Fluorochrome. Eine hohe Anzahl hybridisierter Transkripte an spezifische Sonden hat damit eine hohe Lichtintensität zur Folge, die mit Hilfe eines Scanners erfasst werden kann, was Rückschlüsse auf die Stärke der Expression des entsprechenden Gens zulässt (vgl. 1.3.1 Human GeneChip® 1.0 ST (Affymetrix Inc.); S.13).

Der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Affymetrix GeneChip® Human Gene 1.0 ST bildet mehr als 28.000 Gene ab. Die durchschnittlich 26 verschiedenen Sonden für ein Gen decken den gesamten Transkriptbereich ab, so dass ein realistisches Bild der Expression wiedergegeben wird.

Die RNA-Amplifikation und die Hybridisierung auf den Affymetrix GeneChip® Human Gene 1.0 ST, sowie die Vermessung der einzelnen Microarray-Experimente erfolgt in Kooperation mit dem Labor für Funktionelle Genomforschung (LFGC) der Charité unter der Leitung von Frau Dr. U. Ungethüm. Die Durchführung erfolgt nach dem Standardprotokoll des LFGC und ist unter „1.3.2 Array-Hybridisierung“ (S.14) zusammenfassend wiedergegeben. Die routinemäßige Transformation der Scannerrohdaten in numerische Informationen erfolgte mittels Affymetrix Software durch Herrn Dr. J. Kuban im Rahmen der Auftragsarbeit durch das LFGC, während die biostatistische Auswertung der GeneChip-basierten Genexpressionsanalyse durch die Verfasserin dieser Arbeit durchgeführt wird.

#### 3.3.1 Bioinformatische Auswertung der Affymetrix GeneChip 1.0 ST

In der vorliegenden Arbeit wird mit dem OnechannelGUI Software Paket gearbeitet, ein Bioconductor-Modul, bei dem verschiedene Software-Analysepakete miteinander kombiniert und ein graphisches „Interface“ aufgesetzt wurde, wodurch die Anwendung zur Analyse von Microarray-Datensätzen erheblich erleichtert wird. Das OnechannelGUI-Paket bietet verschiedene Methoden für die Qualitätskontrolle, Hintergrundkorrektur, Normalisierung, Filterung von Microarray-Daten bis hin zur statistischen Validierung und Generierung von Listen mit den differentiell exprimierten Genen aus den importierten Datensätzen (Sanges et al., 2007).

### 3.3.2 Bildverarbeitung und Präprozessierung der Affymetrix-Daten

Die gescannten Bilddaten der GeneChips werden zunächst unter Anwendung von „*Affymetrix Scanner Gene Chip Operating Software*“ (GCOS) in numerische Daten transformiert. Dabei werden unter anderem .CEL-Dateien generiert, die basierend auf den Bilddaten (.DAT Dateien) für jede, auf dem GeneChip lokalisierte Sonde eine von der Software kalkulierte Signalintensität nach der Hybridisierung enthält. Diese Daten können von Analyseprogrammen wie dem Bioconductor als Basis ihrer statistischen Analysen verwendet werden.

Bevor die Daten einer biostatistischen Analyse zugeführt werden können, ist es essentiell, die Rohdaten eines Microarray-Experimentes einer Präprozessierung zu unterziehen. Diese besteht in der Hauptsache aus drei Komponenten, der Qualitätskontrolle, der Hintergrundkorrektur und der Normalisierung der Daten. Ziel dieser Präprozessierung ist es, eventuelle „Ausreißer-Arrays“ zu identifizieren und von der Analyse auszuschließen, sowie Varianzen nicht-biologischen Ursprungs zu minimieren.

Die Ergebnisse eines Microarray-Experimentes können durch eine Vielzahl äußerer Einflüsse beeinträchtigt werden. So kann bereits ein qualitativ minderwertiger Array erheblichen Einfluss auf die resultierenden Ergebnisse haben (Heber et al., 2006). Bereits geringe Unterschiede in Qualität und/oder Quantität der Proben oder Reagenzien führen zu starken Varianzen in den Datensätzen (Bolstad et al., 2003). Unter Verwendung der im OnechannelGUI Paket zur Verfügung stehenden Qualitätskontroll-Funktion können diejenigen Arrays identifiziert werden, welche gegenüber den anderen so große Abweichungen aufweisen, dass ein Ausschluss der entsprechenden Versuchsprobe erfolgen muss. Als Qualitätskontrolle wird im Rahmen dieser Arbeit einerseits eine agglomerative hierarchische Clusteranalyse der Proben unter Berechnung des Pearson Korrelationskoeffizienten (Eisen et al., 1998) durchgeführt, sowie eine Hauptkomponentenanalyse (Stacklies et al., 2007), um potentielle Ausreißer unter den Proben zu identifizieren und gegebenenfalls zu eliminieren.

Die Hauptkomponentenanalyse (*Principal Component Analysis*, PCA) erlaubt eine Analyse und Darstellung multidimensionaler Datensätze, die bei Genexpressionsanalysen aus der Anzahl der beobachteten Proben und der Anzahl der untersuchten Variablen (Gene auf einem GeneChip) bestehen. Das Ziel der PCA ist dabei die Reduktion der Dimensionalität einer komplexen Datenmatrix durch die Identifikation neuer Variablen, den Hauptkomponenten, in denen der Informationsgehalt konzentriert wird (Sturn et al., 2002).

Als robuste Methode zur Präprozessierung der Microarray-Daten findet das von Irizarry et al. 2003 veröffentlichte „*Robust Multi-Array-Average*“ (RMA) Verfahren Anwendung. Die RMA-



Methode bedient sich einer globalen Hintergrundkorrektur (Irizarry et al., 2003a; Irizarry et al., 2003b). Die korrigierten Signalintensitäten eines Microarrays weisen häufig eine verzerrte oder abnorme Verteilung auf, was zu falschen Interpretationen führen kann. Um diesem Effekt zu minimieren, werden die Signalintensitäten anschließend in eine logarithmische Form ( $\log_2$ ) transformiert (Russell et al., 2009). Diese hintergrundkorrigierten und  $\log_2$ -transformierten Daten werden anschließend einer Quantil-Normalisierung (Bolstad et al., 2003) unterzogen.

Die ermittelte Expression eines Gens setzt sich aus den gemessenen Fluoreszenzintensitäten mehrerer Sonden zusammen, für die jeweils etwas unterschiedliche Intensitäten gemessen werden. Um die Expression eines Genes in einem einzigen Wert auszudrücken, erfolgt an dieser Stelle eine Kondensation mehrerer Sonden-Signale zu einem Einzelwert, welcher der Fluoreszenzintensität bzw. der Expression des Gens entspricht. Die RMA-Methode nutzt dafür ein additives lineares Model; dabei resultiert die Expression aus dem Produkt der aus den gemessenen Fluoreszenzintensitäten ermittelten Expression und einem Sonden-Set spezifischen Affinitätsfaktor (Irizarry et al., 2003a; Irizarry et al., 2003b).

### 3.3.3 Datenfilterung und Identifizierung differentiell exprimierter Gene

Die Filterung der Daten erfolgt in der vorliegenden Arbeit unter Verwendung des nichtspezifischen „*Inter Quartil Range*“ Filterverfahren (IQR bzw. Interquartilsabstand). Dabei werden alle Sonden-Sets aus dem Datensatz eliminiert, die über alle analysierten Microarray-Experimente keine oder nur eine geringe Varianz der Signalintensität bzw. des Expressionsniveaus zeigen. Gene, die im Vergleich zu allen anderen gemessenen Genen der in das Analyse-Datenpaket aufgenommenen Microarray-Experimente nur eine geringe Variabilität ihrer Fluoreszenzintensität aufweisen, sind mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht differentiell exprimiert und können deshalb von der weiteren statistischen Analyse ausgeschlossen werden.

Zur Identifizierung der differentiell exprimierten Gene wird das von Smyth (2004) entwickelte Verfahren *limma* (*linear models for microarray data*) verwendet, welches im entsprechenden Bioconductor Softwarepaket hinterlegt und im OnechannelGUI Modul implementiert ist. Dabei wird zunächst eine „*Design-Matrix*“ erstellt, die den experimentellen Versuchsaufbau widerspiegelt. In einer zweiten, sogenannten Vergleichsmatrix können dann die verschiedenen unterschiedlich behandelten Versuchsproben paarweise gegenübergestellt und analysiert werden. Die ebenfalls im Softwarepaket enthaltene „*TopTable*“ Funktion listet die differentiell exprimierten Gene unter Angabe der importierten Affymetrix-ID (Sonden-Set ID, *ProbeSet ID*), dem Gensymbol sowie einiger statistischer Werte; Tabelle 3.1 zeigt beispielhaft eine TopTable.

Tabelle 3.1 Beispielhafte Darstellung einer TopTable, mit differentiell exprimierten Genen

AffyID	SYMBOL	M	A	t	P Value	B
8151447	IL7	5,67	10,73	64,35	1,81E-07	16,24
8021470	PMAIP1	4,00	11,01	54,20	2,32E-07	15,42
7929047	IFIT2	4,97	8,96	53,73	2,32E-07	15,37
7912145	TNFRSF9	3,80	10,37	47,65	3,21E-07	14,73
8107887	CSF2	5,71	11,20	46,95	3,21E-07	14,64
7929065	IFIT1	3,77	9,09	46,52	3,21E-07	14,59
8135069	SERPINE1	3,53	10,85	45,93	3,21E-07	14,52
8163825	TRAF1	3,25	9,44	42,57	4,94E-07	14,07
8067040	NFATC2	4,06	9,62	40,78	6,06E-07	13,81
8025601	ICAM1	2,99	11,50	38,91	7,47E-07	13,52
8041422	RASGRP3	4,65	9,15	38,31	7,47E-07	13,42
8037374	PLAUR	2,93	10,84	38,14	7,47E-07	13,39

Der M-Wert (Minus) bezeichnet die Expressionsänderung des Gens zwischen den gegenübergestellten Versuchsproben. Hierbei werden die  $\log_2$ -transformierten Fluoreszenzintensitäten des analysierten Sonden-Sets voneinander subtrahiert, was einer  $\log_2$ -transformierten Expressionsdifferenz entspricht. Der A-Wert (*Average*) bezeichnet den Mittelwert der  $\log_2$ -transformierten Fluoreszenzintensitäten eines Gens, aus allen in die Design-Matrix einbezogenen Microarray-Experimenten. Die mit „t“ bezeichnete Spalte zeigt den t-Wert der moderaten t-Statistik, während die mit „P Value“ bezeichnete Spalte den dazugehörigen p-Wert angibt. Der B-Wert bezeichnet ein Maß für die Wahrscheinlichkeit, dass dieses Gen differentiell exprimiert ist.

Neben der Berechnung des Expressionsunterschiedes (M-Wert), welches durch das Softwarepaket limma ermittelt wird, wird mit Hilfe von Microsoft Excel eine weitere Berechnung des Expressionsunterschiedes (*FC, fold change*) durchgeführt, welcher die Veränderung der Expression greifbarer darstellt und die einzelnen Datenprozessierungsschritte besser nachvollziehbar macht, da er auf die nicht- $\log_2$ -transformierten Expressionswerte zurückgreift. Grundsätzlich beschreiben beide Werte jedoch die relative Änderung der Expression des betrachteten Gens.

$$FC = \frac{2^{|\text{Signal A} - \text{Signal B}|} \times |\text{Signal A} - \text{Signal B}|}{-(\text{Signal A} - \text{Signal B})}$$

Bisher ist in der Literatur kein Konsens darüber zu finden, ab welcher Größenordnung von einer biologisch bedeutsamen Expressionsänderung gesprochen werden kann. Vielmehr wird diese Entscheidung von den unterschiedlichen Autoren sehr subjektiv getroffen. So lassen sich in der Literatur FC-Werte zwischen 1,5 und 4 als Grenzwert einer signifikant, differentiellen Expression finden. Auch in neuerer Zeit findet eine Auseinandersetzung mit diesem Thema in der Literatur statt, so zeigen beispielsweise (Dalman et al., 2012), dass verschieden stringente FC und p-Werte einen signifikanten Einfluss auf die Ergebnisse der Microarray-Analyse haben. In der vorliegenden Arbeit wurden Expressionsänderungen ab einem FC-Wert  $> 3$ , einem p-Wert  $< 0,05$  und einem B-Wert  $> 2,2$  als differentiell exprimiert definiert.

### 3.3.4 Zuordnung der Gen-Annotationen

Auf dem im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Affymetrix GeneChip® Human Gene 1.0 ST sind zahlreiche Sonden-Sets abgebildet, die zunächst keine bekannte Annotation zu besitzen scheinen. Jedoch können mit neuen wissenschaftlichen Erkenntnissen immer wieder weiteren Sonden-Sets (Genen) eine Annotation zugeordnet werden. Aus diesem Grund wird die Annotationsliste für den Affymetrix GeneChip® Human Gene 1.0 ST von Affymetrix regelmäßig aktualisiert. Neben Affymetrix bemühen sich auch andere wissenschaftliche Arbeitsgruppen und verschiedene Institutionen um die Zuordnung weiterer Annotationen. So ist es sinnvoll, die unter Affymetrix nicht annotierten Sonden-Sets, die eine differentielle Expression aufweisen, mit Hilfe anderer Datenbanken auf eine Annotation zu prüfen. Für diesen Zweck wird die Liste der differentiell exprimierten Sonden-Sets mit unbekannter Annotation in die „*Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery*“ (DAVID) importiert und unter Anwendung des „*Gene Name Batch Viewer*“ geprüft, ob diesen Sonden-Sets eventuell eine Gen-Annotation zugeordnet werden kann (Huang da et al., 2009a; Huang da et al., 2009b). Sonden-Sets, denen auch hier (Stand September 2012) keine bekannte Annotation zugeordnet werden kann, werden von der weiteren Analyse ausgeschlossen.

### 3.3.5 Funktionelle Gen-Annotationsanalyse

Die funktionelle Gen-Annotationsanalyse wird mit Hilfe des Internet-basierten Programms DAVID durchgeführt. Dabei werden anhand des Fisher Exakt t-Test überrepräsentierte funktionelle Gengruppen ermittelt, deren enthaltene Gene aufgrund ihrer Funktion, der Lokalisation der resultierenden Proteine einer Gen-Ontologie (GO), einer Krankheit, Proteindomänen oder einem Signalweg zugeordnet werden können. Im ersten Schritt wird eine Liste von Genen importiert; über den „*Gene Identifier*“ wird jedes dieser Gene identifiziert

und bekommt seine entsprechende DAVID-Gene ID zugeordnet. In der funktionellen Gen-Annotationsanalyse erfolgt dann der Abgleich jedes identifizierten Gens aus der importierten Liste mit den Genen in funktionellen Gengruppen. DAVID greift dabei auf einen großen Pool verschiedener anderer Datenbanken zurück, z.B. SMART, Pfam, GO, KEGG-Pathway und diverse weitere. Diese verschiedenen Ressourcen sind in 10 Gruppen unterteilt, welche die Eingrenzung auf einige wenige, bezüglich der jeweiligen Fragestellung relevanten Ressourcen erleichtert. Im Rahmen dieser Arbeit wird die funktionelle Gen-Annotationsanalyse, entsprechend der vorliegenden Fragestellung auf die funktionellen Gengruppen der Gen-Ontologien GO (molekulare Funktion, biologischer Prozess, Zellkomponente) und die Pathways (KEEG- und Reactome Pathways) eingeschränkt.

Die Gen-Ontologie stellt eine hierarchische Sammlung biologischer Begriffe zur Beschreibung von Genen und Genprodukten aus verschiedenen biologischen Zusammenhängen dar, man unterscheidet drei große Kategorien, die unabhängig voneinander betrachtet werden, biologische Prozesse (GOTERM\_BP), molekulare Funktionen (GOTERM\_MP) und zelluläre Kompartimente (GOTERM\_CC). Jeder Kategorie werden bestimmte Gene zugeordnet, und jede Kategorie teilt sich in weitere „Unterkategorien“ auf, so dass ein hierarchisches System von Kategorien entsteht, welche immer enger gefasste Gruppen von Genen zu neuen funktionellen Kategorien zusammenfasst ([www.geneontology.org](http://www.geneontology.org), (Ashburner et al., 2000)). In diesen funktionellen Gruppen sind die beteiligten Gene in Listen zusammengefasst. Gegenüber Pathway-Datenbanken, in denen zu Gunsten der Übersichtlichkeit in der Regel nicht alle beteiligten Gene dargestellt sind, enthalten diese funktionellen Gruppen der Gen-Ontologien alle bekannten beteiligten Gene. Ein Zusammenhang, wie die beteiligten Gene bzw. deren Genprodukte miteinander interagieren, ist jedoch nicht hinterlegt. In einem Pathway werden Gene bzw. deren Genprodukte zu funktionellen Gruppen zusammengefasst, die Regulationsmechanismen innerhalb der Zelle bzw. zwischen verschiedenen Zellen abbilden. Diese werden meist in Form eines Netzwerkes dargestellt. Über das Internet sind mittlerweile zahlreiche Pathway-Sammlungen zu finden. Für die hier durchgeführte Analyse wird auf zwei verschiedene Datenbanken zugegriffen, die KEGG Datenbank (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*, [www.genome.jp/kegg/](http://www.genome.jp/kegg/), (Ogata et al., 1998)) und die Reactome Datenbank ([www.reactome.org/ReactomeGWT/entrypoint.html](http://www.reactome.org/ReactomeGWT/entrypoint.html), (Vastrik et al., 2007)). Diese sind auf Grund ihrer Übersichtlichkeit innerhalb eines Pathways, der zur Verfügung gestellten weiterführenden Informationen zu jedem beteiligten Gen und der Vollständigkeit der in der Datenbank hinterlegten Pathways ausgewählt worden.

Im folgenden Schritt erfolgt der Abgleich der importierten identifizierten Gene mit den Genlisten der ausgewählten funktionellen Gengruppen. Anhand voreinstellbarer Parameter,

wie beispielsweise des EASE Score oder der Anzahl an Genen aus der importierten Liste, die innerhalb einer überrepräsentierten, funktionellen Gengruppe vorhanden sein muss, ergibt sich eine Auflistung aller funktioneller Gengruppen, die diese Voraussetzungen erfüllen, als Ergebnis der funktionellen Gen-Annotationsanalyse (Sherman et al., 2007a). Für eine überrepräsentierte funktionelle Gengruppe wird ein p-Wert von  $\leq 0,05$  (EASE Score, Fisher Exact T-Test) festgelegt. Außerdem sollen mindestens 5 Gene der funktionellen Gengruppe in der importierten Genliste vorhanden sein.

### 3.3.6 Heat Map Darstellung

Die Heat Map Darstellung dient der übersichtlichen Darstellung von Expressionsdaten. Dabei werden die Expressionssignale individueller Sonden-Sets oder Gene in einer Matrix zusammengefasst und farbkodiert wiedergegeben. So kann der Expressionsverlauf einer Vielzahl von Genen über mehrere Experimente oder wie hier über aufeinanderfolgende Schritte des Herstellungsprozesses veranschaulicht werden. Alle im Rahmen dieser Arbeit erstellten Heat Map Darstellungen werden unter Verwendung des „Multi Experiment Viewers“ (TM4 Software Suite) erstellt. Eine intensive Grün-Färbung stellt eine hohe Expressionsstärke dar, während eine intensive Rot-Färbung auf eine geringe Expressionsstärke des betreffenden Sonden-Sets hindeutet.

## 3.4 Statistische Verfahren zur Ermittlung der Korrelation

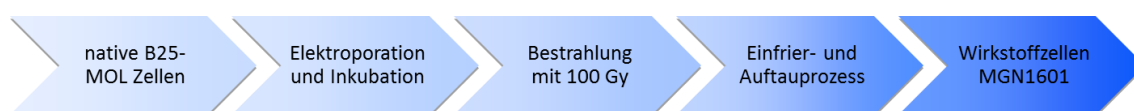
Um zu ermitteln ob zwischen den Ergebnissen verwendeten Nachweismethoden (Microarray Analyse, Taqman® basierte qPCR, ELISA, Bead Array, durchflusszytometrischer Nachweis von Zelloberflächenantigen) eine Korrelation besteht, wird die Rangkorrelationsanalyse nach Spearman angewendet. Dabei werden die ermittelten Versuchsdaten durch den Rang relativ zu allen übrigen Daten desselben Versuchs ersetzt. Mit den Daten des zu vergleichenden Versuches wird analog verfahren. Anschließend erfolgt die Berechnung des Korrelationskoeffizienten  $\rho$ . Dabei beschreibt  $d$  die Differenz zwischen den Rängen der ermittelten Ergebnisse eines Parameters (Gens), die sich aus den gegenübergestellten Nachweismethoden ergeben. Der Wert  $n$  ist die Anzahl der analysierten Parameter (Gene). Durch das Ersetzen von Messwerten bzw. berechneten Ergebnissen durch die entsprechenden Ränge kommt es zwar zum Informationsverlust, dennoch findet die Rangkorrelationsanalyse häufig Anwendung, wenn es darum geht, Daten verschiedener Nachweismethoden miteinander zu vergleichen.

$$\rho = 1 - \frac{6 \times \sum d^2}{n \times (n^2 - 1)}$$

Der so berechnete Korrelationskoeffizient ( $\rho$ ) kann Werte zwischen -1 und +1 annehmen. Nimmt der berechnete Koeffizient einen Wert  $> 0$  an spricht man von einer positiven Korrelation der analysierten Daten, da bei Zunahme der einen Größe auch die andere steigt. Im Gegensatz dazu bedeutet ein Wert  $< 0$  eine negative Korrelation, d. h. bei Zunahme der einen Größe verringert sich die dazugehörige andere Größe. Nimmt der Koeffizient den Wert Null an, liegt keine Korrelation der analysierten Daten vor. Anhand des zugehörigen P-Wertes wird bestimmt, ob der beobachtete Wert von  $\rho$  sich signifikant von Null unterscheidet. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit gilt bei einem P-Wert  $< 0,05$  die berechnete Korrelation als statistisch signifikant.

## 4 Ergebnisse

Gegenstand dieser Arbeit ist die Analyse der Genexpression der Wirkstoffzellen gegenüber nativen B25-MOL-Zellen. Zur Herstellung der Wirkstoffzellen werden in die nativen B25-MOL-Zellen zunächst vier Expressionskassetten (CD80, CD154, GM-CSF, IL-7) mittels Elektroporation eingeschleust, anschließend werden die Zellen mit 100 Gy bestrahlt und bis zur Aufarbeitung und Bereitstellung des Wirkstoffes für einen Patienten tiefgefroren (Abbildung 4.1). Das resultierende zelluläre Genexpressionsprofil der Wirkstoffzellen setzt sich zusammen aus dem basalen B25-MOL-spezifischen Expressionsmuster, modifiziert durch i) die Expression der vier eingebrachten MIDGE®-DNA-Vektoren, ii) zelluläre Reaktionen auf die verschiedenen physikalischen Stressparameter, denen die Zellen während des Herstellungsprozesses ausgesetzt sind, z.B. durch die Transfektion oder die anschließende Bestrahlung, und iii) Veränderungen der Expression, die sich durch die zelluläre Adaptation auf die Effekte aus i) und ii) ergeben.



**Abbildung 4.1 Ablauf des Herstellungsprozesses zur Generierung der Wirkstoffzellen**

Da eine Manipulation von Zellen, egal welcher Art, als ungerichtet angesehen werden muss, ist es das Ziel der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Analysen zu ermitteln, welche Effekte der Herstellungsprozess auf die verwendeten Zellen hat und wie sich die Überexpression der vier transfizierten Expressionskassetten auf das übrige Expressionsprofil der Zellen auswirkt. Diese Daten sollen die Grundlage für die weitere Optimierung und Fortentwicklung dieser zellbasierten Tumorstoffe bilden.

### 4.1 Optimierung der Gentransfer-Bedingungen

Um die nachfolgenden Expressionsanalysen durchführen zu können, muss zunächst geeignetes Probenmaterial generiert werden. Für die Herstellung der Wirkstoffzellen wird eine humane Nierenkarzinomzelllinie verwendet, die in der Firma Mologen AG aus Tumormaterial eines Patienten etabliert wurde. In diese als B25-MOL bezeichnete Nierenkarzinomzelllinie werden im Rahmen des Herstellungsprozesses vier verschiedene MIDGE®-DNA-Vektoren eingeschleust; nach Abschluss des Herstellungsprozesses werden diese Zellen dann als Wirkstoffzellen bezeichnet. Die für die Transfektion verwendeten MIDGE®-DNA-Vektoren

enthalten jeweils eine der Expressionskassetten für humanes CD80, CD154, IL-7 und GM-CSF (Tabelle 2.3 MIDGE®-DNA-Vektoren; S.36).

Da sich die B25-MOL-Zellen nicht zu 100 % mit den verwendeten MIDGE®-DNA-Vektoren transfizieren lassen, es jedoch von essentieller Bedeutung ist, mit einer möglichst reinen Population transfizierter Zellen die Expressionsanalysen durchzuführen, wird zunächst versucht die Transfektionsbedingungen und die Einsatzmenge der Vektoren sowie deren Mengenverhältnis in Richtung einer maximalen Expression aller vier Expressionskassetten zu verändern.

#### **4.1.1 Transfektionsparameter und Mengen an Vektor-DNA in Einzeltransfektionen**

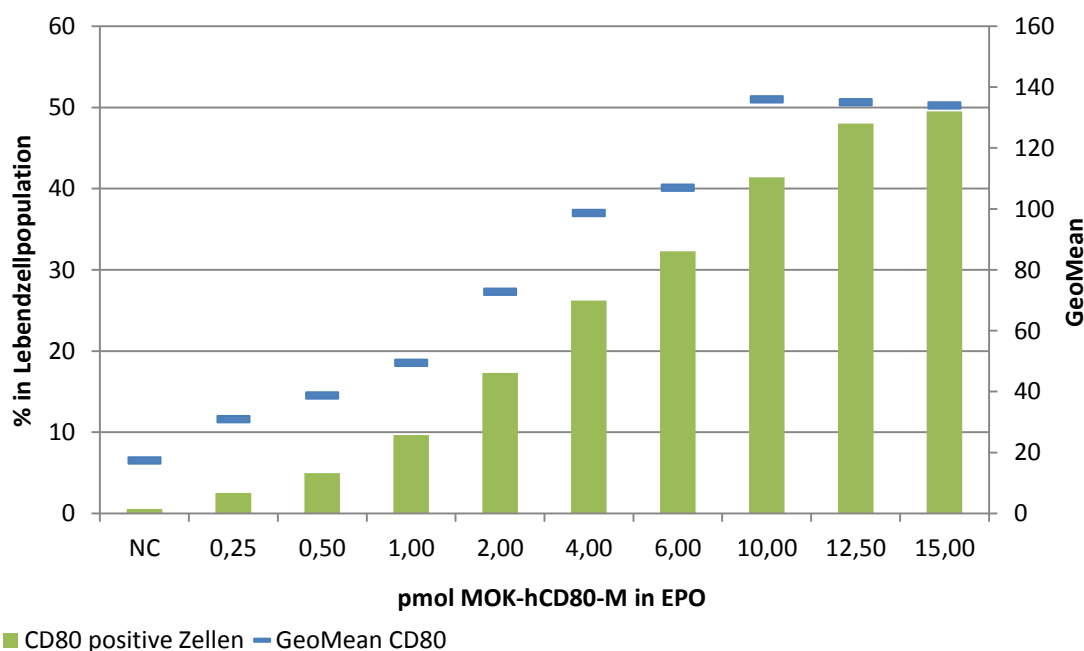
Die Effizienz einer Elektroporation hängt nicht zuletzt von der Transfizierbarkeit der verwendeten Zellen ab. So sind für verschiedene Zellen ganz unterschiedliche Parametereinstellungen notwendig, um möglichst viele Zellen zu transfizieren, ohne dabei zu viele Zellen durch die Elektroporation so zu schädigen, dass sie absterben. Da es sich hier um keine kommerzielle Zelllinie handelt, müssen die erforderlichen Elektroporationsparameter empirisch ermittelt werden (Tun et al., 2010). Dafür kann zunächst auf bereits vorhandene Daten zurückgegriffen werden, die im Rahmen einer Bachelorarbeit erarbeitet wurden (Klünder et al., 2008). Ein besonderes Augenmerk wird zunächst auf die angelegte Spannung und die Kapazität gelegt. Die entsprechend durchgeführten Versuchsreihen ergeben für folgende Elektroporationsparameter die besten Transfektionsergebnisse: eine Spannung von 270 V bei einer Kapazität von 1200 µF. Die Elektroporation wird in einem Elektroporationsvolumen von 500 µl, in Elektroporationsküvetten mit einem Elektrodenabstand von 4 mm durchgeführt.

Darauf aufbauend wird anschließend die Menge an Vektor-DNA bestimmt, welche zu einem möglichst hohen Anteil transfizierter Zellen bei einem geringen Anteil an toten Zellen führt. Dazu werden die B25-MOL-Zellen unter Verwendung jeweils einer der vier verwendeten MIDGE®-DNA-Vektoren mit steigender DNA-Menge transfiziert und anschließend für 4 h inkubiert. Jeweils  $2 \times 10^6$  Zellen werden in 500 µl Transfektionsmedium mit 0,25 bis 15,0 pmol MOK-hCD80-M versetzt, elektroporiert und in 6-Well-Platten ausgelegt. Die Expression der beiden Oberflächenproteine CD80 und CD154 wird mit Hilfe der direkten Antikörperfärbung und anschließender durchflusszytometrischen Analyse nachgewiesen. Tote und apoptotische Zellen werden durch Zugabe von Propidiumiodid identifiziert und für die statistische Auswertung von den lebenden Zellen diskriminiert. Innerhalb der Population der lebenden



Zellen wird zwischen den CD80- bzw. CD154-exprimierenden und den nicht transfizierten Zellen unterschieden. Zusätzlich wird mittels direkter Antikörperfärbung und durchflusszytometrischen Analyse der Geomean der CD80- bzw. CD154-exprimierenden Zellpopulation ermittelt, anhand dessen eine Aussage möglich ist, wie viel des jeweiligen Antigens auf den Zellen exprimiert wird.

In Abhängigkeit der eingesetzten MIDGE®-DNA-Vektor-Menge kann eine steigende Oberflächenexpression von CD80 nachgewiesen werden (Abbildung 4.2). In der Lebendzellpopulation werden zwischen 2,5 % CD80<sup>+</sup> Zellen bei einem Einsatz von 0,25 pmol MOK-hCD80-M und 49,5 % CD80<sup>+</sup> Zellen, bei einem Einsatz von 15,0 pmol MOK-hCD80-M erreicht.

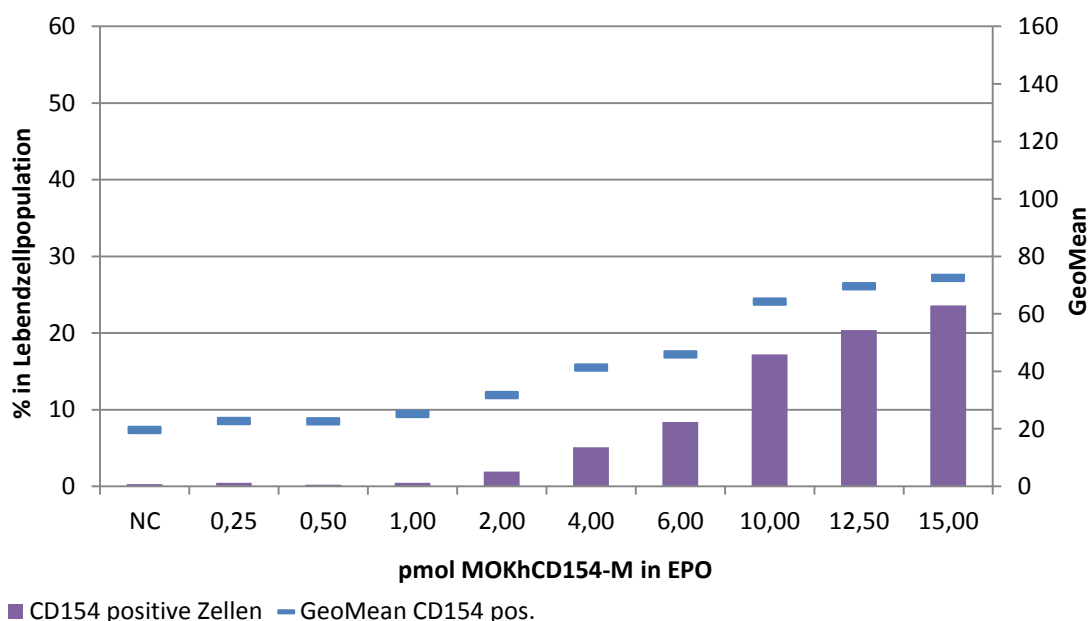


**Abbildung 4.2 Konzentrations-Wirkungsbeziehung der CD80-Expression, 4 h nach Elektroporation**

Neben einer Negativkontrolle (NC, Zellen mit 10 µg Salmon Sperm elektroporiert), werden, mittels Elektroporation, steigende Mengen des MIDGE®-DNA-Vektors MOK-hCD80-M in native B25-MOL-Zellen eingebracht. Nach einer vierstündigen Inkubationsphase unter Kultivierungsbedingungen (37°C, 5 % CO<sub>2</sub>, 90 % Luftfeuchtigkeit) werden die Zellen geerntet. Mittels direkter Antikörperfärbung und durchflusszytometrischer Analyse wird anschließend das exprimierte CD80 an der Zelloberfläche nachgewiesen. Dargestellt ist der prozentuale Anteil sowie der Geomean der CD80-exprimierenden Zellen in der Lebendzellpopulation.

Auch für die Expression von CD154 wird eine Abhängigkeit der Oberflächenexpression von der eingesetzten MIDGE®-DNA-Vektor-Menge beobachtet (Abbildung 4.3). Die Durchführung der Optimierung der Oberflächenexpression von CD154 erfolgt analog zur CD80-Oberflächenexpression. Nach der vierstündigen Inkubationsphase werden in der durchflusszytometrischen Analyse 0,2 bis 23,6 % der lebenden Zellen als CD154<sup>+</sup> detektiert. Insgesamt liegen sowohl der Anteil der CD154<sup>+</sup> Zellen wie auch die Menge der CD154-

Moleküle pro Zellen deutlich unterhalb der der CD80-exprimierenden Zellen. Auch durch eine weitere Steigerung der eingesetzten MIDGE®-DNA-Vektor-Menge in die Transfektion können für die Oberflächenexpression von CD154 keine mit der CD80-Expression vergleichbaren Werte erreicht werden.

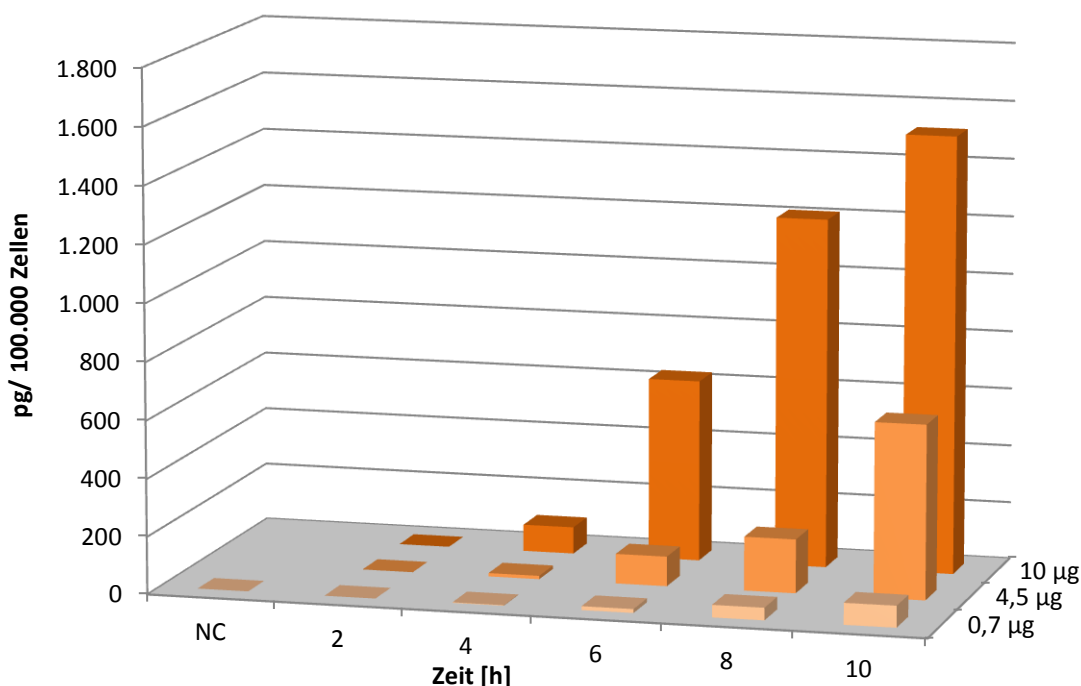


**Abbildung 4.3 Konzentration-Wirkungsbeziehung der CD154-Expression, 4 h nach Elektroporation**

Neben einer Negativkontrolle (NC), werden, mittels Elektroporation, steigende Mengen des MIDGE®-DNA-Vektors MOK-hCD154-M in native B25-MOL-Zellen eingebracht. Nach einer vierstündigen Inkubationsphase unter Kultivierungsbedingungen (37°C, 5 % CO<sub>2</sub>, 90 % Luftfeuchtigkeit) werden die Zellen geerntet. Mittels direkter Antikörperfärbung und durchflusszytometrischer Analyse wird anschließend das exprimierte CD154 an der Zelloberfläche nachgewiesen.

Der Nachweis der Zytokine IL-7 und GM-CSF, die von den transfizierten Zellen sezerniert werden, erfolgt mittels Duoset ELISA (R&D) aus Zellkulturüberstand. Dazu werden  $2 \times 10^6$  Zellen mit unterschiedlichen Mengen der Zytokin-kodierenden MIDGE®-DNA-Vektoren transfiziert. Nach der Elektroporation in einem Volumen von 1 ml Normalmedium auf 12-Well-Platten ausgelegt und für insgesamt 10 h inkubiert. Im Abstand von jeweils 2 h wird der Zellkulturüberstand vorsichtig abgenommen, abzentrifugiert (2-mal 3 min  $10.000 \times g$ ) und bei -80°C tiefgefroren. Die Zellen werden geerntet und gezählt, um eine Aussage darüber treffen zu können, von wie vielen Zellen die quantifizierten Zytokin-Mengen in den Überstand sezerniert wurden. Daraus kann sowohl eine Abhängigkeit der nachweisbaren Zytokin-Menge von der eingesetzten Menge des MIDGE®-DNA-Vektors, als auch von der Inkubationszeit nach der Transfektion festgestellt werden. Für beide Zytokine kann nachgewiesen werden, dass mit steigender Menge an eingesetztem MIDGE®-DNA-Vektor und zunehmender Inkubationszeit die Menge an nachweisbaren Zytokin stetig ansteigt.

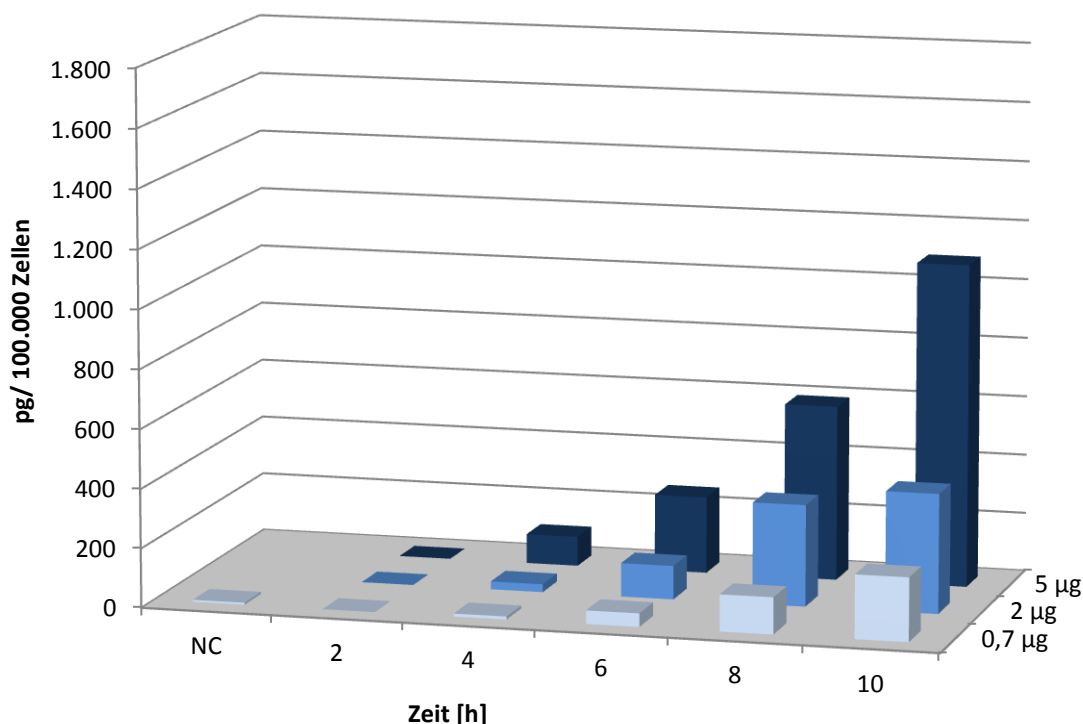
Für den Nachweis von IL-7 im Zellkulturüberstand werden die B25-MOL-Zellen mit 0,7 µg, 4,5 µg und 10 µg MOK-hIL-7-M transfiziert und wie oben beschrieben verfahren. Die höchsten Zytokinmengen werden nach der Transfektion mit 10 µg MOK-hIL-7-M detektiert. Sie liegen zwischen 90 pg/  $1 \times 10^5$  Zellen 2 h nach der Transfektion bzw. 1.500 pg/  $1 \times 10^5$  Zellen, nach 10 h Inkubation (Abbildung 4.4).



**Abbildung 4.4 Konzentration-Wirkungsbeziehung/ Kinetik der IL-7-Expression**

Neben einer Negativkontrolle (NC), werden native B25-MOL-Zellen mittels Elektroporation mit drei unterschiedlichen Mengen des MIDGE-Vektors MOK-hIL-7-M transfiziert. Die Zellen werden anschließend unter Kulturbedingungen für 2 – 10 h inkubiert. Im Abstand von zwei Stunden wird der Zellkulturüberstand geerntet, die Zellen gezählt und die Menge an IL-7 im Kulturüberstand mittels ELISA ermittelt. Das Diagramm zeigt die ermittelte Menge an IL-7 bezogen auf 100.000 Zellen an.

Der Nachweis von GM-CSF im Zellkulturüberstand wird analog zu IL-7 durchgeführt. An dieser Stelle werden 0,7 µg, 2 µg und 5 µg des MOK-hGM-CSF-M in die B25-MOL-Zellen transfiziert und analog verfahren. Für alle drei eingesetzten Mengen an MIDGE®-DNA-Vektor steigt mit zunehmender Inkubationszeit die Menge an GM-CSF pro  $1 \times 10^5$  Zellen. Die höchste Konzentration wird mit einer transfizierten DNA-Menge von 5 µg erreicht, sie liegt zwischen 100 pg/  $1 \times 10^5$  Zellen 2 h nach der Transfektion und 1.100 pg/  $1 \times 10^5$  Zellen 10 h nach der Transfektion (Abbildung 4.5). Entsprechend besteht auch für GM-CSF ein linearer Zusammenhang der Expression mit der eingesetzten Menge des MIDGE®-DNA-Vektor und der Länge der Inkubationsphase.



**Abbildung 4.5 Konzentration-Wirkungsbeziehung/ Kinetik der GM-CSF-Expression**

Neben einer Negativkontrolle (NC), werden native B25-MOL-Zellen, mittels Elektroporation, mit drei unterschiedlichen Mengen des MIDGE-Vektors MOK-hGM-CSF-M transfiziert. Die Zellen werden anschließend unter Kulturbedingungen für 2 – 10 h inkubiert. Im Abstand von zwei Stunden wird der Zellkulturüberstand geerntet, die Zellen gezählt und die Menge an GM-CSF im Kulturüberstand mittels ELISA ermittelt. Das Diagramm zeigt die berechnete Menge an GM-CSF pro 100.000 Zellen.

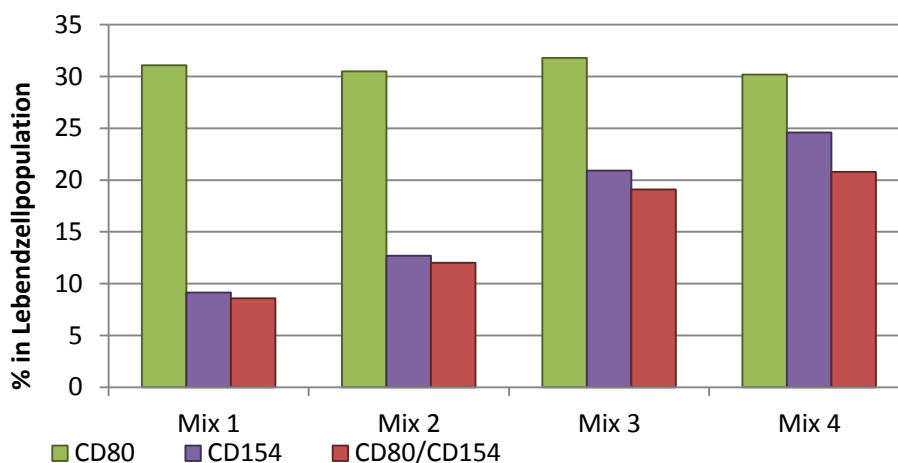
Anhand der ermittelten Expressionsdaten für die Einzeltransfektion wird in den folgenden Experimenten versucht, das Verhältnis der einzelnen Vektoren im MIDGE®-Mix für die vierfach Transfektion zur Generierung der Wirkstoffzellen weiter zu optimieren, indem die eingesetzten Vektormengen im MIDGE®-DNA-Mix verändert werden.

#### 4.1.2 Vektor-DNA-Mengenverhältnisse im Mix der vierfach Transfektion

Die Generierung der Wirkstoffzellen aus den nativen B25-MOL-Zellen erfolgt unter Verwendung eines MIDGE®-Vektor-Mixes, bestehend aus MOK-hCD80-M, MOK-hCD154-M, MOK-hIL-7-M und MOK-hGM-CSF-M. Die Expression jeder Komponente wird jedoch nicht nur durch die transfizierte Menge des entsprechenden MIDGE®-DNA-Vektors beeinflusst, sondern auch durch die Menge der drei anderen DNA-Vektoren. Ziel der folgenden Versuche ist es, einen MIDGE®-Vektor-Mix zusammenzustellen, durch den für jede transfizierte Expressionskassette möglichst viele Zellen sowohl CD80 als auch CD154 exprimieren und gleichzeitig möglichst große Mengen beider Zytokine sezernieren. Dazu werden die vier MIDGE®-DNA-Vektoren in unterschiedlichen Verhältnissen gemischt, in die B25-MOL-Zellen

transfiziert und anschließend die resultierende Proteinexpression mittels direkter Antikörperfärbung und durchflusszytometrischer Analyse bzw. ELISA analysiert.

Bei der Verwendung des ursprünglichen MIDGE®-Mixes (Masseverhältnis 2:2:1:1; MOK-hCD80-M, MOK-hCD154-M, MOK-hIL-7-M, MOK-hGM-CSF-M) liegt der Anteil der CD80-exprimierenden Zellen 2-5fach höher gegenüber den CD154-exprimierenden Zellen. Aus diesem Grund wird die Vektormenge von MOK-CD80-M im Mix im Folgenden reduziert, während die Menge an MOK-hCD154-M im Mix erhöht wird. Durch diese Modifikation nimmt zwar der Anteil der CD80-exprimierenden Zellen geringfügig ab, der Anteil der CD154-exprimierenden Zellen kann so erfolgreich gesteigert werden, so dass die Anzahl CD80<sup>+</sup>/CD154<sup>+</sup> Zellen deutlich zunimmt (Abbildung 4.6). Ein Massenmengenverhältnis der beiden Vektoren MOK-hCD80-M und MOK-hCD154-M von 1:5 zeigt insgesamt den höchsten Anteil CD80<sup>+</sup>/CD154<sup>+</sup> Zellen (Abbildung 4.6, Mix 4, 20,8 % CD80<sup>+</sup>/CD154<sup>+</sup> Zellen).

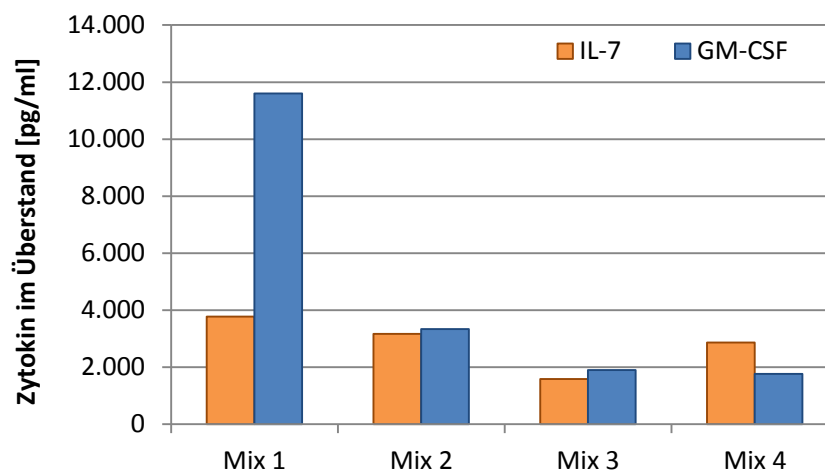


**Abbildung 4.6 Zelloberflächenexpression CD80 und CD154, 4 h nach Elektroporation**

Ausgehend vom ursprünglichen MIDGE®-Vektor-Massenmengenverhältnis (1:1:2:2; Mix 1) werden die Mengen der beiden MIDGE® Vektoren MOK-hCD80-M und MOK-hCD154 variiert. Für den Mix 2 (1:2:2:1) wird die Menge an CD154 kodierendem MIDGE® verdoppelt, während Mix 3 (1:3:1:1) die dreifache Menge MOK-hCD154-M enthält. In Mix 4 wird die 5fache Menge des CD154-kodierenden MIDGE® gegenüber der einfachen Menge des CD80-kodierenden MIDGEs verwendet (1:5:2:0,5). Nach der Transfektion werden die Zellen für 4 h bei 37 °C inkubiert und anschließend die beiden Oberflächenantigene CD80 und CD154 mittels direkter Antikörperfärbung und durchflusszytometrischen Analyse nachgewiesen. Dargestellt ist jeweils der Anteil transfizierter Zellen in der Lebendzellpopulation.

Gleichzeitig werden auch die eingesetzten Mengen der MIDGE®-DNA-Vektoren MOK-hIL-7-M und MOK-hGM-CSF-M variiert. Die detektieren Mengen der Zytokine IL-7 und GM-CSF im Zellkulturüberstand weisen einen direkten Zusammenhang zwischen der eingesetzten Vektormenge und der daraus resultierenden Menge an produzierten Zytokin auf. Für beide bestätigt sich die lineare Abhängigkeit der jeweils transfizierten Vektormenge mit der detektierbaren Proteinmenge im Zellkulturüberstand. Allerdings wird beim Einsatz einer vergleichbaren Vektormenge (Mix 1, jeweils 6,7 µg MIDGE) deutlich mehr GM-CSF von den

Zellen sezerniert, als IL-7 (Abbildung 4.7). Eine geringere Menge des GM-CSF-kodierenden MIDGE®-DNA-Vektors führt zu einer deutlichen Reduktion der nachweisbaren Menge an GM-CSF im Zellkulturüberstand. Dies scheint jedoch keine positiven Auswirkungen auf die Expression von IL-7 oder eines der beiden Oberflächenproteine zu haben.



**Abbildung 4.7 IL-7 und GM-CSF im Zellkulturüberstand, 4 h nach Elektroporation**

Ausgehend von den ursprünglich verwendeten MIDGE®-DNA-Vektor Massenmengenverhältnis (2:2:1:1) werden auch die eingesetzten MIDGE®-DNA-Vektormengen der Zytokin-kodierenden MIDGE®-DNA-Vektoren variiert. Während in Mix 1 die gleiche Masse an Zytokin-kodierender Vektoren transfiziert werden, wird die Menge des GM-CSF-kodierenden Vektors in Mix 2 halbiert (1:2:2:1). In Mix 3 ist die transfizierte Menge beider Vektoren wieder gleich (1:3:1:1), jedoch nur halb so groß wie in Mix 1. In Mix 4 ist etwa 4 mal so viel IL-7-kodierender Vektor enthalten, wie GM-CSF-kodierender Vektor (1:5:2:0,5).

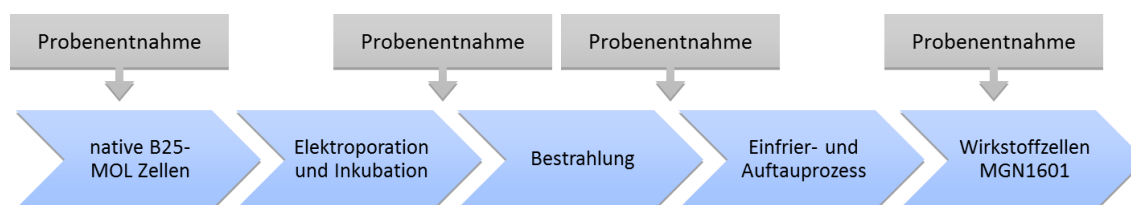
In den folgenden Versuchen soll die Menge der beiden Zytokine-kodierenden MIDGE®-DNA-Vektoren im Mix so variiert werden, dass möglichst viel der beiden Zytokine von den transfizierten B25-MOL-Zellen sezerniert wird. Dazu wird jeweils die Menge eines dieser MIDGE®-DNA-Vektoren variiert, während die eingesetzten Mengen der drei anderen Vektoren jeweils unverändert bleiben.

Generell wirken sich größere Mengen der beiden Zytokin-kodierenden MIDGE®-DNA-Vektoren positiv auf die entsprechende Proteinexpression aus, jedoch verringert sich dadurch die Expression der beiden Oberflächenproteine teilweise erheblich. Andererseits unterliegt die Proteinexpression der beiden Zytokine größeren Schwankungen als die der beiden Oberflächenmoleküle (nicht gezeigt); daher ist es extrem schwierig, ein optimales Verhältnis der vier MIDGE®-DNA-Vektoren festzulegen.

Für die Analysen der Genexpression wird schließlich ein Vektorverhältnis eingesetzt, das in mehreren Versuchen zu guten Expressionsergebnissen für alle vier Expressionskassetten führt. Entsprechend werden die vier MIDGE®-DNA-Vektoren in einem Verhältnis 1:5:2:2 (MOK-hCD80-M; MOK-hCD154-M; MOK-hIL-7-M; MOK-hGM-CSF-M) eingesetzt. Für die Transfektion von  $1 \times 10^7$  B25-MOL-Zellen werden jeweils 39 µg von diesem Vektorengemisch verwendet.

## 4.2 Generierung der RNA-Proben

Um den Einfluss der verschiedenen Schritte des Herstellungsprozesses auf die Genexpression der Wirkstoffzellen zu analysieren, ist es notwendig, Proben der Zellen an unterschiedlichen Punkten des Herstellungsprozesses zu entnehmen. Die Herstellung der Wirkstoffzellen lässt sich in mehrere Prozessschritte unterteilen. Zunächst erfolgt die Expansion der nativen B25-MOL-Zellen, um eine ausreichende Anzahl an Zellen zu erhalten. Nach dem Abernten der Zellen werden jeweils  $1 \times 10^7$  native B25-MOL-Zellen mit dem vorbereiteten Mix der MIDGE®-DNA-Vektoren, bestehend aus MOK-hCD80-M, MOK-hCD154-M, MOK-hIL-7-M und MOK-hGM-CSF-M (1:5:2:2), versetzt und elektroporiert. Im Anschluss an eine Inkubationsphase von 90 bis 240 min werden die Zellen mittels  $\gamma$ -Strahlen (100 Gy) teilungsunfähig gemacht. Die durch die Bestrahlung verursachte partielle Zerstörung der DNA-Struktur verursacht eine Unterbrechung des Zellzyklus, die die weitere Proliferation der Zellen verhindert. Der daran anschließende Einfrierprozess dient der Lagerung der Wirkstoffzellen bis zum Einsatz im Patienten. Die Abbildung 4.8 zeigt den Ablauf des Herstellungsprozesses und die Punkte, an denen Proben für die Expressionsanalysen der Zellen entnommen werden. Neben nativen B25-MOL-Zellen werden nach dem jeweils folgenden Herstellungsschritt weitere Zellen zur Generierung der RNA-Proben entnommen.



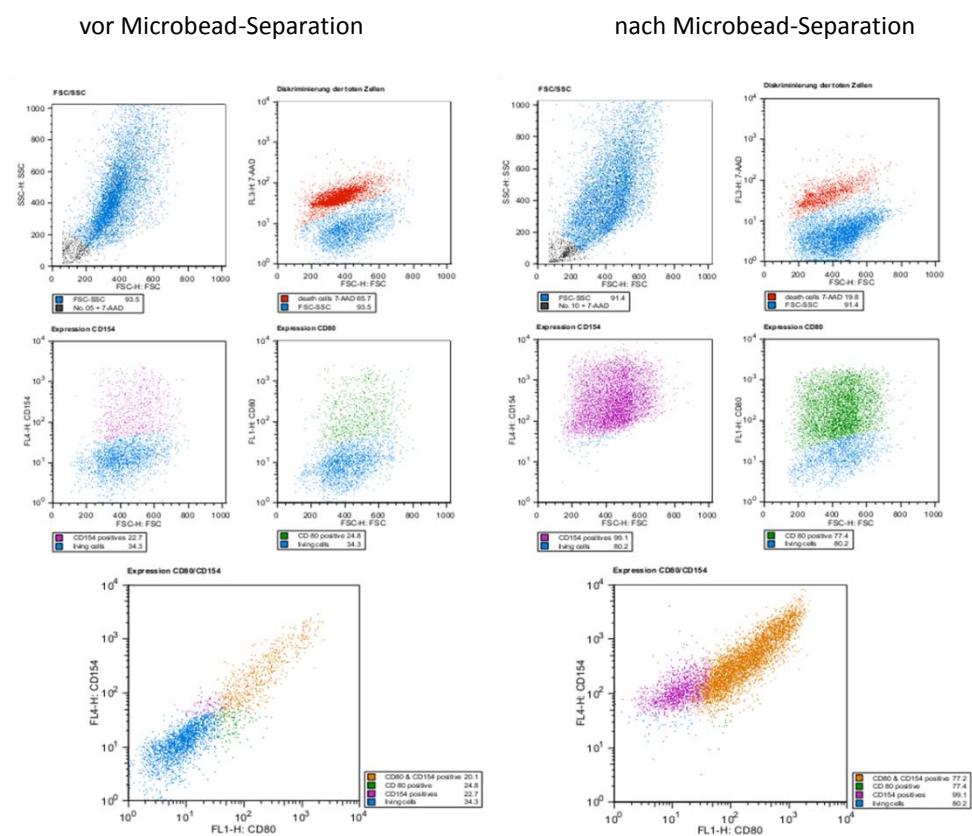
**Abbildung 4.8 Herstellungsprozess und Probenentnahme für Microarray-Experimente**

Der Herstellungsprozess von den nativen B25-MOL-Zellen zu den Wirkstoffzellen wird in mehrere Abschnitte unterteilt. Die erste Probenentnahme erfolgte vor der Elektroporation, d. h. native B25-MOL-Zellen stellen die erste Probe dar. Nach der Elektroporation der vier MIDGE®-DNA-Vektoren und der anschließenden Inkubationsphase erfolgte die zweite Probenentnahme. Eine weitere Probenentnahme zur RNA-Extraktion erfolgte nach der Bestrahlung der Zellen, sowie nach dem Einfrier- und Auftauprozess, im Anschluss einer weiteren Inkubationsphase von 4 - 6 h.

Ein Teil der nativen B25-MOL-Zellen wird ohne Zugabe des MIDGE®-DNA-Vektoren elektroporiert, um später die Gene identifizieren zu können, die allein durch den Transfektionsvorgang in ihrer Expression moduliert werden. Weitere Zellproben werden im Anschluss an die Inkubationsphase der Elektroporation sowie nach der Bestrahlung der Zellen entnommen. Für die Genexpressionsanalyse der Wirkstoffzellen werden die tiefgefrorenen Zellen zunächst aufgetaut, in PBS aufgenommen und für 8 h auf Eis inkubiert, um dies Zeitspanne zu simulieren, die für den Transportweg benötigt wird. Anschließend werden die Zellen für weitere 4 h unter Zellkulturbedingungen in Normalmedium inkubiert, in der

Annahme, dass die Zellen an diesem Punkt am ehesten das Expressionsprofil besitzen, welches sie im Patienten entwickeln. Während die nativen B25-MOL-Zellen direkt der Gesamt-RNA Isolation zugeführt werden können, ist es notwendig, die lebenden, transfizierten Zellen der anderen Proben mit zusätzlichen Methoden anzureichern, da der Anteil an lebenden CD8<sup>+</sup> und CD154<sup>+</sup> Zellen nach vierstündiger Inkubation (vgl. Abbildung 4.6, Mix 4) unter 50 % der Lebendzellpopulation liegt.

Zur Anreicherung der transfizierten B25-MOL-Zellen wird die magnetische Zellseparation der Firma Miltenyi genutzt (vgl. Abbildung 4.9, vor und nach Microbead Separation). Zunächst werden die toten und apoptotischen Zellen mit Hilfe des „Dead Cell Removal Kit“ (Miltenyi Biotec) eliminiert. Während der Separation verbleiben diese an die magnetischen Microbeads gebundenen Zellen im magnetischen Feld der Separationssäule, während die lebenden Zellen diese ungehindert passieren und als Lebendzellpopulation aufgefangen werden können.



**Abbildung 4.9** Microbead-basierte Sortierung transfizierter B25-MOL-Zellen auf die Expression von CD80 und CD154 unter Verwendung des „Anti-FITC MultiSort Kit“.

Dargestellt sind Dotplot-Abbildungen der durchflusszytometrischen Analyse, vor der Microbeads-basierten Sortierung (links) und nach Sortierung von vierfach transfizierten B25-MOL-Zellen (rechts). Lebende Zellen sind blau dargestellt, tote Zellen rot. Die Zellen, die CD80 an ihrer Oberfläche exprimieren und  $\alpha$ CD80-FITC-Antikörper gebunden haben, sind grün markiert, während CD154 exprimierende Zellen, die  $\alpha$ CD154-APC-Antikörper gebunden haben, violett markiert sind. Doppelt positive Zellen (CD80<sup>+</sup> und CD154<sup>+</sup>) sind orange dargestellt.



In zwei aufeinanderfolgenden Separationsschritten werden die lebenden Zellen anschließend unter Verwendung des „*Anti-FITC MultiSort Kit*“ (Miltenyi Biotec) und des „*CD154 Microbead Kit*“ (Miltenyi Biotec) auf die Expression von CD80 und CD154 sortiert. Im ersten Schritt erfolgt die Separation der CD80 exprimierenden Zellen, mit Hilfe eines FITC-konjugierten  $\alpha$ CD80 Antikörper und  $\alpha$ FITC-Microbeads. Diese lebenden CD80-exprimierenden Zellen werden dann in einem folgenden Schritt, unter Verwendung eines Biotin-gekoppelten  $\alpha$ CD154 Antikörper und  $\alpha$ Biotin-Microbeads, auf die Expression von CD154 sortiert. Durch diese aufeinanderfolgenden Separationsschritte kann sichergestellt werden, dass die Zellpopulation nach dem letzten Separationsschritt sowohl CD80 als auch CD154 exprimieren. Der Anteil der CD80<sup>+</sup>/CD154<sup>+</sup> Zellen wird auf diese Weise von  $19,9 \pm 0,7$  % auf  $72,6 \pm 11,9$  % erhöht. Die Analyse der selektierten Zellen nach Abschluss der Separation lässt vermuten, dass zwar nahezu alle Zellen CD154 exprimieren, die Anreicherung der CD80-exprimierenden Zellen jedoch nicht so effizient ist, da sich ein Teil der Zellen nach der Separation nicht mit einem  $\alpha$ CD80 Antikörper färben lassen. Dies ist allerdings nicht auf eine schlechtere Effizienz der Selektion zurückzuführen, sondern vermutlich vielmehr darauf, dass die CD80-Epitope auf den Zellen bereits durch Antikörper aus dem Separationsschritt abgedeckt sind, diese durchflusszytometrisch jedoch nicht mehr nachweisbar sind, weil eventuell das Fluorochrom nicht mehr vorhanden oder funktionsuntüchtig ist. Durchflusszytometrische Analysen direkt nach der Selektion CD80-exprimierender Zellen zeigen, dass in jedem Fall weit über 90 % der separierten Zellen CD80 exprimieren. Daher ist an dieser Stelle davon auszugehen, dass nahezu alle Zellen die CD154 exprimieren, auch CD80 exprimieren.

Der höhere Anteil an CD80<sup>+</sup>/CD154<sup>+</sup> Zellen durch die verbesserten DNA-Mengenverhältnisse im Mix der MIDGE<sup>®</sup>-DNA-Vektor ermöglichen die beiden aufeinanderfolgenden Selektionsschritte für CD80 und CD154 zu einem zusammenzufassen. Dazu werden zunächst, wie bereits beschrieben, die toten und apoptotischen Zellen mit Hilfe des „*Dead Cell Removal Kit*“ aus der Gesamtzellpopulation eliminiert. Anschließend werden die Zellen mit Biotin-konjugierten  $\alpha$ CD80 bzw.  $\alpha$ CD154 Antikörpern markiert. Mit Hilfe der  $\alpha$ Biotin-Microbeads aus dem „*CD154 Microbead Kit*“ erfolgt anschließend die Separation der CD80<sup>+</sup> und CD154<sup>+</sup> Zellen in einem Schritt. Im Gegensatz zum ersten Verfahren sind in der finalen, separierten Zellpopulation mehr Zellen vorhanden, die nur eines der beiden Antigene auf ihrer Zelloberfläche exprimieren. Da es sich jedoch maximal um 5 -10 % der sortierten Gesamtzellpopulation handelt, kann ein Einfluss auf die Expressionsdaten der Gesamtzellpopulation nahezu ausgeschlossen werden. Auf diese Weise kann eine Zellpopulation generiert werden, deren Anteil an CD80 bzw. CD154 exprimierenden Zellen bei  $83,8 \pm 2,6$  % liegt.

### 4.3 Quantität und Qualität der RNA-Proben

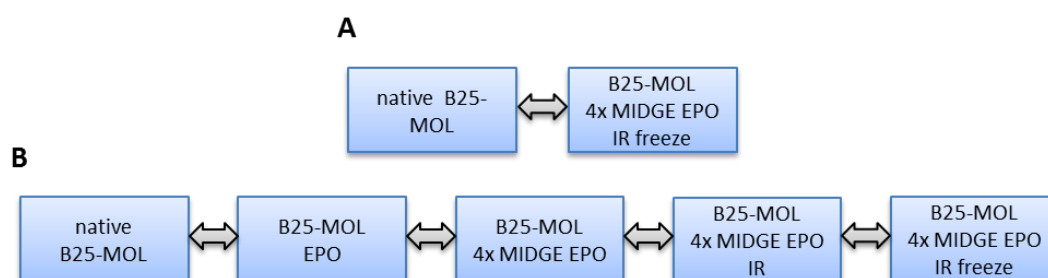
Die sortierten Zellen werden abzentrifugiert und daraus anschließend die Gesamt-RNA unter Verwendung von RNAzol® extrahiert. Die Qualität und Quantität der RNA wird mit Hilfe des Cary Varian photometrisch bestimmt. Die Konzentration der RNA-Proben soll über 0,2 µg/µl liegen und eine  $A_{260}/A_{280}$  Ratio  $> 1,8$  aufweisen, um den quantitativen und qualitativen Anforderungen für die folgende Microarray-Analyse zu genügen. Um den Grad der Degradierung der RNA feststellen zu können, wird von allen Proben zusätzlich eine elektrophoretische Auftrennung durchgeführt. Als Kriterium für eine geringe Degradation gilt eine deutliche Sichtbarkeit der rRNA-Banden im Elektrophoresegel. RNA-Proben bei denen die rRNA-Banden nur schwach oder gar nicht mehr sichtbar sind, werden aufgrund einer zu hohen Degradation von den folgenden Expressionsanalysen ausgeschlossen. In die folgenden mRNA-basierten Expressionsanalysen (Microarray, Taqman® basierte qPCR) werden ausschließlich RNA-Proben verwendet, die den angeführten Qualitäts- und Quantitätskriterien genügen.

### 4.4 Differentielle Expressionsanalyse unter Verwendung des Affymetrix Human GeneChip® ST 1.0

Die gentechnische Veränderung der B25-MOL-Zellen durch das Einbringen der vier MIDGE®-DNA-Vektoren sowie die weiteren Prozessschritte der Herstellung haben potentiell einen Einfluss auf das Expressionsmuster der Wirkstoffzellen. Anhand von Microarray-Analysen soll untersucht werden, inwieweit sich das Genexpressionsmuster der nativen B25-MOL-Zellen von dem der Wirkstoffzellen unterscheidet bzw. welchen Einfluss die einzelnen Herstellungsschritte haben. Ziel ist es, einzelne Gene oder Gruppen von Genen zu identifizieren, deren Expression sekundär zu den genetischen Manipulationen der Wirkstoffzellen beeinflusst wird und einen eigenen, dem der genetischen Manipulation superponierten Effekt auf das Wirkprinzip der Zellen haben könnten. Einige funktionelle Gengruppen sollen dabei eine besondere Beachtung finden, (i) Gene, die an der Apoptose beteiligt sind, (ii) Zytokine und Chemokine, (iii) Gene der Antigenprozessierung und Antigenpräsentation, (iv) Gene, die an der NK-Zellinteraktion beteiligt sind, sowie (v) tumorassoziierte Antigene (TAA).

Der für die Expressionsanalysen verwendete Microarray „Human GeneChip® ST 1.0“ der Firma Affymetrix bildet die Expressionsstärke von über 28.000 humanen Gene ab. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit werden insgesamt 10 Microarray-Experimente durchgeführt. Dabei wird jeder Herstellungsschritt beginnend mit den nativen B25-MOL-Zellen bis hin zu den

Wirkstoffzellen (vierfach transfiziert, bestrahlt und tiefgefroren) berücksichtigt (Abbildung 4.10). Für jeden Herstellungsschritt werden jeweils zwei, möglichst biologische Replikate analysiert.



**Abbildung 4.10 Versuchsaufbau Microarray**

Dargestellt sind die beiden Gruppen von Microarrays, die im Folgenden näher betrachtet werden. (A) zeigt die Analyse des Gesamtprozesses, in dem die nativen B25-MOL-Zellen den Wirkstoffzellen gegenübergestellt werden. (B) zeigt den Vergleich der einzelnen Prozessschritte untereinander.

Native B25-MOL-Zellen	-native B25-MOL
B25-MOL-Zellen elektroporiert, ohne Zugabe von Vektor DNA	-B25-MOL EPO
B25-MOL-Zellen vierfach transfiziert	-B25-MOL 4x MIDGE EPO
B25-MOL-Zellen vierfach transfiziert und bestrahlt	-B25-MOL 4x MIDGE EPO IR
Wirkstoffzellen (B25-MOL-Zellen vierfach transfiziert, bestrahlt und tiefgefroren)	-B25-MOL 4x MIDGE EPO IR freeze

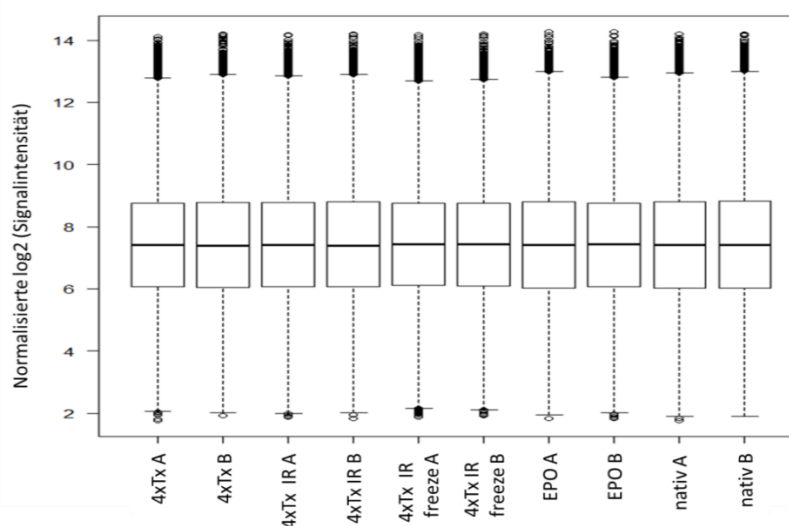
Um ein Gesamtbild der Modifikation des Genexpressionsmusters zu erhalten (Abbildung 4.10 A), werden im ersten Teil der Auswertung die Genexpressionslevel der nativen, unveränderten B25-MOL-Zellen denen der Wirkstoffzellen gegenübergestellt. Beim Vergleich der einzelnen Prozessschritte untereinander, dem zweiten Teil der Auswertung, dient der jeweils vorausgegangene Herstellungsschritt als Referenz für den Folgenden, so dass die Gene identifiziert werden, welche bedingt durch den betrachteten Herstellungsschritt eine Modifikation ihrer Expression erfahren (Abbildung 4.10 B).

Nach der Generierung der RNA-Proben werden jeweils 2 µg der isolierten Gesamt-RNA an das Labor für funktionelle Genomforschung der Charité (LFGC) übergeben, wo in Auftragsarbeit routinemäßig die Durchführung der Microarray-Experimente sowie die Umwandlung der Bilddaten in numerische Signalintensitäten erfolgt, welche ein Maß für die Expressionsstärke der Gene darstellen.

#### 4.4.1 Qualitätskontrolle, Präprozessierung und Filterung

Entsprechend des experimentellen Versuchsaufbaus wird aus den vom LFGC ausgelesenen Signalintensitäten der Gene der Einzelversuche ein Datenpaket zusammengestellt, welches die 10 zu analysierenden Microarrays zu einem Datensatz zusammenfasst. Dabei ist zu berücksichtigen, dass aus Labor-technischen Gründen immer nur sechs Microarray-Experimente parallel durchgeführt werden können. Die Replikate werden als solche gekennzeichnet und das Datenpaket unter Verwendung des Bioconductors zunächst der Präprozessierung zugeführt.

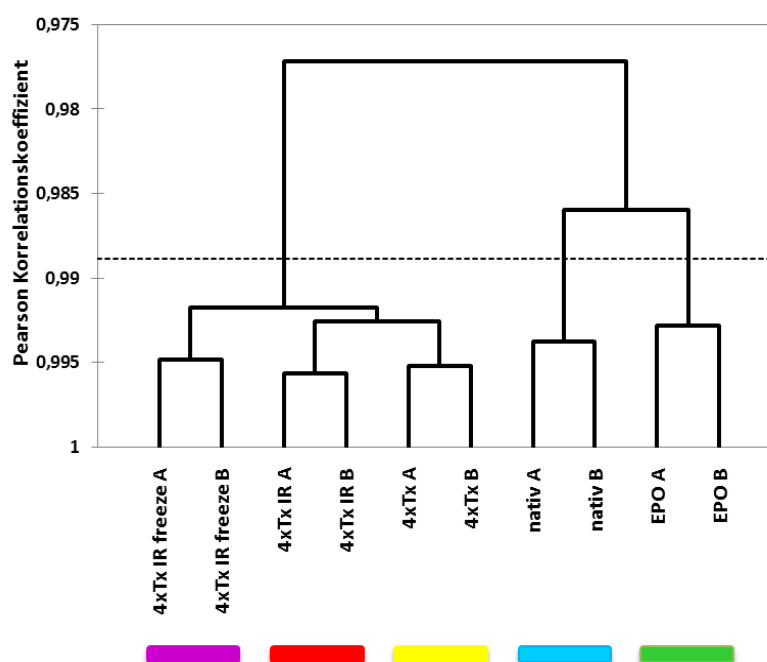
Die Präprozessierung der importierten Rohdaten erfolgt unter Anwendung des RMA-Algorithmus (Irizarry et al., 2003b), anschließend werden die Daten einer Qualitätskontrolle unterzogen, um unter den Microarray-Experimenten eventuelle Ausreißer zu identifizieren und gegebenenfalls aus dem Datensatz zu eliminieren (vgl. 3.3.2 Bildverarbeitung und Präprozessierung der Affymetrix-Daten; S.54). In Abbildung 4.11 wird jedes der analysierten Microarray-Experimente nach dem Normalisierungsprozess in einem Boxplot dargestellt. Dieser zeigt, dass die  $\log_2$ -Signalintensitäten aller analysierten Microarrays eine ähnliche Verteilung aufweisen, weshalb alle 10 Microarrays in die weiteren Analysen eingeschlossen werden können.



**Abbildung 4.11** Boxplot der normalisierten  $\log_2$  basierten Signalintensitäten

Diese Form der Darstellung ermöglicht eine übersichtliche graphische Darstellung großer Datenmengen, so dass Ausreißer-Experimente besser erkannt und eliminiert werden können. Die Linie in der Mitte der jeweiligen Rechtecke stellt den Median dar. Die Grenzen der Rechtecke umfassen das obere und untere Quartil. Die Querbalken am Ende der gestrichelten Linien beschreiben Maximum und Minimum der Verteilung, während Ausreißerwerte einzelner Sondensignale durch die ungefüllten Kreise ober- bzw. unterhalb des Maximums und Minimums repräsentiert werden.

Im Anschluss an die Präprozessierung der Daten wird eine hierarchische Clusteranalyse unter Berechnung des Pearson Korrelationskoeffizienten und eine Hauptkomponentenanalyse (3.3.2 Bildverarbeitung und Präprozessierung der Affymetrix-Daten; S.54) der normierten Daten durchgeführt. Sie dienen in erster Linie der Strukturierung großer Datensätze, um diese vereinfacht und anschaulich darzustellen. Sie ermöglichen außerdem einen ersten Überblick über den analysierten Datensatz, da durch sie eine erste Gruppierung der Versuchsproben ermöglicht wird. Die Ergebnisse dieser Analysen sind in Abbildung 4.12 und Abbildung 4.13 graphisch dargestellt.

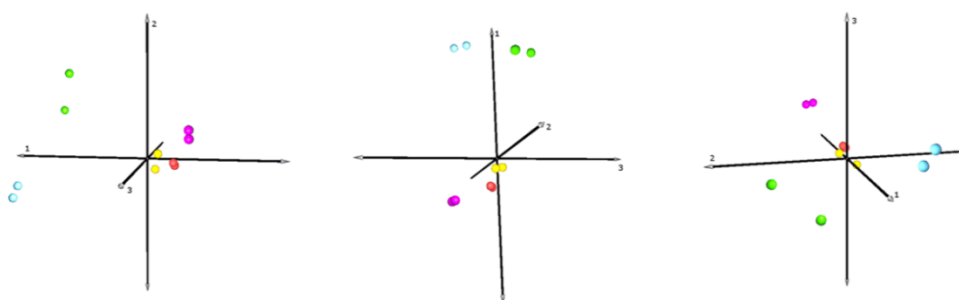


**Abbildung 4.12 Hierarchische Clusteranalyse.**

Mit Hilfe der hierarchischen Clusteranalyse kann die Distanz bzw. Ähnlichkeit zwischen den Versuchsproben bestimmt werden. Der hier berechnete Pearson Korrelationskoeffizient beschreibt einen linearen Zusammenhang der Proben, wobei ein Wert nahe 1,0 für eine große Ähnlichkeit steht, während sehr kleine Werte, nahe Null eine sehr geringe Ähnlichkeit der Proben beschreiben. Das hier dargestellte Dendrogramm enthält alle im Rahmen dieser Arbeit analysierten Microarrays. Die Replikate sind jeweils mit „A“ und „B“ bezeichnet. Außerdem werden die verschiedenen Schritte des Herstellungsprozesses mit einem Farbcode versehen (blau – native B25-MOL-Zellen, grün – elektroporierte Zellen ohne Zugabe von DNA, gelb – vierfach transfizierte Zellen, rot – vierfach transfiziert und bestrahlte Zellen, pink – vierfach transfiziert, bestrahlt und tiefgefrorene Zellen).

Die Daten der Clusteranalyse zeigen, dass sich die jeweiligen Versuchsreplikate am ähnlichsten sind. Sie weisen Korrelationskoeffizienten zwischen 0,9957 und 0,9928 auf. Weiterhin können zwei weitere übergeordnete Cluster identifiziert werden; einerseits die transfizierten Zellen (4xTx, 4xTx IR, 4xTx IR freeze) und andererseits die nicht transfizierten Zellen (nativ, EPO). Dies stellt einen ersten Hinweis auf ein verändertes Expressionsmuster der Zellen dar, welches über die Expression der vier eingebrachten Expressionskassetten hinausgeht, da eine Expressionsänderung in nur vier Genen nicht zu einer solch deutlichen Clusterbildung führt.

Auch bei der dreidimensionalen Darstellung der 10 Microarray-Experimente mit Hilfe der Hauptkomponentenanalyse liegen die jeweiligen Versuchsreplikate am engsten beieinander; ein deutlicher Hinweis auf ihre große Ähnlichkeit, da sie nur geringe Unterschiede in den Varianzen der analysierten Variablen (Signalintensitäten) aufweisen und aus diesem Grund eine ähnliche Position im dreidimensionalen Raum einnehmen, welcher durch die drei Hauptkomponenten beschrieben wird. Betrachtet man die erste Hauptkomponente, welche gleichzeitig die größte Streuung aufweist, lassen sich analog zur hierarchischen Clusteranalyse deutlich zwei Cluster voneinander unterscheiden, einerseits die nativen bzw. elektroporierten Versuchsproben (ohne Zugabe von Vektor-DNA; grüne und blaue Sphären, Abbildung 4.13) und andererseits die vierfach transfizierte Versuchsproben, zusammen mit denen, die im Anschluss an die Transfektion der vier Vektoren bestrahlt bzw. bestrahlt und tiefgefroren werden (gelbe, rote und pinkfarbene Sphären (Abbildung 4.13)).



**Abbildung 4.13 Hauptkomponentenanalyse**

Darstellung der 10 Microarrays mit Hilfe einer Hauptkomponentenanalyse. Die grünen Sphären stellen die Microarray-Daten aus den nativen Versuchsproben dar, die blauen Sphären die Microarrays aus den elektroporierten (ohne Vektorzugabe) Versuchsproben, gelb sind die Sphären, deren Versuchsproben mit den vier Vektoren transfiziert wurden, rot sind die Sphären, deren Versuchsproben nach der Transfektion bestrahlt wurden, und die pinkfarbenen Sphären stellen die Microarrays der Versuchsproben dar, die vierfach transfiziert, bestrahlt und tiefgefroren worden sind.

In einem letzten Schritt werden die Sonden-Sets um die stabil exprimierten Gene reduziert. Dabei werden Gene, die in allen analysierten Herstellungsschritten eine stabile Expression zeigen, aus dem Datensatz eliminiert. Für diesen Zweck wird an dieser Stelle der Interquantilabstand-Filter (IQR) verwendet, der im OnechannelGUI Paketes im Bioconductors implementiert ist. Dieser entfernt alle Sonden-Sets aus der Datenmatrix aller analysierten Microarray-Experimente, deren Signalintensitäten nur eine geringe Varianz über alle Versuchsproben aufweisen.

## 4.5 Analyse der differentiellen Genexpression: Vergleich der nativen B25-MOL-Zellen mit den Wirkstoffzellen

### 4.5.1 Identifizierung differentiell exprimierter Gene

Im Anschluss an die Qualitätskontrolle und Präprozessierung der Microarray-Expressionsdaten erfolgt die Identifizierung der differentiell exprimierten Gene. Unter Anwendung eines linearen Modells (*limma, linear model for microarray data*, (Smyth, 2004)) wird mit Hilfe der TopTable-Funktion im OnechannelGUI Softwarepaket des Bioconductors eine Liste der differentiell exprimierten Transkripte bzw. deren Sonden-Sets generiert. Transkripte innerhalb des „native B25-MOL-Zellen vs. Wirkstoffzellen“ Microarray-Datensatzes gelten als differentiell exprimiert wenn, i) eine relative Änderung der Expressionsstärke um das mind. dreifache vorliegt, ii) die Wahrscheinlichkeit für eine differentielle Expression  $\geq 50\%$  ist (B-Statistik) und iii) der p-Wert des statistischen Tests ein Signifikanzniveau  $\leq 0,05$  besitzt.

Anhand dieser Kriterien können 481 Sonden-Sets identifiziert werden, deren zugehörige Transkripte beim Vergleich der Expressionslevel der Gene der nativen B25-MOL-Zellen und der Wirkstoffzellen differentiell exprimiert werden. Nach Ausschluss von Sonden-Sets ohne bekannte Annotation und Bereinigung des Datensatzes redundanter Sonden-Sets bleiben 392 differentiell exprimierte Gene (403 Sonden-Sets), die in die funktionellen Analysen eingeschlossen werden. Dabei handelt es sich um 179 Gene mit einer mindestens dreifach erhöhten Expression und weiteren 213 Gene mit einer mindestens dreifach verminderten Expression. Zur bildlichen Darstellung der ermittelten Veränderungen des Expressionsprofil zwischen den nativen B25-MOL-Zellen und den Wirkstoffzellen werden die Sonden-Sets der differentiell exprimierten Gene einer hierarchischen Clusteranalyse unterzogen und werden hier als Heat Map (Abbildung 4.14) dargestellt.

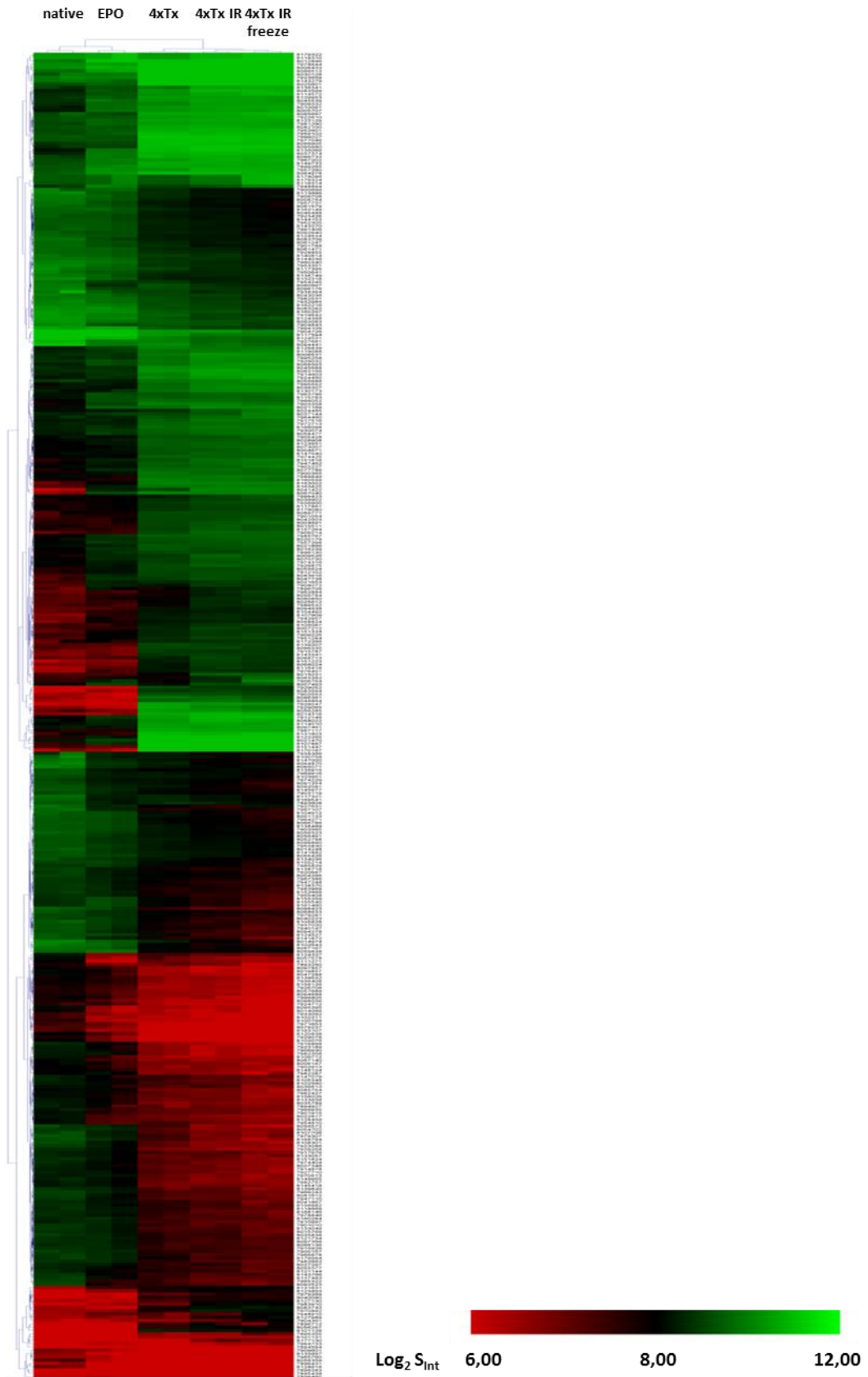


Abbildung 4.14 Heat Map. Genexpressionsprofil der 392 differentiell exprimierten Gene (403 Sonden-Sets)



#### 4.5.2 Funktionelle Gen-Annotationsanalyse

Die hohe Anzahl der differentiell exprimierten Gene macht es extrem schwierig, einzelne interessante Gene herauszufiltern, die bezüglich der vorliegenden Fragestellung von Bedeutung sind. In der Annahme, dass sich viele der regulierten Gene derselben funktionellen Gengruppe oder demselben Pathways zuordnen lassen, wird mit Hilfe von DAVID (*Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery*) eine funktionelle Gen-Annotationsanalyse durchgeführt. Diese ermöglicht die Identifizierung von überrepräsentierten funktionellen Gengruppen und Pathways anhand einer importierten Liste differentiell exprimierter Gene. Diese Web-basierte Analyse-Funktion greift dabei auf weitere Datenbanken zurück, in denen die funktionellen Gengruppen und Pathways hinterlegt sind. Auf diese Weise kann die Aussagekraft über die biologische Relevanz der Regulation eines Gens erhöht werden. Dies erleichtert die Auswahl relevanter Gene für eine weiterführende Analyse erheblich. Leider enthält keine einzelne dieser Datenbanken, die für die funktionelle Gen-Annotationsanalyse zur Verfügung stehen, alle Informationen bezüglich eines Pathways oder einer funktionellen Gengruppe. Aus diesem Grund werden mehrere Datenbanken als Grundlage für die funktionelle Gen-Annotationsanalyse genutzt, um eine möglichst große Anzahl der regulierten Gene einer funktionellen Annotation in einer Gengruppe - bzw. einem Pathway zuordnen zu können. Durch die Verwendung von DAVID ist es möglich, diese Analyse auf der Basis mehrerer Datenbanken durchzuführen; zudem werden die überrepräsentierten funktionellen Gengruppen der verschiedenen Kategorien nach ihrer Signifikanz sortiert. Letztlich können aus den überrepräsentierten funktionellen Gengruppen übergeordnete Kategorien zusammengestellt werden, so dass ein möglichst großer Anteil der tatsächlich an einem Pathway oder einer funktionellen Gengruppe beteiligten Gene in dieser funktionellen Gen-Annotationsanalyse berücksichtigt werden. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wird die funktionelle Gen-Annotationsanalyse entsprechend der vorliegenden Fragestellung auf die funktionellen Gengruppen der Gen-Ontologien GO (molekulare Funktion, biologischer Prozess, zelluläres Kompartiment) und die Pathways der KEEG (<http://www.genome.jp/kegg/>) und Reactome (<http://www.reactome.org/PathwayBrowser/>) Datenbanken begrenzt.

Anhand voreinstellbarer Parameter wie des EASE Score oder der Anzahl an Genen aus der importierten Liste, die innerhalb einer überrepräsentierten, funktionellen Gengruppe vorhanden sein müssen, ergibt sich als Ergebnis dieser Analyse eine Auflistung aller funktioneller Gengruppen, welche diese Voraussetzungen erfüllen (Sherman et al., 2007a). Für eine überrepräsentierte funktionelle Gengruppe wird im Rahmen der vorliegenden Arbeit ein p-Wert von  $\leq 0,05$  (EASE Score, modifizierter Fisher t-Test) festgelegt. Außerdem sollten

mindestens 5 Gene aus der importierten Genliste in der überrepräsentierten funktionellen Gengruppe vorhanden sein.

Aus einer Vielzahl von funktionellen Gengruppen werden folgende als besonders interessant eingestuft, da diese mit hoher Wahrscheinlichkeit einen Einfluss auf die Wirkungsweise der Wirkstoffzellen haben (vgl. 1.3.4 Funktionelle Gen-Annotationsanalyse; S.19):

- i) Apoptose
- ii) Zytokine und Chemokine
- iii) Aktivierung, Differenzierung und Proliferation von Lymphozyten
- iv) Antigen-Prozessierung und Antigen-Präsentation
- v) NK-Zell-Interaktion
- vi) Tumorassoziierte Antigene (TAA)

#### **4.5.2.1 Funktionelle Gen-Annotationsanalyse verstärkt exprimierter Gene**

Alle 179 Gene, die eine mehr als dreifach verstärkte Expression in den Wirkstoffzellen gegenüber den nativen B25-MOL-Zellen aufweisen, sind in die funktionelle Analyse der Gen-Annotation eingeschlossen worden. Das Ergebnis dieser Analyse ist eine Liste überrepräsentierter funktioneller Gengruppen und Pathways, die verschiedenen biologischen Zusammenhängen zugeordnet werden können. In Bezug auf die für uns besonders interessanten funktionellen Gengruppen sind vor allem Apoptose-assoziierte funktionelle Gengruppen überrepräsentiert, wie die beiden GO „*induction of programmed cell death*“ und „*positive regulation of programmed cell death*“ oder der KEEG-Pathway „*apoptosis*“. Ebenso können viele der überrepräsentierten Gengruppen mit Zytokinen und Chemokinen bzw. der Chemotaxis in Verbindung gebracht werden. Neben GO wie „*chemotaxis*“ oder „*cytokine-mediated signaling pathway*“, sind auch KEEG-Pathways wie „*Cytokine-cytokine receptor interaction*“ unter den überrepräsentierten Gengruppen. Nur eine der überrepräsentierten Gengruppen steht in Zusammenhang mit der NK-Zell-Interaktion, während bezüglich der Antigen-Prozessierung und –Präsentation keine überrepräsentierten Gengruppen identifiziert werden können. Dagegen zeigen viele Gengruppen eine Assoziation mit der Aktivierung, Differenzierung und Proliferation von Lymphozyten auf. Dazu zählen funktionelle Gengruppen wie „*positive regulation of lymphocyte proliferation*“, „*positive regulation of lymphocyte activation*“ und „*leukocyte differentiation*“. Alle weiteren überrepräsentierten funktionellen Gengruppen werden, bezüglich der vorliegenden Fragestellung, als weniger relevant eingestuft. Die vollständige Liste der überrepräsentierten funktionellen Gengruppen mit einem Signifikanzniveau  $\leq 0,05$  (modifizierter Fisher t-Test) und mindestens 5 beteiligten Genen

---

innerhalb einer überrepräsentierten funktionellen Gengruppe ist in Tabelle 7.1 (S. 191) im Anhang wiedergegeben.

Anhand der gelisteten, überrepräsentierten, funktionellen Gengruppen und Pathways kann für die biologischen Zusammenhänge, welche für die Funktion der Wirkstoffzellen von besonderer Relevanz sind eine Liste der assoziierten, regulierten Gene erstellt werden. Die Expressionsänderungen dieser Gene soll zunächst durch alternative Nachweismethoden bestätigt und im Folgenden einer näheren Betrachtung unterzogen werden. Mit Hilfe dieser Genlisten kann dann nicht nur ermittelt werden, wie viele der an diesem Pathway beteiligten Gene einer Regulation unterliegen, sondern auch, an welchen Stellen die betroffenen Pathways reguliert sind und welche Relevanz diese Expressionsveränderungen für die Zellen haben.

### ***Apoptose***

Unter den überrepräsentierten funktionellen Gengruppen können insgesamt 11 identifiziert werden, die eine Assoziation mit der Apoptose aufweisen (Tabelle 4.1). Dazu gehören GO wie „*regulation of apoptosis*“, „*negative regulation of apoptosis*“, „*induction of programmed cell death*“ und „*positive regulation of programmed cell death*“. Die Einbindung einiger der GO in die Apoptose ergibt ein eher widersprüchliches Bild, da einige der regulierten Gengruppen mit einer positiven Regulation der Apoptose, andere mit einer negativen Regulation der Apoptose assoziiert sind.

**Tabelle 4.1 Apoptose-assoziierte funktionelle Gengruppen und Pathways**

Aufgeführt sind die jeweiligen Bezeichnungen der überrepräsentierten funktionellen Gengruppe, sowie deren Pathway bzw. GO, die Anzahl der regulierten Gene, der prozentuale Anteil der regulierten Gene an der Gesamtzahl der beteiligten Gene bzw. der entsprechenden funktionellen Gengruppe bzw. des Pathways, sowie der p-Wert des Fisher's Exact t-Test.

Kategorie	Bezeichnung	Anzahl Gene	%	p Wert
GOTERM_BP_5	GO:0042981 regulation of apoptosis	25	13.97	4.80E-06
GOTERM_BP_5	GO:0043067 regulation of programmed cell death	25	13.97	5.69E-06
GOTERM_BP_5	GO:0006916 anti-apoptosis	10	5.59	3.97E-04
GOTERM_BP_5	GO:0012502 induction of programmed cell death	12	6.70	7.20E-04
GOTERM_BP_5	GO:0043066 negative regulation of apoptosis	12	6.70	1.59E-03
GOTERM_BP_5	GO:0043069 negative regulation of programmed cell death	12	6.70	1.78E-03
GOTERM_BP_5	GO:0060548 negative regulation of cell death	12	6.70	1.82E-03
GOTERM_BP_5	GO:0043065 positive regulation of apoptosis	13	7.26	2.42E-03
GOTERM_BP_5	GO:0043068 positive regulation of programmed cell death	13	7.26	2.56E-03
GOTERM_BP_5	GO:0010942 positive regulation of cell death	13	7.26	2.66E-03
KEGG_PATHWAY	hsa04210: Apoptosis	5	2.79	4.73E-02

Anhand dieser Liste überrepräsentierter funktioneller Gengruppen können die Gene identifiziert werden, deren Expression bedingt durch den Herstellungsprozess signifikant verstärkt wird und gleichzeitig eine Assoziation mit der Apoptose aufweisen. Die 28 Gene, welche diese Kriterien erfüllen, sind in der folgenden Tabelle 4.2 zusammen mit dem Faktor der relativen Expressionsänderung (*fold change*, FC) und dem Signifikanzniveau (*moderate t-statistic*) angegeben.

**Tabelle 4.2 Verstärkt exprimierte Gene, die den überrepräsentierten Apoptose-assoziierten funktionellen Gengruppen angehören**

Neben dem Gensymbol und der Bezeichnung des Gens sind auch die Änderung der Expression (*fold change*, FC) und der p-Wert (*moderate t-statistic*) angegeben.

Gensymbol	Name	FC	p-Wert
AEN	apoptosis enhancing nuclease	3.95	5.54E-06
CCL2	chemokine (C-C motif) ligand 2	3.41	1.16E-05
CD40LG	CD40 ligand	129.63	3.77E-06
CDKN1A	cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21, Cip1)	3.80	7.91E-06
CSF2	colony stimulating factor 2 (granulocyte-macrophage)	52.20	3.20E-07
DDIT3	DNA-damage-inducible transcript 3	3.36	9.19E-05
DEDD2	death effector domain containing 2	3.77	1.04E-05
ETS1	v-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 1 (avian)	4.48	3.01E-06
FAS	Fas (TNF receptor superfamily, member 6)	3.35	9.80E-06
GCH1	GTP cyclohydrolase 1	3.62	4.25E-05
HSPA1A	heat shock 70kDa protein 1A; heat shock 70kDa protein 1B	3,07	1,25E-04
HSPA1B	heat shock 70kDa protein 1A; heat shock 70kDa protein 1B	3,57	1,39E-04
IFIH1	interferon induced with helicase C domain 1	11.80	4.42E-06
IL6	interleukin 6 (interferon, beta 2)	17.98	1.18E-05
IL7	interleukin 7	51.05	1.81E-07
INHBA	inhibin, beta A	4.16	4.15E-06
IRAK2	interleukin-1 receptor-associated kinase 2	5.14	4.55E-06
MX1	myxovirus (influenza virus) resistance 1, interferon-inducible protein p78 (mouse)	4.30	9.90E-06
NFKBIA	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha	4.45	2.83E-06
PIK3R3	phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit 3 (gamma)	5.05	5.54E-06
PMAIP1	phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1	16.02	2.32E-07
SFN	stratifin	3.16	1.03E-05
SPHK1	sphingosine kinase 1	6.68	2.83E-06
STAT5A	signal transducer and activator of transcription 5A	3.34	1.31E-05
TNFAIP3	tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3	23.84	8.59E-07
TNFRSF10B	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10b	3.44	5.54E-06
TNFRSF9	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 9	13.91	3.20E-07
TRAF1	TNF receptor-associated factor 1	9.53	4.94E-07

Der extrinsische Signalweg der Apoptose kann durch verschiedene transmembrane Rezeptoren induziert werden, wenn diese mit einem geeigneten Liganden interagieren. Dazu gehören vor allem eine Reihe von Rezeptoren für Tumornekrosefaktoren (Elmore, 2007).

Einige dieser TNF-Rezeptoren weisen in den Wirkstoffzellen eine signifikant erhöhte Expression auf. **Fas** (TNFRSF6, CD95) zeigt in nativen B25-MOL-Zellen eine konstitutive mRNA-Expression ( $S_{\text{int}} = 522,8$ ;  $SD = 2,74$ ). Diese steigt, bedingt durch den Herstellungsprozess in den Wirkstoffzellen zusätzlich um das 3,4fache an ( $S_{\text{int}} = 1753,1$ ;  $SD = 32,67$ ). Ebenso zeigt der TNF-Rezeptor 10 B (**TNFRSF10B**) eine konstitutive mRNA-Expression in nativen B25-MOL-Zellen ( $S_{\text{int}} = 761,8$ ;  $SD = 33,18$ ). Diese steigt, bedingt durch den Herstellungsprozess, in den Wirkstoffzellen ebenfalls um das 3,4fache an ( $S_{\text{int}} = 2615,5$ ;  $SD = 21,73$ ). Eine höhere Expressionsstärke dieser Gene führt zu einer verstärkten Sensitivität der Zellen gegenüber den jeweiligen Liganden, die über eine Interaktion mit diesen Rezeptoren Apoptose induzieren können.

Neben diesen TNF-Rezeptoren, über die Apoptose induziert werden kann, zeigen weitere Gene, die mit der Signaltransduktion des Apoptosesignals assoziiert sind, in den Wirkstoffzellen eine signifikant erhöhte Expression. Dazu gehört **DEDD2** (*death effector domain containing 2*), welches mit Komponenten des DISC-Komplexes (*death-inducing signaling complex*) interagieren kann und anschließend in den Zellkern übertritt, wo es an die chromosomale DNA bindet und pro-apoptotische Abläufe reguliert (Roth et al., 2002). In den nativen B25-MOL-Zellen weist dieses Gen eine konstitutive mRNA-Expression auf ( $S_{\text{int}} = 424,3$ ;  $SD = 20,09$ ), während die Wirkstoffzellen eine 3,8fach höhere mRNA-Expression dieses Gens zeigen ( $S_{\text{int}} = 1597,7$ ;  $SD = 40,98$ ). Auch das Gen **TNFAIP3** (A20) zeigt eine deutlich verstärkte Expression in den Wirkstoffzellen. Das resultierende Protein besitzt jedoch zytoprotektive Wirkung, indem es eine TNF-vermittelte Apoptose inhibieren kann (Daniel et al., 2004). In den nativen B25-MOL-Zellen ist auf Ebene der mRNA nur eine geringe Signalstärke detektierbar ( $S_{\text{int}} = 198,7$ ;  $SD = 6,29$ ), dagegen weisen die Wirkstoffzellen ein 23,8fach höheres Signal auf ( $S_{\text{int}} = 4737,8$ ;  $SD = 152,37$ ), eine deutliche Hochregulation der Expression dieses anti-apoptotischen Gens.

Die beiden Hitzeschockproteine, die von **HSPA1A** und **HSPA1B** kodiert werden, gehören zur „*heat shock protein 70 family*“, deren primäre Aufgabe in der Stabilisation vorhandener Proteine besteht, um Proteinaggregation zu vermeiden und für eine korrekte „Faltung“ neu synthetisierter Polypeptide zu sorgen. Die Expression wird vor allem durch Stress induziert; eine Überexpression schützt die Zelle vor Apoptose (Garrido et al., 2006). Gegenüber den

nativen B25-MOL-Zellen kann jeweils eine 3,6fach erhöhte Expression in den Wirkstoffzellen festgestellt werden, was ebenfalls zytoprotektive Auswirkungen hat.

### **Zytokine und Chemokine**

Unter den überrepräsentierten funktionellen Gengruppen und Pathways können insgesamt 10 zu einer Kategorie zusammengefasst werden, die in Assoziation mit Zytokinen und Chemokinen stehen (Tabelle 4.3), sowie mit der durch Chemokine ausgelösten Chemotaxis. Neben GO wie „chemotaxis“, „cytokine-mediated signaling pathway“, „regulation of cytokine biosynthetic process“ und „chemokine receptor binding“, gehören auch KEGG-Pathways wie „cytokine-cytokine receptor interaction“ zu den überrepräsentierten Gengruppen, die mit Chemokinen und Zytokinen assoziiert sind.

**Tabelle 4.3 Funktionelle Gengruppen und Pathways, die mit Zytokinen und Chemokinen assoziiert sind**

Aufgeführt sind die jeweiligen Bezeichnungen der überrepräsentierten funktionellen Gengruppe, sowie deren Pathway bzw. GO, die Anzahl der regulierten Gene, der prozentuale Anteil der regulierten Gene an der Gesamtzahl der beteiligten Gene, der entsprechenden funktionellen Gengruppe bzw. des Pathways, sowie der p-Wert des Fisher's Exact t-Test.

Kategorie	Bezeichnung	Anzahl Gene	%	p Wert
GOTERM_BP_5	GO:0006935 chemotaxis	12	6.70	1.24E-06
GOTERM_BP_5	GO:0030595 leukocyte chemotaxis	5	2.79	6.56E-04
GOTERM_BP_5	GO:0060326 cell chemotaxis	5	2.79	8.03E-04
GOTERM_BP_5	GO:0019221 cytokine-mediated signaling pathway	6	3.35	9.48E-04
GOTERM_BP_5	GO:0042035 regulation of cytokine biosynthetic process	6	3.35	1.22E-03
GOTERM_MF_5	GO:0008009 chemokine activity	8	4.47	4.24E-07
GOTERM_MF_5	GO:0042379 chemokine receptor binding	8	4.47	6.63E-07
KEGG_PATHWAY	hsa04060: Cytokine-cytokine receptor interaction	20	11.17	1.20E-08
KEGG_PATHWAY	hsa04062: Chemokine signaling pathway	11	6.15	6.23E-04
REACTOME_PATHWAY	REACT_6900:Signaling in Immune system	9	5.03	8.58E-03

Anhand der überrepräsentierten funktionellen Gengruppen können 36 verstärkt exprimierte Gene identifiziert werden, die eine Assoziation mit Zytokinen und Chemokinen, der Regulation ihrer Expression, mit der Zytokin-vermittelten Signaltransduktion bzw. Zytokinrezeptoren aufweisen (Tabelle 4.4).

**Tabelle 4.4 Verstärkt exprimierte Gene, deren funktionelle Gengruppen, mit Zytokinen und Chemokinen assoziiert sind**

Neben dem Gensymbol und der Bezeichnung des Gens, sind Änderung der Expression (*fold change*, FC) und der p-Wert (moderate t-statistic) angegeben.

Gensymbol	Name	FC	p-Wert
BMP2	bone morphogenetic protein 2	3,59	6,27E-06
CCL2	chemokine (C-C motif) ligand 2	3,41	1,16E-05
CCL20	chemokine (C-C motif) ligand 20	13,01	9,05E-07
CCL5	chemokine (C-C motif) ligand 5	29,31	8,13E-07
CCR7	chemokine (C-C motif) receptor 7	5,87	1,68E-06
CD154	CD40 ligand	129,63	3,77E-06
CD40	CD40 molecule, TNF receptor superfamily member 5	5,03	3,72E-06
CD80	CD80 molecule	3,68	3,66E-04
CSF2	colony stimulating factor 2 (granulocyte-macrophage)	52,20	3,20E-07
CX3CL1	chemokine (C-X3-C motif) ligand 1	4,25	3,77E-06
CXCL1	chemokine (C-X-C motif) ligand 1	3,82	1,57E-04
CXCL10	chemokine (C-X-C motif) ligand 10	8,65	1,75E-05
CXCL11	chemokine (C-X-C motif) ligand 11	3,17	2,09E-04
CXCL8 (IL8)	interleukin 8	8,57	6,38E-06
Fas (CD95)	Fas (TNF receptor superfamily, member 6)	3,35	9,80E-06
ICAM1	intercellular adhesion molecule 1	7,94	7,45E-07
ICAM4	intercellular adhesion molecule 4	3,67	1,84E-05
IL6	interleukin 6 (interferon, beta 2)	17,98	1,18E-05
IL7	interleukin 7	51,05	1,81E-07
INHBA	inhibin, beta A	4,16	4,15E-06
IRAK2	interleukin-1 receptor-associated kinase 2	5,14	4,55E-06
IRF1	interferon regulatory factor 1	8,31	3,01E-06
ITGA5	integrin, alpha 5 (fibronectin receptor, alpha polypeptide)	3,39	8,77E-06
JAM2	junctional adhesion molecule 2	4,85	3,21E-06
MAP2K3	mitogen-activated protein kinase kinase 3	6,94	9,86E-07
NFKB2	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 2 (p49/p100)	3,37	7,23E-06
NFKBIA	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha	4,45	2,83E-06
NRP2	neuropilin 2	4,43	2,69E-05
PIK3R3	phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit 3 (gamma)	5,05	5,54E-06



Gensymbol	Name	FC	p-Wert
PLAUR	plasminogen activator, urokinase receptor	7,61	7,45E-07
SOCS1	suppressor of cytokine signaling 1	3,43	1,61E-05
STAT5	signal transducer and activator of transcription 5A	3,34	1,31E-05
TNFRSF10B	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10b	3,44	5,54E-06
TNFRSF21	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 21	3,77	3,01E-06
TNFRSF9	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 9	13,91	3,20E-07
VCAM1	vascular cell adhesion molecule 1	5,96	2,53E-06

Für die beiden Zytokine, deren Expressionskassetten mittels Transfektion in die B25-MOL-Zellen eingeschleust werden, kann die erwartete Überexpression auf mRNA-Ebene bestätigt werden. Gegenüber den nativen B25-MOL-Zellen ( $S_{\text{int}} = 166,3$ ;  $SD = 8,26$ ) liegt eine 51,1fache Verstärkung der **IL-7** mRNA-Expression in den Wirkstoffzellen ( $S_{\text{int}} = 8478,2$ ;  $SD = 136,30$ ) vor. Die mRNA-Expression von **GM-CSF** (CSF2) steigt im Vergleich zur Expressionsstärke in den nativen B25-MOL-Zellen ( $S_{\text{int}} = 176,5$ ;  $SD = 10,80$ ) um das 52,2fache in den Wirkstoffzellen ( $S_{\text{int}} = 9198,4$ ;  $SD = 87,44$ ) an.

Neben diesen beiden Zytokinen weisen eine Reihe weiterer Zytokine eine signifikant verstärkte mRNA-Expression in den Wirkstoffzellen auf. Dazu gehört die Expression des Chemokins **CCL2** (*Chemokine ligand 2, monocyte chemotactic protein 1, MCP-1*), durch welches in erster Linie Monozyten rekrutiert werden. Bereits die nativen B25-MOL-Zellen zeigen eine hohe konstitutive mRNA-Expression von CCL2 ( $S_{\text{int}} = 1863,4$ ;  $SD = 108,85$ ). In den Wirkstoffzellen wird eine weitere Steigerung der mRNA-Expression um das 3,4fache detektiert ( $S_{\text{int}} = 6340,6$ ;  $SD = 2,37$ ).

Das Chemokin **CCL5** (*chemokine ligand 5, RANTES*) wirkt chemotaktisch auf Monozyten, T-Lymphozyten, NK-Zellen und Eosinophile (Robertson, 2002). In nativen B25-MOL-Zellen zeigt CCL5 eine schwache Signalintensität ( $S_{\text{int}} = 101,7$ ;  $SD = 5,84$ ), die nur unwesentlich über der Nachweisgrenze liegt (Schwellenwert einer nachweisbaren mRNA-Expression in Microarray-Analysen  $S_{\text{int}} = 100$ ). Dagegen weisen die Wirkstoffzellen eine hohe Signalintensität auf ( $S_{\text{int}} = 2876,5$ ;  $SD = 29,73$ ). Entsprechend handelt es sich vermutlich um eine *de novo* Expression verursacht durch den Herstellungsprozess.

Das Chemokin **CCL20** (*chemokine ligand 20, macrophage inflammatory protein 3 alpha, MIP-3 $\alpha$* ) gehört, wie auch CCL2 und CCL5, zur C-C-Motiv Chemokinfamilie. Es mobilisiert vor allem Lymphozyten des peripheren Blutes, zeigt aber auch eine schwache chemotaktische Wirkung

auf neutrophile Zellen (Hieshima et al., 1997). Das Expressionsniveau in den nativen B25-MOL-Zellen liegt mit einer Signalintensität  $< 100$  unterhalb der Nachweisgrenze für eine mRNA-Expression, was für eine nicht vorhandene basale mRNA-Expression spricht. In den Wirkstoffzellen kann dagegen eine Signalintensität von  $S_{\text{int}} = 1029,5$  ( $SD = 16,47$ ) detektiert werden. Auch in diesem Fall handelt es sich demnach um eine herstellungsbedingte *de novo* Expression dieses Gens.

Das Zytokin **CXCL10** (IP-10, 10 kDa *interferon gamma-induced protein*) weist neben chemotaktischen Eigenschaften für Monozyten/Makrophagen, dendritischen Zellen, ruhenden T-Lymphozyten und NK-Zellen auch regulatorische Eigenschaften auf; so werden beispielsweise T-Lymphozyten zur Reifung angeregt (Dufour et al., 2002; Neville et al., 1997). Analog zu CCL5 und CCL20 kann auch für CXCL10 eine herstellungsbedingte *de novo* Expression in den Wirkstoffzellen beobachtet werden. Während die detektierte Signalintensität für CXCL10 in den nativen B25-MOL-Zellen unterhalb der Nachweisgrenze liegt, ist in den Wirkstoffzellen mit  $S_{\text{int}} = 297,9$  ( $SD = 7,35$ ) eine deutlich höhere Expressionsstärke nachweisbar.

Interleukin 6 (**IL-6**) agiert sowohl als pro-inflammatorisches als auch anti-inflammatorisches Zytokin. In den Microarray-Analysen weisen die nativen B25-MOL-Zellen eine relativ geringe Expression von IL-6 spezifischer mRNA auf ( $S_{\text{int}} = 224,5$ ;  $SD = 61,96$ ). In den Wirkstoffzellen kann eine Steigerung der Expression um das 18fache beobachtet werden, also eine deutliche Steigerung der mRNA-Expression auf eine Signalintensität von  $S_{\text{int}} = 3880,0$  ( $SD = 33,58$ ).

Das Interleukin 8 (**IL-8**, CXCL8) fungiert als pro-inflammatorisches Zytokin, es rekrutiert neutrophile und basophile Zellen, sowie T-Lymphozyten. Jedoch besitzt IL-8 auch einige für die Krebstherapie negativ einzustufende Eigenschaften. So fördert die Freisetzung von IL-8 die Angiogenese und die Entwicklung von Metastasen (Waugh et al., 2008). Im Gegensatz zu den meisten anderen Zytokinen kann für IL-8 in den nativen B25-MOL-Zellen eine konstitutive mRNA-Expression ( $S_{\text{int}} = 521,1$ ;  $SD = 86,98$ ) nachgewiesen werden. In den Wirkstoffzellen steigt die Expression nochmals um das 8,6fache an. Damit weist IL-8 eine Überexpression ( $S_{\text{int}} = 4406,7$ ;  $SD = 141,68$ ) in den Wirkstoffzellen auf.

### ***Aktivierung, Differenzierung und Proliferation von Lymphozyten***

Insgesamt 17 der überrepräsentierten funktionellen Gengruppen und Pathways können zu einer Kategorie zusammengefasst werden, die eine Assoziation mit der Aktivierung, Differenzierung und Proliferation von Lymphozyten zeigen (Tabelle 4.5). Diese Kategorie steht im direkten Zusammenhang mit der Funktion einer Reihe von verstärkt exprimierten Zytokinen und Oberflächenproteinen der Wirkstoffzellen.

**Tabelle 4.5 Funktionelle Gengruppen und Pathways, die eine Assoziation mit der Aktivierung, Differenzierung und Proliferation von Lymphozyten besitzen**

Aufgeführt sind die jeweiligen Bezeichnungen der überrepräsentierten funktionellen Gengruppe, sowie deren Pathway bzw. GO, die Anzahl der regulierten Gene, der prozentuale Anteil der regulierten Gene an der Gesamtzahl der beteiligten Gene, der entsprechenden funktionellen Gengruppe bzw. des Pathways sowie der p-Wert des Fisher's Exact t-Test.

Kategorie	Bezeichnung	Anzahl Gene	%	p Wert
GOTERM_BP_5	GO:0050671 positive regulation of lymphocyte proliferation	8	4.47	1.95E-06
GOTERM_BP_5	GO:0070665 positive regulation of leukocyte proliferation	8	4.47	2.21E-06
GOTERM_BP_5	GO:0050864 regulation of B cell activation	7	3.91	1.73E-05
GOTERM_BP_5	GO:0050670 regulation of lymphocyte proliferation	8	4.47	3.11E-05
GOTERM_BP_5	GO:0051249 regulation of lymphocyte activation	10	5.59	3.19E-05
GOTERM_BP_5	GO:0070663 regulation of leukocyte proliferation	8	4.47	3.36E-05
GOTERM_BP_5	GO:0002694 regulation of leukocyte activation	10	5.59	7.83E-05
GOTERM_BP_5	GO:0051251 positive regulation of lymphocyte activation	8	4.47	8.48E-05
GOTERM_BP_5	GO:0002696 positive regulation of leukocyte activation	8	4.47	1.48E-04
GOTERM_BP_5	GO:0050867 positive regulation of cell activation	8	4.47	1.98E-04
GOTERM_BP_5	GO:0050871 positive regulation of B cell activation	5	2.79	4.20E-04
GOTERM_BP_5	GO:0002521 leukocyte differentiation	8	4.47	5.44E-04
GOTERM_BP_5	GO:0030098 lymphocyte differentiation	7	3.91	8.69E-04
GOTERM_BP_5	GO:0050870 positive regulation of T cell activation	6	3.35	1.37E-03
GOTERM_BP_5	GO:0042110 T cell activation	7	3.91	2.45E-03
GOTERM_BP_5	GO:0045619 regulation of lymphocyte differentiation	5	2.79	4.77E-03
GOTERM_BP_5	GO:0050863 regulation of T cell activation	6	3.35	8.77E-03

Neben der Rekrutierung von Immunzellen ist es essentiell diese zu aktivieren, um eine Immunantwort mit Hilfe der Wirkstoffzellen auszulösen. Daran sind neben Zytokinen, deren Expression bereits besprochen wurde, weitere Moleküle beteiligt. Anhand der überrepräsentierten funktionellen Gengruppen, die eine Assoziation mit der Aktivierung, Differenzierung und Proliferation mit Lymphozyten aufweisen, ist hier eine Liste der beteiligten, verstärkt exprimierten Gene zusammengestellt, die in der folgenden Tabelle 4.6 wiedergegeben ist.

**Tabelle 4.6 Verstärkt exprimierte Gene, assoziiert mit der Aktivierung, Differenzierung und Proliferation von Lymphozyten.**

Regulierte Gene, die zu überrepräsentierten funktionellen Gruppen gehören, die mit der Aktivierung, Differenzierung und Proliferation von Lymphozyten assoziiert sind. Angegeben sind Gensymbol und der Bezeichnung des Gens, sowie die Änderung der Expression (*fold change*, FC) und der p-Wert (*moderate t-statistic*).

Gensymbol	Name	FC	p-Wert
CCL5	chemokine (C-C motif) ligand 5	29.31	8.13E-07
CD154	CD40 ligand	129.63	3.77E-06
CD40	CD40 molecule, TNF receptor superfamily member 5	5.03	3.72E-06
CD80	CD80 molecule	3.68	3.66E-04
CDKN1A	cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21, Cip1)	3.80	7.91E-06
CSF2	colony stimulating factor 2 (granulocyte-macrophage)	52.20	3.20E-07
FAS	Fas (TNF receptor superfamily, member 6)	3.35	9.80E-06
HDAC9	histone deacetylase 9	3.26	5.15E-06
ICAM1	intercellular adhesion molecule 1	7.94	7.45E-07
ICOSLG	inducible T-cell co-stimulator ligand	3.31	7.91E-06
IL6	interleukin 6 (interferon, beta 2)	17.98	1.18E-05
IL7	interleukin 7	51.05	1.81E-07
INHBA	inhibin, beta A	4.16	4.15E-06
IRF1	interferon regulatory factor 1	8.31	3.01E-06
STAT5A	signal transducer and activator of transcription 5A	3.34	1.31E-05
VCAM1	vascular cell adhesion molecule 1	5.96	2.53E-06

Neben einigen bereits beschriebenen Zytokinen sind in dieser funktionellen Gruppe auch die beiden eingebrachten kostimulatorischen Oberflächenmoleküle zu finden. **CD80** kann über die Interaktion mit CD28 die Proliferation und Zytokin-Produktion in T-Lymphozyten induzieren. In den nativen B25-MOL-Zellen ist mit Hilfe der Microarray-Analyse eine schwache basale CD80-spezifische mRNA-Expression ( $S_{int} = 208,8$ ;  $SD = 62,24$ ) detektierbar, in den Wirkstoffzellen ist überraschenderweise ( $S_{int} = 733,8$ ;  $SD = 13,76$ ) nur eine um das 3,7fache erhöhte mRNA-Expression nachweisbar. Dagegen zeigt **CD154** (CD40LG) in den nativen B25-MOL-Zellen keine nachweisbare mRNA-Expression ( $S_{int} = 85,2$ ;  $SD = 18,55$ ). In den Wirkstoffzellen ist dagegen eine massive Überexpression der mRNA nachweisbar ( $S_{int} = 10.776,5$ ;  $SD = 98,90$ ).

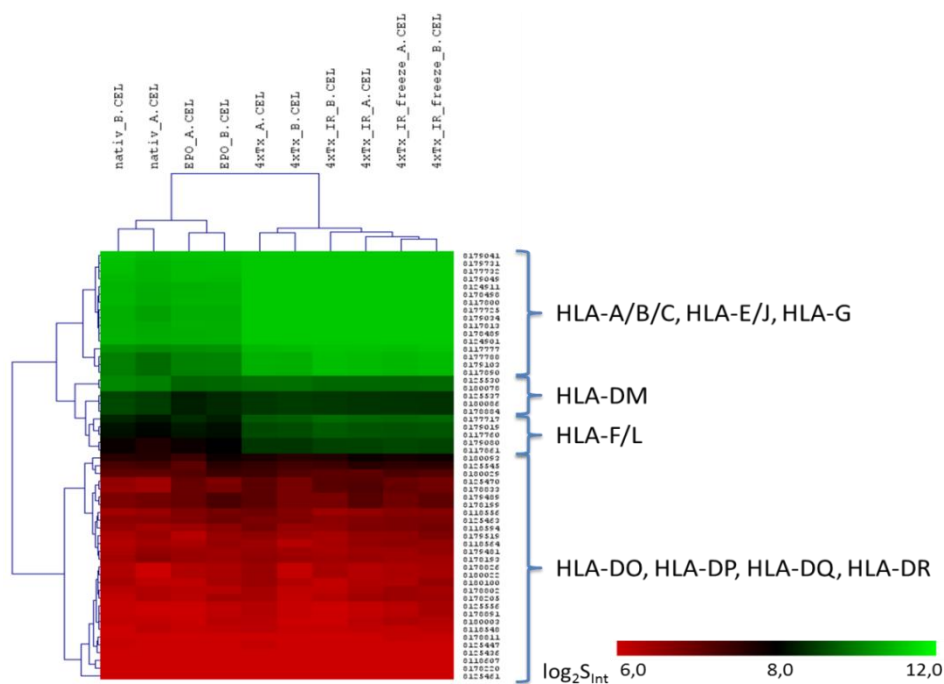
Wie bereits erwähnt, werden CD28 und CTLA-4 von T-Lymphozyten exprimiert. Über Interaktion mit geeigneten Liganden kontrollieren sie die Aktivierung bzw. Inaktivierung von T-

Lymphozyten. Analog zu CD80 und CD86 führt eine Kostimulation des **ICOSLG** (*inducible T-cell co-stimulator ligand*, CD275) über CD28 zur Aktivierung von T-Lymphozyten (Yao et al., 2011). Bereits in den nativen B25-MOL-Zellen ist eine konstitutiv vorhandene mRNA-Expression von ICOSLG nachweisbar ( $S_{\text{int}} = 255,8$ ;  $SD = 8,29$ ). Bedingt durch den Herstellungsprozess steigt die mRNA-Expression dieses Gens, so dass in den Wirkstoffzellen eine 3,3fach höhere Expression ( $S_{\text{int}} = 846,3$ ;  $SD = 26,22$ ) nachweisbar ist. Daneben zeigt auch das Adhäsionsmolekül **ICAM1** (*intercellular adhesion molecule 1*, CD54), welches an der Ausbildung der immunologischen Synapse beteiligt ist, eine signifikant höhere mRNA-Expression in den Wirkstoffzellen ( $S_{\text{int}} = 6333,2$ ;  $SD = 45,21$ ) als in den nativen B25-MOL-Zellen ( $S_{\text{int}} = 797,5$ ;  $SD = 7,75$ ). Bedingt durch den Herstellungsprozess wird eine Steigerung der Expression um das 7,9fache beobachtet.

### ***Antigen-Prozessierung und Antigen-Präsentation in Wirkstoffzellen***

Die Präsentation prozessierter Antigen durch MHC-Moleküle auf den Wirkstoffzellen stellt einen essentiellen Faktor des Wirkprinzips von MGN1601 dar. So ist es wichtig, die auf den B25-MOL-Zellen nachgewiesene Oberflächenexpression von MHC-Klasse-I-Molekülen auf den Wirkstoffzellen zu bestätigen. Gleichzeitig soll geprüft werden, ob auf den Wirkstoffzellen neben der Expression von MHC-Klasse-I-Molekülen auch eine Expression von MHC-Klasse-II-Molekülen vorliegt, um neben den  $CD8^+$  T-Lymphozyten eventuell auch die  $CD4^+$  T-Lymphozyten direkt aktivieren zu können.

Die Expressionsdaten der durchgeführten Microarray-Analysen machen jedoch deutlich, dass im Bereich der Antigenprozessierung und –Präsentation keine signifikanten Veränderungen der mRNA-Expression beteiligter Gene vorliegt (Abbildung 4.15). In den Listen der überrepräsentierten funktionellen Gengruppen ist keine funktionelle Gruppe mit der Antigen-Prozessierung und/oder –Präsentation assoziiert. Die Gene der MHC-Klasse-I-Moleküle zeigen in allen analysierten Proben ein unverändert hohes Expressionsniveau. Eine Expression der MHC-Klasse-II-Moleküle ist dagegen auszuschließen, da alle assoziierten Sonden-Sets in den analysierten Versuchsproben eine sehr niedrige Signalintensität aufweisen; diese liegen ohne Ausnahme unterhalb der festgesetzten Grenze für den sicheren Nachweis einer mRNA-Expression in den Microarrays von  $S_{\text{int}} = 100$ . Auch andere Gene, die an der Prozessierung und Antigen-Präsentation beteiligt sind, weisen keine signifikante herstellungsbedingte Änderung der Expression auf.



**Abbildung 4.15** Heat Map Darstellung der mRNA-Expressionslevel der MHC-Gene im Verlauf des Herstellungsprozesses

Die Spalten zeigen die analysierten Versuchsproben aus dem Herstellungsprozess (je zwei Replikate) von den nativen B25-MOL (links) bis zu den Wirkstoffzellen (rechts). Jede Zeile repräsentiert ein analysiertes Gen. Die Einfärbung der Zellen gibt die Expressionsstärke des Gens in der jeweiligen Versuchsprobe wieder, diese basieren auf den  $\log_2$ -transformierten detektierten und präprozessierten Signalintensitäten ( $S_{int}$ ).

### ***NK-Zell-Interaktion***

Bezüglich der NK-Zell-Interaktion kann unter den insgesamt 110 überrepräsentierten funktionellen Gengruppen und Pathways nur ein KEEG-Pathway identifiziert werden, der eine direkte Assoziation mit diesem biologischen Zusammenhang besitzt. Innerhalb des „*Natural killer cell mediated cytotoxicity*“ Pathway zeigen 8 Gene eine verstärkte Expression in den Wirkstoffzellen (Tabelle 4.7).

NK-Zellen sind in der Lage, infizierte oder entartete Zellen mittels Perforin/ Granzym oder Rezeptor-vermittelt zu töten. Verschiedene Rezeptoren der NK-Zellen interagieren mit MHC-Klasse-I-Molekülen auf den Zielzellen; dabei entscheidet das Verhältnis zwischen inhibitorischen und aktivierenden Signalen darüber, ob die Zielzelle abgetötet wird oder nicht (Bryceson et al., 2011; Caligiuri, 2008). Neben der Expression von Rezeptoren für MHC-Klasse-I-Moleküle exprimieren die NK-Zellen eine Reihe weiterer Oberflächenmoleküle, die beispielsweise der Adhäsion oder dem Rezeptor-vermittelten Tötungsmechanismus dienen. Diese interagieren mit geeigneten Oberflächenmolekülen auf den Zielzellen.

**Tabelle 4.7 Vermehrt exprimierte Gene des KEGG-Pathway „Natural killer cell mediated cytotoxicity“.**

Regulierte Gene, die zu überrepräsentierten funktionellen Gruppen gehören, die mit der NK-Zell-Interaktion assoziiert sind. Neben dem Gensymbol und der Bezeichnung des Gens sind die Änderung der Expression (*fold change, FC*) und der p-Wert (*moderate t-statistic*) angegeben.

Gensymbol	Name	FC	p-Wert
CSF2	colony stimulating factor 2 (granulocyte-macrophage)	52.20	3.20E-07
FAS	Fas (TNF receptor superfamily, member 6)	3.35	9.80E-06
ICAM1	intercellular adhesion molecule 1	7.94	7.45E-07
NFATC1	nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic, calcineurin-dependent 1	3.02	1.16E-05
NFATC2	nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic, calcineurin-dependent 2	16.67	6.05E-07
PIK3R3	phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit 3 (gamma)	5.05	5.54E-06
RAET1L	retinoic acid early transcript 1L	5.10	1.91E-04
TNFRSF10B	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10b	3.44	5.54E-06

Unter den verstärkt exprimierten Genen der Wirkstoffzellen sind insgesamt drei, deren Genprodukte mit geeigneten Oberflächenmolekülen auf NK-Zellen interagieren können. Das **ICAM1** dient der Adhäsion und ist in der Lage, verschiedene NK-Zell-exprimierte Oberflächenmoleküle (LFA-1, MAC-1, CD11c) zu binden (Bryceson et al., 2011). Wie bereits unter „Aktivierung, Differenzierung und Proliferation von Lymphozyten“ (S.88) erwähnt, liegt eine 7,9fach höhere Expression von ICAM1 in den Wirkstoffzellen vor.

Die Interaktion von **Fas** und **TNFRSF10B** mit geeigneten Liganden auf den NK-Zellen führen zur Rezeptor-vermittelten Apoptose der Zielzelle. Wie bereits unter „Apoptose“ (S.81) beschrieben, zeigen beide Oberflächenmoleküle eine verstärkte mRNA-Expression in den Wirkstoffzellen.

#### 4.5.2.2 Funktionelle Gen-Annotationsanalyse vermindert exprimierter Gene

Analog zu den signifikant verstärkt exprimierten Genen wird auch für die 213 vermindert exprimierten Gene eine funktionelle Gen-Annotationsanalyse mit Hilfe von DAVID durchgeführt. Anhand der festgelegten Kriterien (Signifikanzniveau des Fisher Exact t-Test  $\leq 0,05$ , mind. 5 regulierte Gene innerhalb einer überrepräsentierten Gruppe) wird eine Liste der überrepräsentierten funktionellen Gengruppen erstellt, die vollständig in der Tabelle 7.2 (S.194) im Anhang wiedergegeben ist.

In der Liste der überrepräsentierten Gengruppen können keine Gene identifiziert werden, die eine Assoziation mit den für uns besonders interessanten biologischen Zusammenhängen

zeigen. Jedoch zeigen 52 der insgesamt 82 überrepräsentierten funktionellen Gengruppen eine Assoziation mit dem Zellzyklus bzw. dessen Regulation an unterschiedlichen Kontrollpunkten. Dazu zählen GO wie „*regulation of mitotic cell cycle*“ und „*spindle organization*“ oder KEEG Pathways, wie „*cell cycle*“. Diese werden zu einer weiteren Kategorie funktioneller Gengruppen zusammengefasst, die im folgenden Abschnitt näher betrachtet wird.

### ***Regulation des Zellzyklus***

Unter den überrepräsentierten funktionellen Gengruppen und Pathways, die anhand der vermindert exprimierten Gene identifiziert werden, sind über die Hälfte (52 von 82 Genen) mit dem Zellzyklus oder dessen Regulation assoziiert. Dies deutet darauf hin, dass der Zellzyklus in den Wirkstoffzellen einer massiven Runterregulation unterworfen wird. Die folgende Tabelle 4.8 listet alle überrepräsentierten funktionellen Gengruppen und Pathways auf, die eine Assoziation mit der Regulation des Zellzyklus besitzen.

**Tabelle 4.8 Funktionelle Gengruppen und Pathways, die eine Assoziation mit der Regulation des Zellzyklus besitzen**

Aufgeführt sind die jeweiligen Bezeichnungen der überrepräsentierten funktionellen Gengruppe, sowie deren Pathway bzw. GO, die Anzahl der regulierten Gene, der prozentuale Anteil der regulierten Gene an der Gesamtzahl der beteiligten Gene, der entsprechenden funktionellen Gengruppe bzw. des Pathways, sowie der p-Wert des Fisher's Exact t-Test.

Kategorie	Bezeichnung	Anzahl Gene	%	p-Wert
GOTERM_BP_5	GO:0000279 M phase	51	24,06	1,04E-41
GOTERM_BP_5	GO:0000087 M phase of mitotic cell cycle	43	20,28	9,45E-39
GOTERM_BP_5	GO:0007067 mitosis	42	19,81	1,09E-37
GOTERM_BP_5	GO:0000070 mitotic sister chromatid segregation	11	5,19	1,05E-11
GOTERM_BP_5	GO:0006260 DNA replication	15	7,08	7,85E-08
GOTERM_BP_5	GO:0007093 mitotic cell cycle checkpoint	8	3,77	7,81E-07
GOTERM_BP_5	GO:0007051 spindle organization	8	3,77	1,08E-06
GOTERM_BP_5	GO:0010564 regulation of cell cycle process	11	5,19	1,25E-06
GOTERM_BP_5	GO:0000075 cell cycle checkpoint	10	4,72	1,58E-06
GOTERM_BP_5	GO:0007346 regulation of mitotic cell cycle	12	5,66	2,45E-06
GOTERM_BP_5	GO:0007076 mitotic chromosome condensation	5	2,36	1,40E-05
GOTERM_BP_5	GO:0007052 mitotic spindle organization	5	2,36	2,62E-05
GOTERM_BP_5	GO:0006281 DNA repair	14	6,60	4,41E-05
GOTERM_BP_5	GO:0030071 regulation of mitotic metaphase/anaphase transition	5	2,36	1,31E-04



Kategorie	Bezeichnung	Anzahl Gene	%	p-Wert
GOTERM_BP_5	GO:0034728 nucleosome organization	8	3,77	1,38E-04
GOTERM_BP_5	GO:0010948 negative regulation of cell cycle process	5	2,36	2,21E-04
GOTERM_BP_5	GO:0007088 regulation of mitosis	6	2,83	5,86E-04
GOTERM_BP_5	GO:0051783 regulation of nuclear division	6	2,83	5,86E-04
GOTERM_BP_5	GO:0006333 chromatin assembly or disassembly	8	3,77	9,23E-04
GOTERM_BP_5	GO:0051329 interphase of mitotic cell cycle	6	2,83	8,51E-03
GOTERM_BP_5	GO:0006310 DNA recombination	6	2,83	9,21E-03
GOTERM_BP_5	GO:0051325 interphase	6	2,83	9,57E-03
GOTERM_CC_5	GO:0005819 spindle	25	11,79	1,91E-21
GOTERM_CC_5	GO:0005694 chromosome	36	16,98	1,01E-19
GOTERM_CC_5	GO:0044427 chromosomal part	33	15,57	3,67E-19
GOTERM_CC_5	GO:0005634 nucleus	111	52,36	1,29E-17
GOTERM_CC_5	GO:0000793 condensed chromosome	21	9,91	1,45E-17
GOTERM_CC_5	GO:0015630 microtubule cytoskeleton	35	16,51	1,98E-16
GOTERM_CC_5	GO:0000775 chromosome, centromeric region	18	8,49	3,77E-14
GOTERM_CC_5	GO:0000779 condensed chromosome, centromeric region	14	6,60	3,39E-13
GOTERM_CC_5	GO:0000777 condensed chromosome kinetochore	12	5,66	3,67E-11
GOTERM_CC_5	GO:0000776 kinetochore	12	5,66	8,98E-10
GOTERM_CC_5	GO:0005815 microtubule organizing center	17	8,02	2,55E-08
GOTERM_CC_5	GO:0044428 nuclear part	47	22,17	6,01E-08
GOTERM_CC_5	GO:0000922 spindle pole	8	3,77	8,24E-08
GOTERM_CC_5	GO:0000796 condensin complex	5	2,36	2,26E-07
GOTERM_CC_5	GO:0005813 centrosome	15	7,08	2,29E-07
GOTERM_CC_5	GO:0005874 microtubule	16	7,55	4,62E-07
GOTERM_CC_5	GO:0005876 spindle microtubule	7	3,30	7,01E-07
GOTERM_CC_5	GO:0031981 nuclear lumen	36	16,98	9,66E-06
GOTERM_CC_5	GO:0005654 nucleoplasm	24	11,32	1,34E-04
GOTERM_CC_5	GO:0000786 nucleosome	6	2,83	6,98E-04
GOTERM_CC_5	GO:0044450 microtubule organizing center part	5	2,36	3,57E-03
GOTERM_CC_5	GO:0005875 microtubule associated complex	6	2,83	5,83E-03
GOTERM_CC_5	GO:0000785 chromatin	8	3,77	7,41E-03

Kategorie	Bezeichnung	Anzahl Gene	%	p-Wert
GOTERM_CC_5	GO:0000228 nuclear chromosome	7	3,30	9,95E-03
KEGG_PATHWAY	hsa04110:Cell cycle	13	6,13	1,58E-09
KEGG_PATHWAY	hsa03030:DNA replication	5	2,36	3,87E-04
REACTOME_PATHWAY	REACT_152:Cell Cycle, Mitotic	34	16,04	4,87E-21
REACTOME_PATHWAY	REACT_1538:Cell Cycle Checkpoints	9	4,25	4,65E-04
REACTOME_PATHWAY	REACT_383:DNA Replication	8	3,77	1,02E-03
REACTOME_PATHWAY	REACT_216:DNA Repair	7	3,30	6,63E-03

Anhand dieser funktionellen Gengruppen kann eine Liste der beteiligten, vermindert exprimierten Gene erstellt werden, die eine Assoziation mit dem Zellzyklus bzw. dessen Regulation zeigen. Diese sind zusammen mit dem Faktor der relativen Expressionsänderung (FC) in Tabelle 7.3 im Anhang (siehe S.196) wiedergegeben; einige werden im Folgenden näher betrachtet.

Die Aurora-A-Kinase (**AURKA**) ist unter physiologischen wie pathophysiologischen Bedingungen an der Regulation der Centrosomenreifung, dem Eintritt der Zelle in die Mitose, der Formierung und Funktion des Spindelapparates und der Zytokinese involviert (Nikonova et al., 2012). In den Wirkstoffzellen zeigt dieses Gen jedoch eine sehr viel geringere Expressionsstärke ( $S_{\text{int}} = 217,6$ ;  $SD = 0,40$ ) als in nativen B25-MOL-Zellen ( $S_{\text{int}} = 1211,3$ ;  $SD = 37,76$ ); sie nimmt damit um das 5,6fache ab.

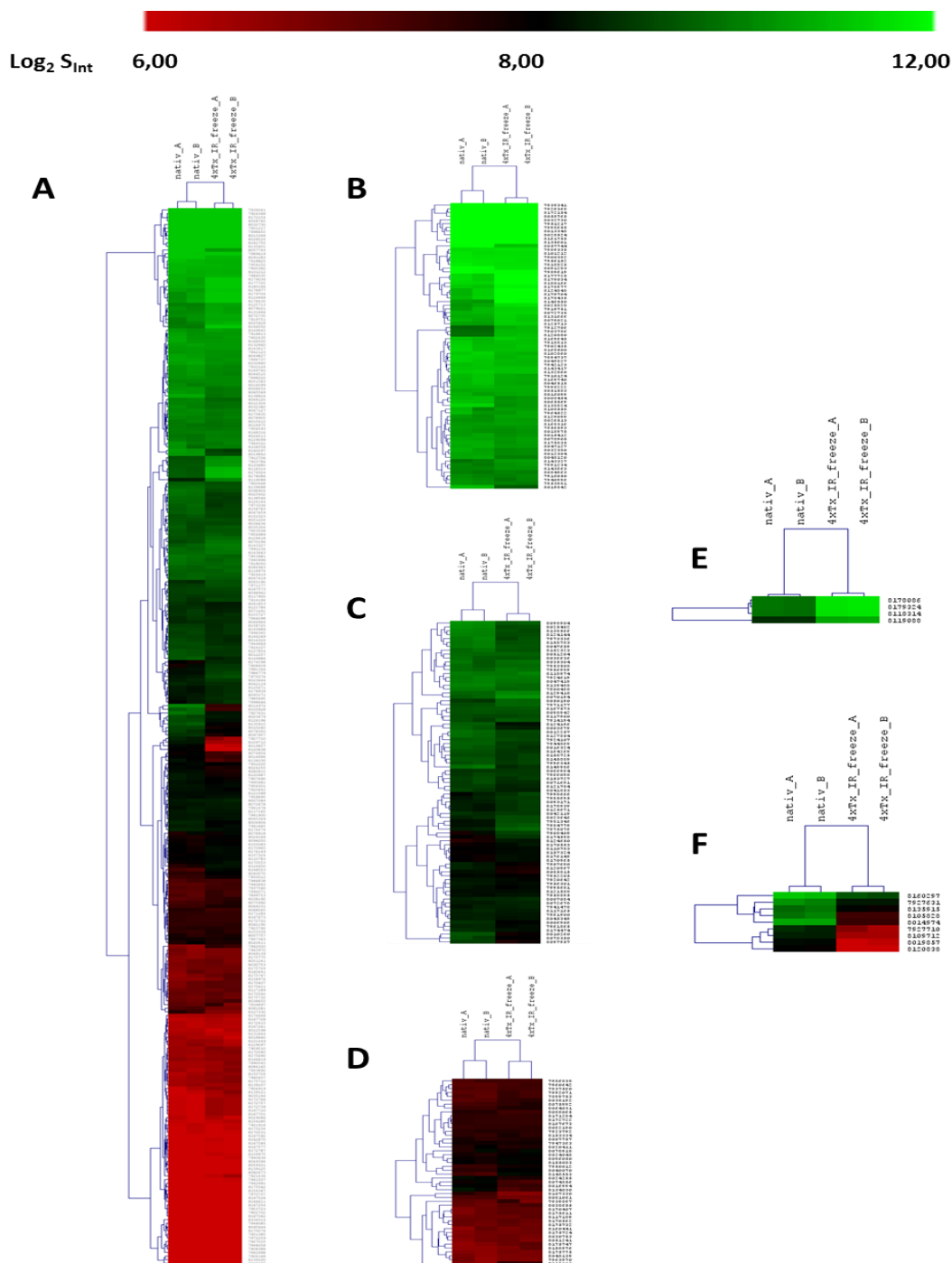
Das Cyclin A2-Protein, welches durch das **CCNA2**-Gen kodiert wird, gehört der hoch konservierten Cyclin-Familie an. Sie fungieren als Regulatoren der Cyclin-abhängigen Kinasen (CDK). Über die Änderung der vorhandenen Proteinmenge erfolgt die Regulation der Aktivitäts-modulierenden Kinasen im Zellzyklus. Eine CCNA2-Überexpression, vor allem aufgrund von Genamplifikationen, ist in diversen Tumortypen beschrieben und führt zu einer erhöhten Proliferationsrate (Aamodt et al., 2009; Bieche et al., 2011; Yasmien et al., 2003). In den nativen B25-MOL-Zellen ist eine hohe konstitutive mRNA-Expression zu beobachten ( $S_{\text{int}} = 1470,6$ ;  $SD = 180,18$ ). Dagegen vermindert sich die mRNA-Expression von CCNA2 in den Wirkstoffzellen auf  $\frac{1}{8}$  der ursprünglich detektierten Expression. Mit einer Signalintensität von  $S_{\text{int}} = 183,2$  ( $SD = 12,50$ ) kann die Expressionsstärke von CCNA2 hier nur noch als marginal bezeichnet werden.

Für die Segregation der Chromosomen während der Metaphase müssen die Kinetochore jedes Chromatiden mit den Mikrotubuli des Spindelapparates verbunden sein. Dafür ist ein Komplex aus mehreren Proteinen verantwortlich, der als NDC80 Kinetokorkomplex bezeichnet wird. Liegt dieser Kinetochorkomplex nicht in ausreichenden Mengen in der Zelle vor, kommt es zum Zellzyklusarrest (Sundin et al., 2010). Für **NDC80**, das für eine essentielle Komponente dieses Komplexes kodiert, ist in Tumoren eher eine Überexpression im Vergleich zu Normalgewebe beschrieben (Bieche et al., 2011). Die nativen B25-MOL-Zellen weisen eine eher geringe Expressionsstärke von NDC80 auf ( $S_{\text{int}}= 283,9$ ;  $SD= 5,13$ ). Bedingt durch den Herstellungsprozess ist die Expression von NDC80 in den Wirkstoffzellen signifikant vermindert; die Signalstärke fällt unter die Nachweisgrenze von  $S_{\text{int}}= 100$  ( $S_{\text{int}}= 65,5$ ;  $SD= 5,01$ ), eine NDC80 spezifische mRNA-Expression ist nicht mehr nachweisbar. In der Studie von Bieche et al. (2011) wird außerdem eine Überexpression von **CENPE** in Brustkrebszellen beschrieben. CENPE kodiert das Centromer-assoziierte Protein E und spielt ebenfalls eine essentielle Rolle während der Chromosomensegregation (Tanudji et al., 2004). Wie NDC80 zeigt auch CENPE eine moderate Expressionsstärke in den nativen B25-MOL-Zellen ( $S_{\text{int}}= 270,4$ ;  $SD= 1,39$ ), während in den Wirkstoffzellen keine spezifische mRNA-Expression ( $S_{\text{int}}= 46,7$ ;  $SD= 6,19$ ) nachweisbar ist.

#### **4.5.2.3 Gengruppe Tumor-assoziiertes Antigen (TAA)**

Die Expression eines TAA durch die Wirkstoffzellen bzw. die Präsentation prozessierter Proteinfragmente (Peptide) dieser TAA über MHC-Moleküle kann eine spezifische T-Zellreaktion hervorrufen. Aus diesem Grund ist es von Vorteil, wenn ein möglichst breites Spektrum an TAA von den Wirkstoffzellen exprimiert wird. Wie bereits erwähnt, ist in keiner der bekannten Datenbanken eine funktionelle Gengruppe zu TAA hinterlegt. Dies liegt darin begründet, dass TAA nicht stringent auf allen Tumorzellen exprimiert werden. Jeder Tumor weist unterschiedliche spezifische genetische und epigenetische Alterationen auf; so unterscheiden sich auch die Expressionsmuster und damit die exprimierten TAA. Eine Korrelation der Expression verschiedener TAA auf bestimmten Tumortypen liegt zwar in vielen Fällen vor, jedoch nicht für jeden Tumor des gleichen Gewebetyps. Die Tatsache, dass einige TAA unter normalen Bedingungen von anderen Gewebetypen exprimiert werden, stellt einen weiteren Grund dar, weshalb eine solche allgemein gültige Gengruppe in den Pathway-Datenbanken oder Kategorien der Gen-Ontologien (GO) nicht hinterlegt ist. Eine Überrepräsentation einer solchen Gengruppe bei der Datenauswertung einer Microarray-Analyse zu identifizieren, die auf der veränderten Expression einer Reihe assoziierter Gene beruht, wäre aufgrund der hohen Individualität eines Tumors sehr unwahrscheinlich, da jeder Tumor theoretisch andere TAA in unterschiedlicher Stärke exprimiert. Die Auswertung der

Expressionsdaten bezüglich der TAA kann entsprechend nicht über eine funktionelle Gen-Annotationsanalyse erfolgen. Die hier durchgeführten Analysen Ziel auch nicht darauf ab, eine überrepräsentierte TAA-Gengruppe zu identifizieren, die den Tumorcharakter der analysierten Zellen belegen. Vielmehr ist von Interesse, welche Tumor-assoziierten Antigene von den Wirkstoffzellen exprimiert werden. Über diese Informationen kann ermittelt werden, gegen welche TAA die Wirkstoffzellen eventuell eine spezifische Immunantwort induziert werden kann. Um diese Informationen zu erhalten, ist es notwendig eine Liste bekannter TAA zu erstellen, anhand derer die Expressionsdaten aus den Daten der Microarrays zunächst gefiltert und anschließend weiter ausgewertet werden. Für die Zusammenstellung dieser Liste von TAA wird vor allem auf Veröffentlichungen von Arbeitsgruppen zurückgegriffen, die sich insbesondere mit der Identifizierung von TAA, sowie deren Expression und der Identifizierung entsprechender T-Zellepitope auseinandersetzen (Krüger, 2007; Novellino et al., 2005; Singh-Jasuja et al., 2004; Singh et al., 2007; Singh et al., 2009; TANTIGEN: Tumor T cell Antigen Database, 2009; Tun et al., 2010). Anhand der Genbezeichnungen bzw. Gensymbole können die entsprechenden Sonden-Set-IDs mit Hilfe des NetAffx™ Analysis Center auf dem Human GeneChip® ST 1.0 identifiziert werden. Daraus ergibt sich eine Liste von insgesamt 262 Genen, die auf dem Human GeneChip® ST 1.0 mit 293 Sonden-Sets hinterlegt sind. Die Analyse der Expressionsstärke der entsprechenden Gene erfolgt unter Verwendung der normalisierten Signalintensitäten aller Sonden-Sets des GeneChips und der Filterung auf die Liste der 293 Sonden-Sets der TAA. Da eine Korrelation der Expression verschiedener TAA nicht vorhersagbar ist, werden alle Gene unabhängig voneinander betrachtet. Zur besseren Übersicht der detektierten Expressionsstärken wird eine Heat Map generiert, in der alle analysierten TAA sowie deren Signalintensitäten der nativen B25-MOL-Zellen und der Wirkstoffzellen dargestellt sind (Abbildung 4.16).



**Abbildung 4.16 Heat Map. Genexpressionslevel von TAA in B25-MOL und Wirkstoffzellen**

Die Spalten zeigen die analysierten Versuchsproben (zwei Replikate) nativer B25-MOL-Zellen (links) und Wirkstoffzellen (rechts). Jede Zeile repräsentiert ein analysiertes Gen. Die Färbung der Zellen basiert auf den detektierten und präprozessierten Expressionsstärken des entsprechenden Gens in der jeweiligen Versuchsprobe. Während die rote Färbung für eine geringe Expressionsstärke steht, weist eine intensiver werdende Grün-Färbung auf eine hohe Expressionsstärke hin (Legende). In (A) sind die Expressionsdaten aller hier analysierten TAA dargestellt. Basierend auf den Expressionsdaten können verschiedene Gencluster ermittelt und zusammengefasst: konstant hoch exprimierte Gene (B), Gene, mit einer konstanten mittleren Expressionsstärke (C) und Gene mit konstant niedriger Expressionsstärke (D). Gene, bei denen eine Expressionsänderung zwischen den nativen Zellen und den Wirkstoffzellen vorliegt, sind in zwei Untergruppen aufgeteilt: Gene deren Expressionsstärke zunimmt (E), sowie Gene mit verminderter Expressionsstärke in den Wirkstoffzellen (F). Nicht exprimierte TAA werden von der Analyse ausgeschlossen.

In den Heat Map Darstellungen (Abbildung 4.16 A – F) sind jeweils zwei Probencluster zu erkennen, welche die analysierten Replikate darstellen: die Proben der nativen B25-MOL-Zellen (links) und die Proben der Wirkstoffzellen (rechts). Insgesamt weisen die Proben ein überraschend homogenes Expressionsmuster der analysierten TAA auf. Dabei weist eine intensive Rot-Färbung auf eine niedrige Signalstärke hin, während eine intensive Grün-Färbung für eine sehr hohe Signalintensität und damit für eine hohe Expressionsstärke steht.

Basierend auf den Ergebnissen der Microarray-basierten Expressionsanalysen können zunächst die TAA identifiziert werden, welche in den nativen MOL-B25 exprimiert werden. Der Vergleich der Expressionsstärke mit der in den Wirkstoffzellen dient dazu zu eruieren, ob diese einer herstellungsbedingten Regulation unterliegen. Die Gruppe der TAA wird zunächst auf diejenigen eingegrenzt, die sowohl in den nativen Zellen als auch in den Wirkstoffzellen exprimiert werden ( $S_{\text{int}} > 100$ ; schwarz bis grün gefärbte Gene), während die nicht exprimierten Gene von weiteren Analysen ausgeschlossen werden ( $S_{\text{int}} < 100$ ; durchgehend rot gefärbte Gene). Insgesamt können die Gene in die folgenden Expressionsgruppen unterteilt werden (Abbildung 4.16, A-F):

- (A) Expressionsdaten aller hier analysierten TAA
- (B) konstant hohe Expression in nativen Zellen und in Wirkstoffzellen ( $S_{\text{int}} \geq 1024$ )
- (C) konstant mittlere Expression in nativen Zellen und in Wirkstoffzellen ( $256 \leq S_{\text{int}} \leq 1024$ )
- (D) konstant niedrige Expression in nativen Zellen und in Wirkstoffzellen ( $S_{\text{int}} \leq 256$ )
- (E) Expressionssteigerung von nativen Zellen auf Wirkstoffzellen (Expressionsänderung (FC)  $\geq 3$ )
- (F) Verminderung der Expressionsstärke nativen Zellen auf Wirkstoffzellen (Expressionsänderung (FC)  $\leq -3$ ).

Um die Anzahl der zu untersuchenden Gene weiter einzugrenzen, werden ausschließlich Gene ausgewählt, deren Signalintensität in den Wirkstoffzellen eine Signalintensität von 1024 überschreitet, also zur Gruppe der hoch exprimierten Gene zählen. Tabelle 7.4 (S.199) zeigt eine Auflistung dieser hoch exprimierten Gene in den Wirkstoffzellen. Auf Grund der hohen Anzahl wird im Folgenden nur die Expression der signifikant regulierten Gene näher erörtert.

Die Anzahl der Sonden-Sets, die einer herstellungsbedingten Regulation unterliegen, ist mit nur 13 der 293 analysierten Sonden-Sets, gering. Darunter zeigen vier eine verstärkte und 9 Sonden-Sets eine verminderte Expression in den Wirkstoffzellen. Die vier Sonden-Sets (Abbildung 4.16 E), die eine verstärkte mRNA Expression in den Wirkstoffzellen zeigen, können drei Genen zugeordnet werden, **HSPA1A**, **HSPA1B** und **CDKN1A**. Alle drei zeigen bereits in den

nativen B25-MOL-Zellen eine hohe konstitutive mRNA-Expression, die bedingt durch den Herstellungsprozess weiter ansteigt. Hitzeschock Proteine, wie HSPA70A und HSPA70B gehören zu einer hoch konservierten Gruppe von Chaperonen, die in nahezu allen Zellkompartimenten lokalisiert sind und dort wichtige Funktionen übernehmen. In zahlreichen Krankheitsbildern wie auch diversen Tumorarten ist eine deutliche Steigerung der Genexpression gegenüber dem entsprechenden Normalgewebe beschrieben (Sherman et al., 2007b; Wang, 2011). Bereits die nativen B25-MOL-Zellen weisen eine hohe konstitutive mRNA-Expression der HSP70 kodierenden Gene, **HSPA1A** ( $S_{\text{int}} = 2305,5$ ;  $SD = 45,71$ ) und **HSPA1B** ( $S_{\text{int}} = 895,2$ ;  $SD = 25,11$ ) auf. Bedingt durch die Herstellung unterliegen beide Gene einer Regulation, so dass in den Wirkstoffzellen ein Expressionsniveau erreicht wird, das für HSPA1A um das 3,1fache und für HSPA1B um das 3,6fache höher liegt als in den nativen B25-MOL-Zellen (HSPA1A  $S_{\text{int}} = 7034,6$ ;  $SD = 191,80$ ; HSPA1B  $S_{\text{int}} = 3220,8$ ;  $SD = 118,71$ ).

Unter den neun Genen, die eine verminderte Expression in den Wirkstoffzellen zeigen (Abbildung 4.16 F), sind vier Gene für die eine Signalintensität  $< 100$  detektiert wird. Da diese Signalstärke im Bereich des Hintergrundrauschens des verwendeten GeneChips liegt, ist davon auszugehen, dass diese Gene in den Wirkstoffzellen nicht exprimiert werden oder deren Expression für die Antigenerkennung keine Rolle spielt (**NDC80**, **CDK1**, **HMMR**, **TTK**). Der Verlust der Expression verschiedener TAA kann negative Auswirkungen auf die Tumorstoffzellen haben. So gehört NDC80 zu den TAA, die in Mammakarzinomen häufig sehr stark hochreguliert sind, daher stellen daraus prozessierte Antigene ein potentiell Ziel für die Erkennung und Eliminierung der Tumorzelle durch das Immunsystem dar. Da die Wirkstoffzellen dieses Gen jedoch nicht mehr exprimieren, können sie geeignete T-Zellen, welche spezifisch für entsprechende NDC80-Antigene sind, nicht aktivieren.

Die übrigen fünf Gene zeigen in nativen B25-MOL-Zellen eine hohe Expression, die in den Wirkstoffzellen signifikant abnimmt, jedoch nachweisbar bleibt (**DKK1**, **TOP2A**, **CCNB1**, **HIG2**, **PLIN2**). **HIG2** (*hypoxia-inducible protein 2*) stellt ein Zielgen von HIF1- $\alpha$  dar. Häufig wird eine konstitutive Aktivierung dieses Transkriptionsfaktors in Von Hippel-Lindau Tumorsuppressor (pVHL)-defizienten RCC beobachtet. Die Überexpression von HIG2 korreliert mit einer intrazellulären Lipid-Akkumulation (Gimm et al., 2010). Die nativen B25-MOL-Zellen zeigen eine hohe konstitutive mRNA-Expression ( $S_{\text{int}} = 862,8$ ;  $SD = 75,54$ ), die bedingt durch die Herstellung in den Wirkstoffzellen signifikant verringert ist ( $S_{\text{int}} = 255,3$ ;  $SD = 17,95$ ).

Das **DKK1** (*Dickkopf homolog 1*) wurde von Hirata et al. (2011) als Tumorsuppressorgen in Nierenzellkarzinomen identifiziert. Die Hypermethylierung und eine repressive Histon-Modifikation der DKK1-Promotorregion führen gegenüber Normalgewebe zu einer deutlich

verminderten Expression von DKK1. Dabei ist die genaue biologische Funktion von DKK1 in Nierenzellkarzinomen bisher nicht bekannt. Im Gegensatz zu den von Hirata gezeigten Daten weisen die nativen B25-MOL-Zellen eine relativ hohe mRNA-Expression des DKK1-Gens auf ( $S_{\text{int}}= 1197,7$ ;  $SD= 122,38$ ). Im Verlauf des Herstellungsprozesses kommt es allerdings zu einer deutlichen Verminderung der mRNA-Expressionsstärke ( $S_{\text{int}}= 335,05$ ;  $SD= 0,002$ ).

Das **MET**-Protoonkogen kodiert die heterodimere transmembrane Rezeptortyrosinkinase c-Met. In papillären RCC, aber auch in anderen Tumorarten ist häufig eine Überexpression dieses Onkogens zu beobachten. Die Ergebnisse der hier durchgeführten Expressionsanalysen zeigen, dass dieses Gen auf mRNA-Ebene sowohl in nativen als auch in den Wirkstoffzellen eine sehr hohe stabile Expressionsstärke aufweist ( $S_{\text{int}}= 4805,0$ ;  $SD= 569,9$ ). Die mRNA-Expression dieses TAA unterliegt damit keiner herstellungsbedingten Genregulation.

Ebenso zeigt das nicht-klassische humane MHC-Klasse-I-Molekül G (**HLA-G**) auf Ebene der Microarray-Analyse sowohl in den nativen B25-MOL-Zellen wie auch in den Wirkstoffzellen ein sehr hohes Expressionsniveau. Auch hier kann keine herstellungsbedingte Genregulation festgestellt werden ( $S_{\text{int}}= 5585,4$ ;  $SD= 283,9$ ). Eine Proteinexpression von HLA-G auf Tumorzellen wird häufig in RCC nachgewiesen und kann zur Anergie in T-Lymphozyten und NK-Zellen führen.

Der epidermale Wachstumsfaktorrezeptor **EGFR** (*epidermal growth factor receptor*) ist eine Rezeptortyrosinkinase, die hauptsächlich in epithelialen Zellen des humanen Organismus exprimiert wird. Eine Überexpression wird häufig in klarzelligen RCC beobachtet und steht in Verbindung mit der Inaktivierung des VHL-Tumorsuppressorgen und der damit assoziierten konstitutiven Aktivierung von HIF (Pfaffenroth et al., 2008). Auch die im Rahmen dieser Arbeit analysierten Zellen weisen eine hohe Genexpression des EGF-Rezeptors auf mRNA-Ebene, in unbehandelten nativen Zellen sowie in den Wirkstoffzellen auf (vgl. Tabelle 7.4). Eine Änderung der Expressionsstärke von EGFR auf mRNA-Ebene, bedingt durch den Herstellungsprozess, kann nicht nachgewiesen werden ( $S_{\text{int}}= 2140,2$ ;  $SD= 29,73$ ).



## 4.6 mRNA-Expressionsnachweis mittels Taqman® basierter qPCR

Die Validierung der Ergebnisse der Microarray-basierten Expressionsanalysen erfolgt unter Verwendung der Taqman® basierten quantitativen PCR (qPCR). Dabei wird das Expressionsniveau von 95 ausgewählten regulierten bzw. stabil exprimierten Genen in Wirkstoffzellen (drei biologische Replikate) und nativen B25-MOL-Zellen (drei biologische Replikate) bestimmt. Hierzu werden drei weitere Versuchsansätze zur Herstellung von Wirkstoffzellen durchgeführt und jeweils extrahierte RNA der nativen wie der Wirkstoffzellen verwendet.

Anhand dieser Daten soll festgestellt werden, ob die mittels Microarray erhobenen Expressionsdaten mit einer anderen experimentellen Methode bestätigt werden können, um allgemeingültige Aussagen über die herstellungsbedingten Veränderungen der Genexpression treffen zu können.

Für die Analyse werden kommerzielle „Taqman® Gene Expression Assays“ (Tabelle 2.2), sowie Primer und Sonden verwendet, welche mit Hilfe der „Primer 3 Software™“ (Applied Biosystems) entworfen und ausgewählt wurden (Tabelle 2.1).

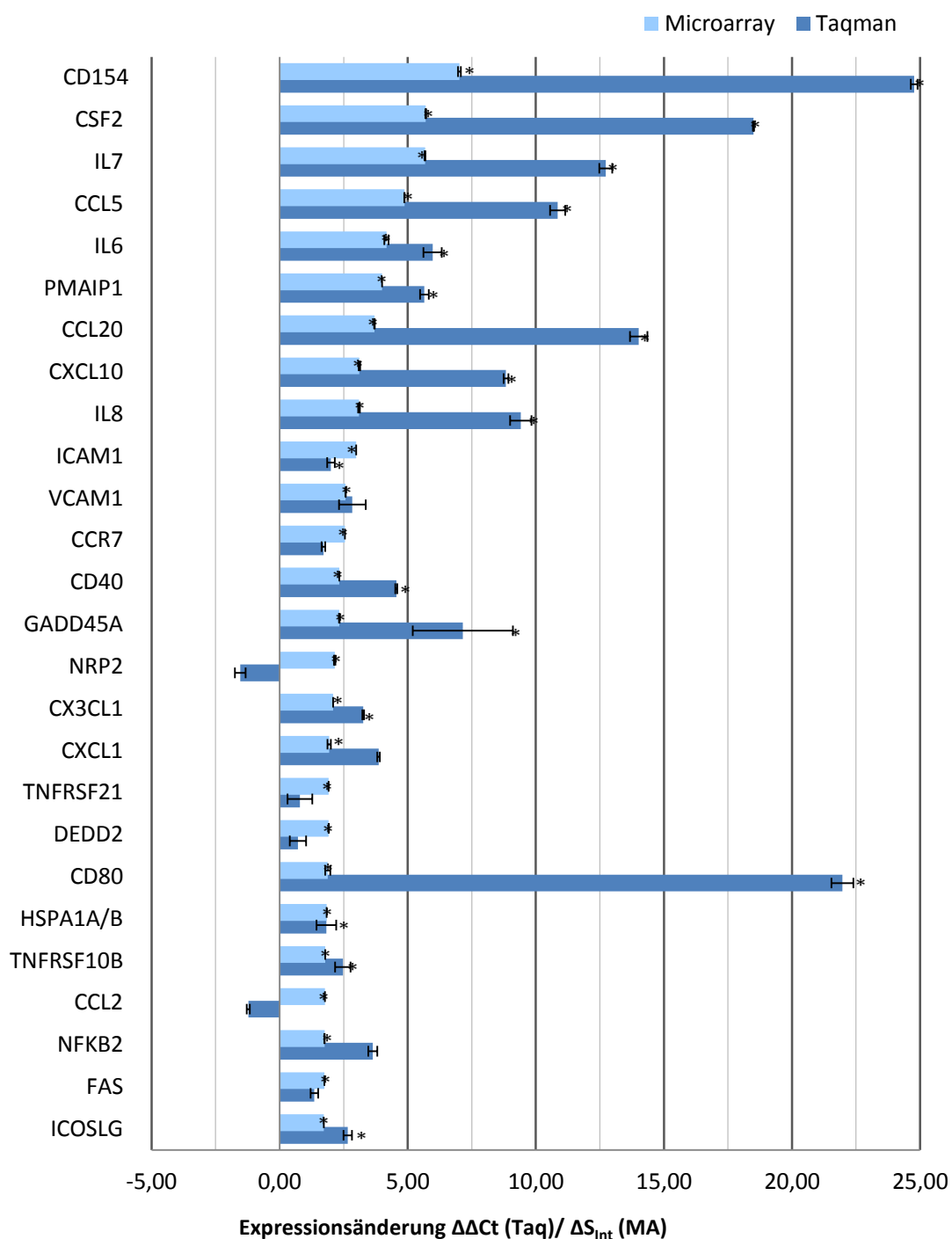
Die Auswahl dieser 95 Gene erfolgt unter Berücksichtigung ihrer biologischen Relevanz in den ausgewählten funktionellen Gengruppen und Pathways. Zur Normalisierung der Daten wird das Expressionsniveau von vier „Housekeeping“-Genen analysiert (18S, GAPDH, HPRT1, GUSB). Die Auswertung der Taqman®-Daten dieser „Housekeeping“-Gene ergibt für GUSB mit einem mittleren Ct-Wert von 25,742 und einer Standardabweichung (SD) von 0,6552, die geringsten Schwankungen im Genexpressionsniveau über alle analysierten Versuchsproben, weshalb dieses Gen zur Normalisierung der Taqman®-Daten ausgewählt wird.

Die Berechnung der relativen Änderung der mRNA-Expression erfolgt unter Anwendung der komparativen  $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode (Schmittgen et al., 2008). Dabei gilt analog zu den Microarray-Analysen ein Gen als differentiell exprimiert, wenn dessen Expressionsstärke einer mindestens dreifachen Regulation unterliegt. Die Signifikanzberechnung erfolgt mit Hilfe des ungepaarten t-Test, der unter der Annahme unterschiedlicher Varianzen der Proben durchgeführt wird. Entsprechend gängigen Kriterien gilt ein Unterschied als signifikant, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit  $< 5\%$  ( $p < 0,05$ ) ist. Eine Zusammenfassung aller mittels Taqman® basierter qPCR ermittelten Ergebnisse listet die Tabelle 7.5 (S.201) im Anhang auf.

In der Gruppe der verstärkt exprimierten Gene kann für 21 der 26 analysierten Gene auf der Grundlage der Ergebnisse der Taqman®-Analysen eine erhöhte Expression in den Wirkstoffzellen bestätigt werden (Abbildung 4.17). Meist liegt die ermittelte Änderung der Genexpression in einem ähnlichen Bereich wie die ermittelten Ergebnisse zuvor anhand der Microarray-basierten Expressionsanalysen. So bestätigt sich die gesteigerte mRNA-Expression einer Reihe von Genen, die im Zusammenhang mit der NK-Zellinteraktion beschrieben sind (ICOSLG, ICAM1), ebenso die erhöhte Genexpression Apoptose-assoziiierter Gene (GADD45A, PMAIP, TNFRSF10B) sowie von Genen, die mit der Aktivierung, Differenzierung und Proliferation von Lymphozyten im Zusammenhang stehen (CD40, ICOSLG, CD80, CD154). Auch für eine Reihe von Zytokinen (IL-7, IL-6, IL-8, CCL5, CCL20, CXCL10, GM-CSF), für die anhand der Ergebnisse der Microarray-Analysen eine signifikant erhöhte Genexpression in den Wirkstoffzellen festgestellt werden konnte, bestätigt sich eine differentielle Genexpression.

In einigen Fällen übersteigt die mittels Taqman® qPCR bestimmte Änderung der Expression die ermittelte Änderung der Expression in den Microarray-basierten Analysen um einige Größenordnungen. Insbesondere trifft dies auf die vier, mittels Transfektion eingebrachten Expressionskassetten zu (CD80, CD154, GM-CSF und IL-7). Allerdings wird dieses Phänomen auch für andere Gene (z.B. CCL20, CCL5) beobachtet.

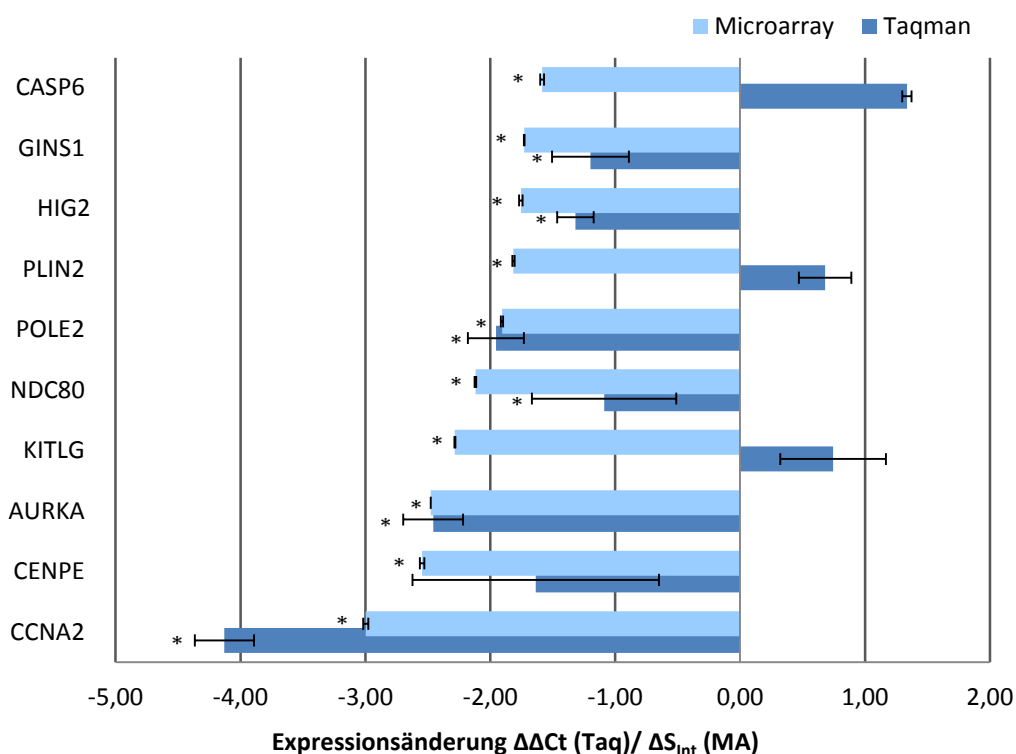
Für 5 der 26 analysierten Gene bestätigt sich die erhöhte mRNA-Expression in den Wirkstoffzellen nicht. Die Auswertung der Expressionsdaten mittels Taqman® qPCR-Analyse ergeben für Fas, CCL2, DEDD2, TNFRSF21 und NRP2 jeweils eine Expressionsänderung < Faktor 3 und damit eine unveränderte mRNA-Expression.



**Abbildung 4.17 Validierung der ermittelten Steigerung der Expression mittels Taqman® qPCR**

Gegenüberstellung der log<sub>2</sub> basierten Expressionsänderung der Microarray-Analysen ( $\Delta S_{int}$ ) und der  $\Delta\Delta Ct$ -Werte der Taqman® qPCR-Analysen. Dargestellt sind die berechneten Mittelwerte der Expressionsänderung und deren Standardfehler. \*  $p < 0,05$  (t-test, für Taqman® qPCR; moderater t-test, für Microarray)

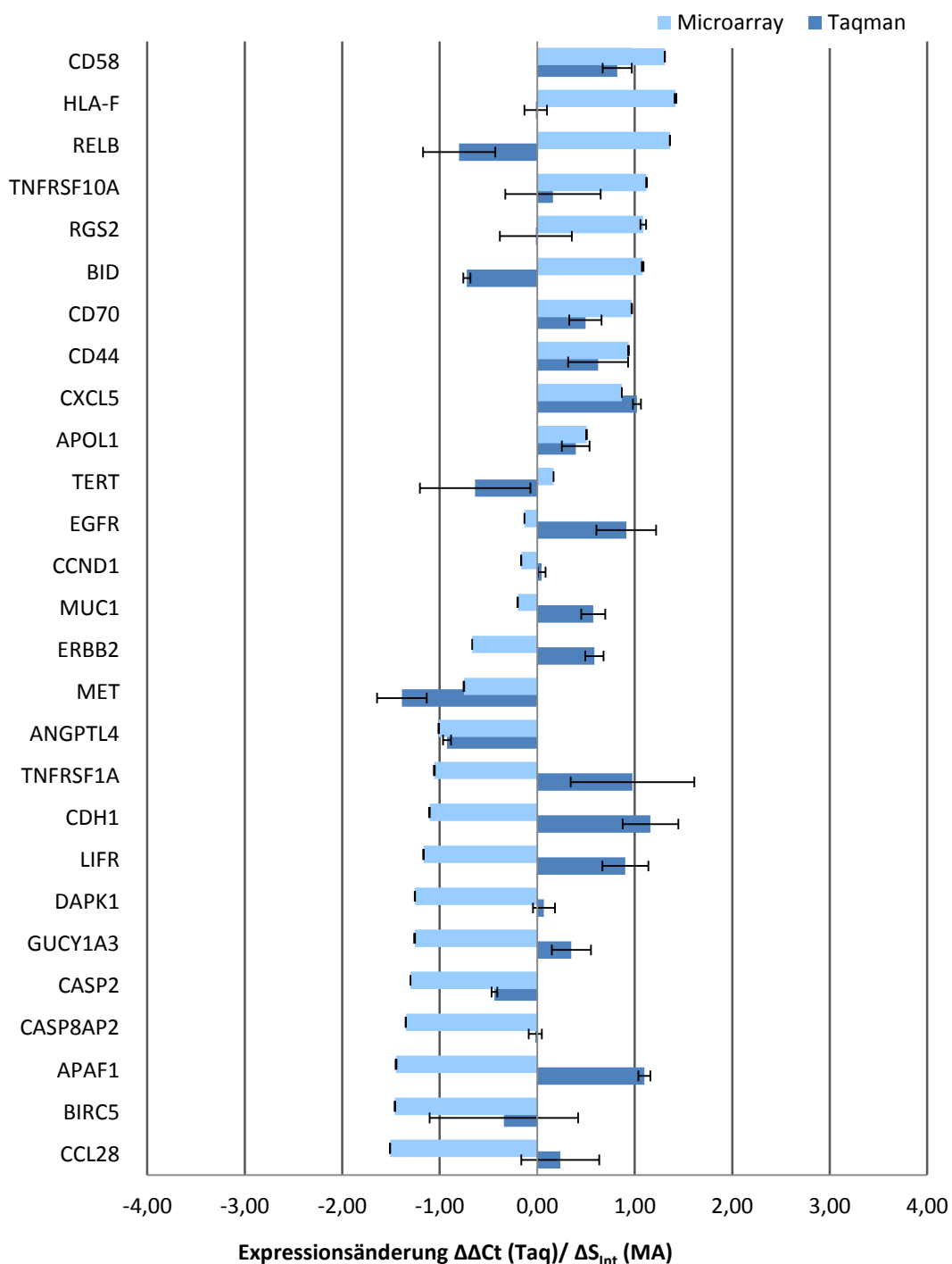
Aus der Gruppe der vermindert exprimierten Gene werden 10 ausgewählt, um deren Expressionsstärke in nativen B25-MOL und Wirkstoffzellen mit Taqman® qPCR zu untersuchen. Eine verminderte Expression in den Wirkstoffzellen kann nur für 4 der 10 ausgewählten Gene (CCNA2, POLE2, AURKA und CENPE) bestätigt werden. Für die anderen analysierten Gene wird eine stabile mRNA-Expression festgestellt (Abbildung 4.18).



**Abbildung 4.18 Validierung vermindert exprimierter Gene mittels Taqman® qPCR**

Gegenüberstellung der  $\log_2$  basierten Expressionsänderung der Microarray-Analysen ( $\Delta S_{int}$ ) und der  $\Delta\Delta Ct$ -Werte der Taqman® qPCR-Analysen. Dargestellt sind die berechneten Mittelwerte der Expressionsänderung und deren Standardfehler. \*  $p < 0,05$  (t-test, für Taqman® qPCR; moderater t-test, für Microarray)

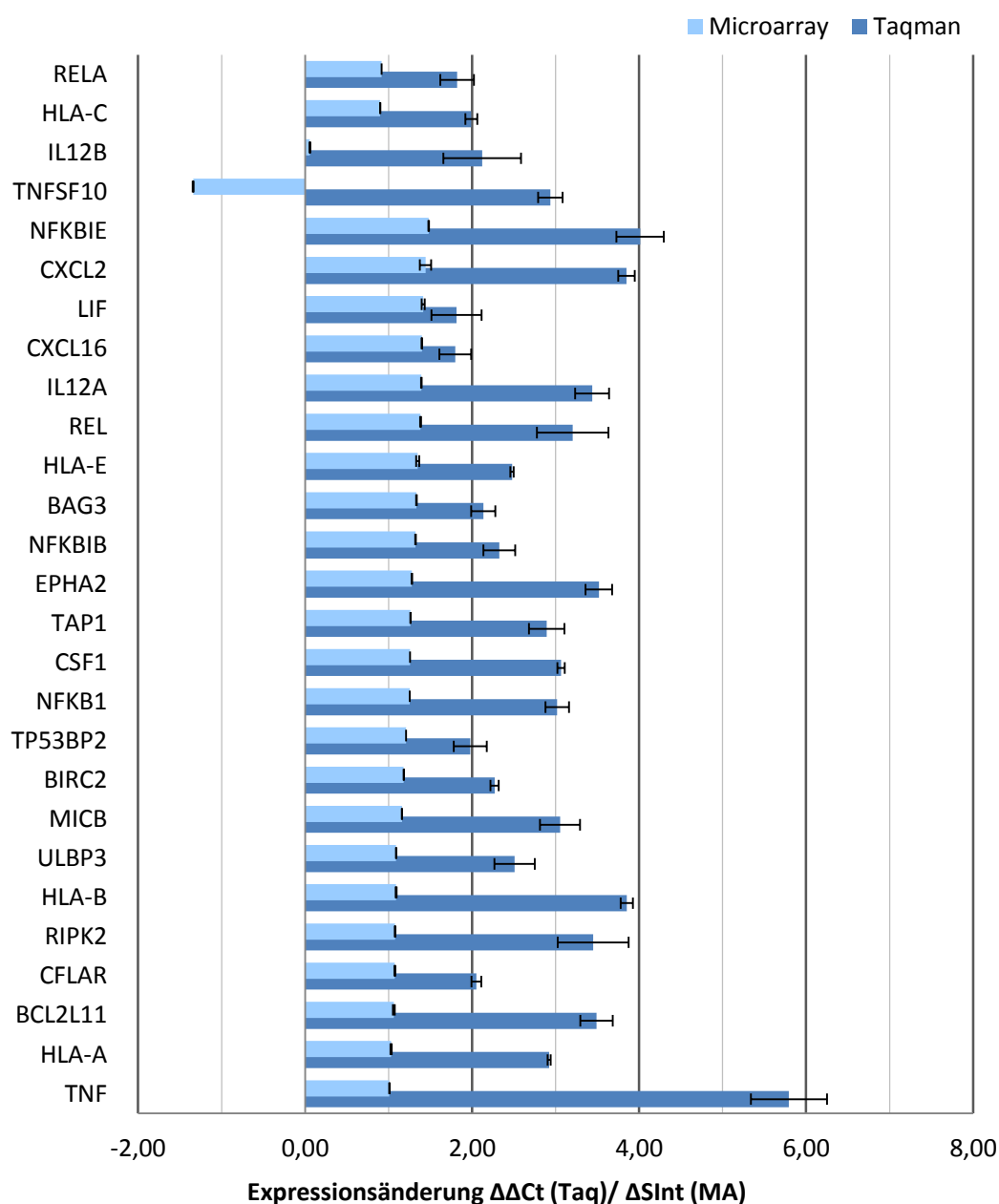
Die größte Gruppe (59 Gene) der zum Validieren ausgesuchten Gene besteht aus solchen, die eine stabile Expression in den mittels Microarray-Analysen untersuchten Proben aufweisen. Darunter sind hauptsächlich TAA, die eine hohe Expression aufweisen. Für insgesamt 27 dieser Gene kann die stabile mRNA-Expression bestätigt werden (Abbildung 4.19). So ergibt die Auswertung der Taqman® qPCR-Analysen für die Expression des c-Met Protoonkogens keine Änderung der mRNA-Expression des MET-Gens beim Vergleich der nativen B25-MOL-Zellen mit den Wirkstoffzellen. Die Ergebnisse für CD44 oder EGFR deuten ebenfalls auf eine unveränderte mRNA-Expression dieser Gene hin. Ebenso bestätigen die Ergebnisse der Taqman® qPCR-Analysen, dass die drei TAA MAGEA1, MAGEA3 und NAIP weder in den nativen B25-MOL-Zellen noch in den Wirkstoffzellen exprimiert werden. Neben den TAA werden auch aus den anderen ausgewählten funktionellen Gengruppen einige stabil exprimierte Gene ausgewählt, um deren unveränderte mRNA-Expression zu bestätigen. Für viele der ausgewählten Gene, die beispielsweise mit der Apoptose assoziiert (APAF1, BID, CASP2, DAPK1) oder im Zusammenhang mit Zytokinen und Chemokinen (CXCL5, CCL28) beschrieben sind, kann die zuvor beobachtete unveränderte mRNA-Expression, die sich aus den Ergebnissen der Microarray-Analysen ableiten lassen, bestätigt werden (Abbildung 4.19).



**Abbildung 4.19 Validierung stabil exprimierter Gene (Microarray-Analyse) mittels Taqman® qPCR**

Gegenüberstellung der  $\log_2$  basierten Expressionsänderung der Microarray-Analysen ( $\Delta S_{int}$ ) und der  $\Delta\Delta Ct$ -Werte der Taqman® qPCR-Analysen. Dargestellt sind die berechneten Mittelwerte der Expressionsänderung und deren Standardfehler.

Im Gegensatz dazu wird für eine Reihe von Genen, für die anhand der Microarray-Analysen eine stabile Expression ermittelt wurde, im Rahmen der Taqman® basierten qPCR-Analysen eine differentielle Genexpression festgestellt (Abbildung 4.20).



**Abbildung 4.20 Vergleich der Microarray und Taqman qPCR basierten ermittelten Veränderungen der Expressionsstärke: Expressionsanalysen ergeben für diese Gene widersprüchliche Ergebnisse**

Gelistete Gene weisen laut Microarray-Analysen eine stabile Expression im Verlauf der Herstellung auf, während die Analysen der Taqman qPCR auf eine differentielle Expression zwischen den nativen B25-MOL und den Wirkstoffzellen ergeben. Gegenüberstellung der  $\log_2$  basierten Expressionsänderung der Microarray-Analysen ( $\Delta S_{Int}$ ) und der  $\Delta\Delta C_t$ -Werte der Taqman<sup>®</sup> qPCR-Analysen. Dargestellt sind die berechneten Mittelwerte der Expressionsänderung und deren Standardfehler. \*  $p < 0,05$  (t-test, für Taqman<sup>®</sup> qPCR; moderater t-test, für Microarray)

Die größte Diskrepanz zeigt die mRNA-Expression von HLA-G. Während mittels der Microarray-basierten Analysen ein sehr hohes Signal für dieses Gen in nativem, wie in Wirkstoffzellen detektiert wird, ist ein spezifisches mRNA-Transkript im Rahmen der Taqman<sup>®</sup> qPCR-Analysen in keiner der verwendeten RNA-Proben nachweisbar. Andere Gene des MHC, für die anhand der Microarray-basierten Analysen keine signifikante herstellungsbedingte Änderung der Genexpression nachweisbar ist, zeigen in den Taqman<sup>®</sup>-Analysen eine gesteigerte mRNA-

Expression (HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-E). Während dieses Phänomen für MHC-Gene durch eine technische Unzulänglichkeit des Human GeneChip®1.0 ST erklärbar ist, auf die in der Diskussion näher eingegangen wird (vgl. 5.3.6 Expression Tumor-assoziiertes Antigen; S.164), kann für andere Gene, für die anhand der hier verwendeten mRNA-Nachweistechiken unterschiedliche Ergebnisse ermittelt werden, keine Ursache identifiziert werden. Die Ergebnisse der qPCR-Analysen zeigen, dass auch einige Zytokine (CXCL2, TNF, CXCL16) und Apoptose-assoziierte Gene (BAG3, BCL2L11, CFLAR) eine gesteigerte Genexpression in den Wirkstoffzellen aufweisen, während die Ergebnisse der Microarray-Analysen eher auf eine stabile mRNA-Expression hindeuten.

## 4.7 Proteinnachweis einiger ausgewählter Gene

Der Nachweis einer verminderten oder gesteigerten Expression auf mRNA-Ebene lässt nicht in jedem Fall auf eine korrelierende Veränderung der Proteinexpression schließen. Eine auftretende Diskrepanz zwischen der Expression einer mRNA und der korrelierenden Menge des resultierenden Proteins kann verschiedene Ursachen haben: (i) regulatorische Mechanismen, die auf posttranskriptioneller und/oder posttranslationaler Ebene wirken, (ii) Faktoren, welche die Stabilität der mRNA beeinflussen, wie beispielsweise ein verstärkter oder verminderter Abbau der mRNA, sowie (iii) die unterschiedlichen Halbwertszeiten der RNAs und Proteine.

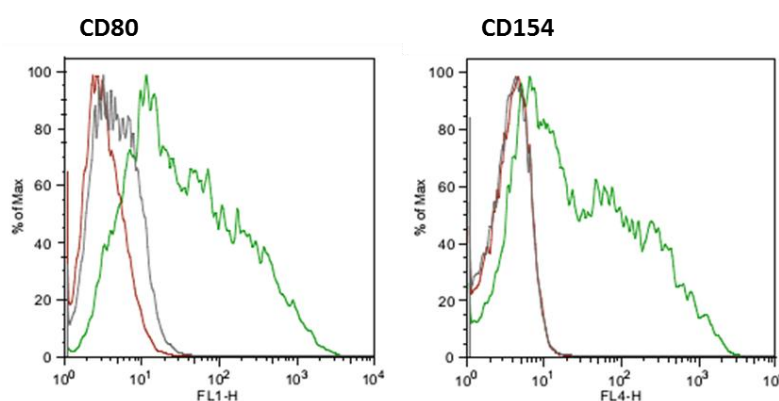
Aus diesem Grund werden einige der bereits besprochenen Gene ausgewählt und deren Proteinexpression in nativen B25-MOL-Zellen und Wirkstoffzellen analysiert. Der Nachweis erfolgt mittels direkter Antikörperfärbung an der Zelloberfläche und anschließender durchflusszytometrischen Analyse bzw. mittels ELISA oder Bead Array in Proben aus Zellkulturüberstand.

### 4.7.1 Zelloberflächenproteine

Antigene, die an der Zelloberfläche exprimiert werden, werden mit Hilfe direkter Antikörperfärbung und anschließender durchflusszytometrischen Analyse nachgewiesen. Um herstellungsbedingte Unterschiede zwischen nativen B25-MOL-Zellen und den Wirkstoffzellen festzustellen, werden diese zunächst aufgetaut, in Normalmedium angesät und für 6 h inkubiert (37°C, 5 % CO<sub>2</sub>, 95 % Luftfeuchtigkeit). Anschließend wird eine direkte Antikörperfärbung durchgeführt (vgl. 3.1.7 Durchflusszytometrische Analyse von

Zelloberflächen-Antigen; S.44). Die Diskriminierung der toten Zellen erfolgt je nach verwendetem Antikörper mit Propidiumiodid oder 7-AAD.

CD80 und CD154 werden jeweils als Expressionskassette im Verlauf des Herstellungsprozesses in die Zellen eingebracht und führen zu deutlich erhöhten mRNA-Konzentrationen, die sowohl im Microarray- als auch im Taqman®-basierten System nachweisbar sind. Erwartungsgemäß weisen die Wirkstoffzellen eine hohe Proteinexpression beider Oberflächenantigene (Geomean<sub>CD80</sub>= 31,21; Geomean<sub>CD154</sub>= 25,55) auf, während eine entsprechende Proteinexpression an der Zelloberfläche der nativen B25-MOL-Zellen von CD80 oder CD154 (Abbildung 4.21) nicht nachweisbar ist.

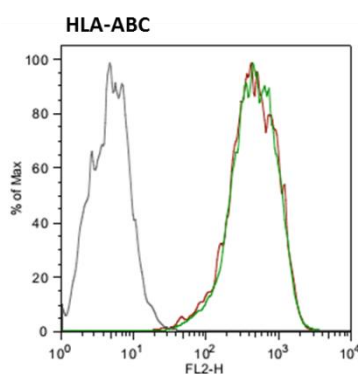


**Abbildung 4.21 Oberflächenexpression CD80 und CD154 auf lebenden nativen B25-MOL und Wirkstoffzellen**

Dargestellt sind repräsentative Histogramme der Oberflächenexpression der lebenden nativen B25-MOL-Zellen (rot) und Wirkstoffzellen (grün). Als weitere Kontrolle sind Histogramme einer geeigneten Isotypkontrolle auf den Wirkstoffzellen mit abgebildet (grau). In den Histogrammen ist die Fluoreszenzintensität (Abszisse, logarithmisch) gegen die Zellzahl (Ordinate, % der max. Zellzahl) aufgetragen.

Die MHC-Klasse-I-Moleküle stellen eine essentielle Gruppe an Oberflächenantigenen. Sie binden und präsentieren geeignete Antigenpeptide an der Zelloberfläche und sind damit unerlässlich für die TCR-vermittelte Aktivierung von CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten. Der Nachweis der Zelloberflächenexpression aller klassischen MHC-Klasse-I-Moleküle (HLA-A, -B, -C) erfolgt mittels eines monoklonalen Antikörpers, der an ein Epitop bindet, welches allen MHC-Klasse-I-Molekülen gemein ist. Die nativen B25-MOL-Zellen weisen eine hohe konstitutive Expression der klassischen MHC-Klasse-I-Moleküle auf (HLA-A, -B und -C; Geomean= 458,3; Abbildung 4.22). Die Zelloberflächenexpression der Wirkstoffzellen zeigt eine fast ebenso hohe Expressionsstärke dieser Zelloberflächenproteine (Geomean= 441,3). Durch die Verwendung eines panspezifischen Antikörpers kann die differentielle Expression von Molekülen einer speziellen HLA-I-Subklasse jedoch nicht identifiziert werden; eine verstärkte Expression würde sich ausschließlich durch eine Änderung im Geomean niederschlagen.

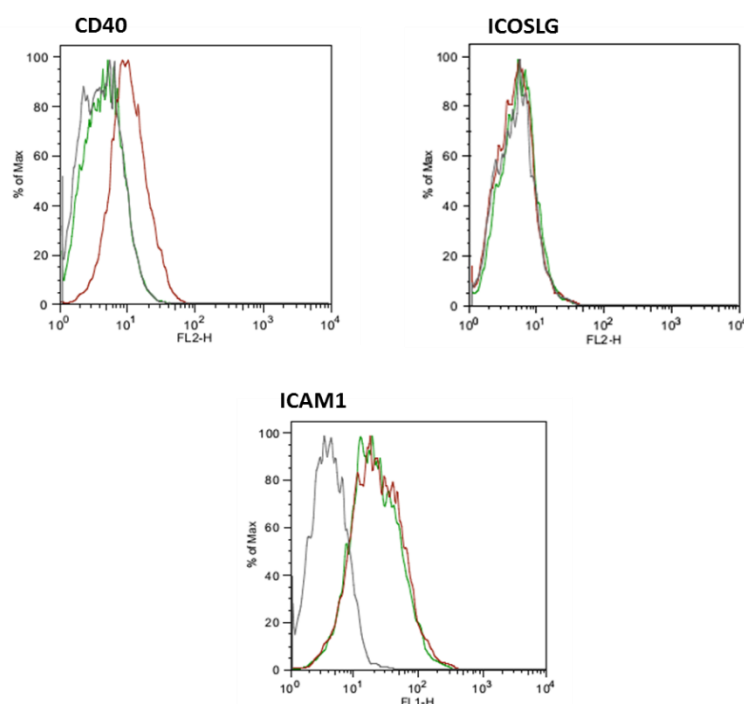




**Abbildung 4.22 Zelloberflächenexpression klassische HLA-Klasse-I-Moleküle auf lebenden nativen B25-MOL und Wirkstoffzellen.**

Dargestellt sind repräsentative Histogramme der Oberflächenexpression der lebenden B25-MOL-Zellen (rot) und Wirkstoffzellen (grün). Als Kontrolle sind geeignete Isotypkontrolle auf den Wirkstoffzellen mit abgebildet (grau). In den Histogrammen ist die Fluoreszenzintensität (Abszisse, logarithmisch) gegen die Zellzahl (Ordinate, % der max. Zellzahl) aufgetragen.

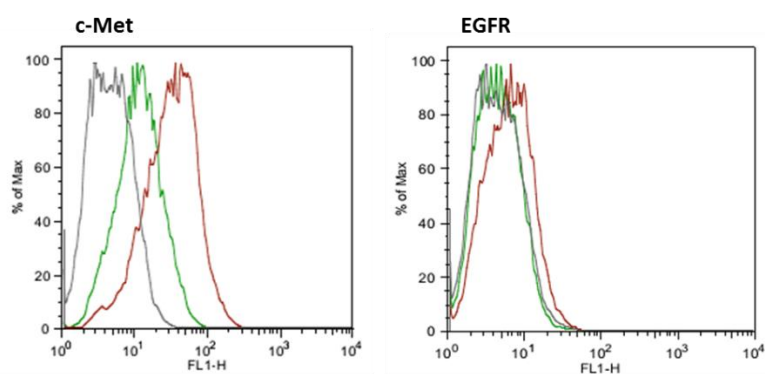
Für die Interaktion der Wirkstoffzellen mit den Immunzellen sind neben den MHC-Molekülen auch kostimulatorische Moleküle und Adäsionsmoleküle notwendig. Neben der Expression von CD80 und CD154 wird außerdem die Oberflächenexpression der kostimulatorischen Moleküle ICOSLG und CD40 analysiert sowie des Adhäsionsmoleküls ICAM1. Obwohl für CD40 eine verstärkte Expression der mRNA in den Wirkstoffzellen nachweisbar ist, wird auf Proteinebene eine geringere Expressionsstärke detektiert. Der Geomean der CD40-Expression verringert sich um 93,5 % ( $\text{Geomean}_{\text{nativ}} = 6,2$ ). Eine CD40-Proteinexpression auf den Wirkstoffzellen ist kaum noch nachweisbar ( $\text{Geomean}_{\text{Wirkstoffzellen}} = 0,4$ ; Abbildung 4.23). Die Zelloberflächenexpression von ICAM1 in den nativen B25-MOL-Zellen und den Wirkstoffzellen zeigt dagegen keine signifikante Veränderung ( $\text{Geomean}_{\text{nativ}}(\text{ICAM1}) = 52,0$ ;  $\text{Geomean}_{\text{Wirkstoffzellen}}(\text{ICAM1}) = 39,1$ ). Eine Proteinexpression von ICOSLG kann weder auf den nativen B25-MOL-Zellen noch auf den Wirkstoffzellen detektiert werden, obwohl auf mRNA-Ebene ein Anstieg der Expression nachweisbar ist.



**Abbildung 4.23** Oberflächenexpression CD40, ICOSLG und ICAM1 auf lebenden nativen B25-MOL und Wirkstoffzellen.

Dargestellt sind repräsentative Histogramme der Oberflächenexpression der lebenden B25-MOL-Zellen (rot) und Wirkstoffzellen (grün). Als Kontrolle sind geeignete Isotypkontrolle auf den Wirkstoffzellen mit abgebildet (grau). In den Histogrammen ist die Fluoreszenzintensität (Abszisse, logarithmisch) gegen die Zellzahl (Ordinate, % der max. Zellzahl) aufgetragen.

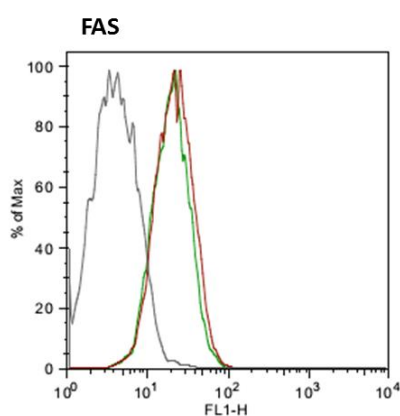
Des Weiteren wird die Proteinexpression von TAA durchflusszytometrisch analysiert. Sowohl c-Met, als auch EGFR, deren mRNA-Daten auf eine stabile Expression hinweisen, zeigen auf Proteinebene eine verminderte Expressionsstärke auf der Zelloberfläche der Wirkstoffzellen (Abbildung 4.24). Dabei zeigt c-Met eine Reduktion der Proteinexpression auf 27,7 % der ursprünglichen Expressionsstärke ( $\text{Geomean}_{\text{nativ}} = 24,9$ ;  $\text{Geomean}_{\text{Wirkstoffzellen}} = 6,9$ ), während sich die Expressionsstärke von EGFR um 42,7 % vermindert ( $\text{Geomean}_{\text{nativ}} = 19,0$ ;  $\text{Geomean}_{\text{Wirkstoffzellen}} = 10,9$ ).



**Abbildung 4.24 Oberflächenexpression c-Met (MET) und EGFR auf lebenden nativen B25-MOL und Wirkstoffzellen.**

Dargestellt sind repräsentative Histogramme der Oberflächenexpression der lebenden B25-MOL-Zellen (rot) und Wirkstoffzellen (grün). Als Kontrolle sind geeignete Isotypkontrolle auf den Wirkstoffzellen mit abgebildet (grau). In den Histogrammen ist die Fluoreszenzintensität (Abszisse, logarithmisch) gegen die Zellzahl (Ordinate, % der max. Zellzahl) aufgetragen.

Die mRNA-Daten für den TNF-Rezeptor Fas zeigen ein widersprüchliches Bild. Die Analyse der Expressionsdaten aus den Microarrays weist auf eine gesteigerte Expression hin. Jedoch bestätigen die Ergebnisse der Taqman® qPCR dies nicht, da unter Anwendung dieser Methode eine stabile mRNA-Expression in den Versuchsproben nachweisbar ist (vgl. 4.6 mRNA-Expressionsnachweis mittels Taqman® basierter qPCR; S.103). Die durchflusszytometrische Analyse dieses Apoptose-assoziierten Rezeptors zeigt keine veränderte Proteinexpression im Vergleich der nativen B25-MOL-Zellen mit den Wirkstoffzellen ( $Geomean_{\text{nativ}} = 17,8$ ;  $Geomean_{\text{Wirkstoffzellen}} = 16,2$ ; Abbildung 4.25).



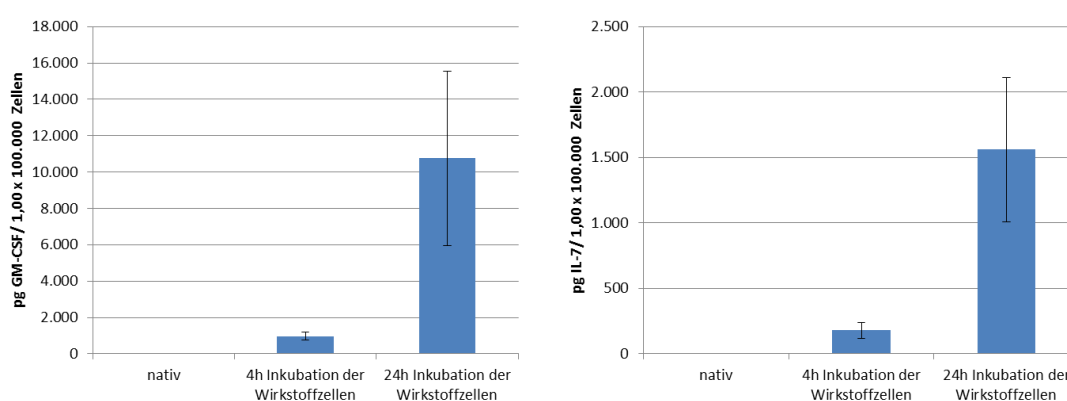
**Abbildung 4.25 Zelloberflächenexpression FAS auf lebenden nativen B25-MOL und Wirkstoffzellen.**

Dargestellt ist ein repräsentatives Histogramm der Oberflächenexpression der lebenden nativen B25-MOL-Zellen (rot) und Wirkstoffzellen (grün). Als weitere Kontrolle sind Histogramme einer geeigneten Isotypkontrolle auf den Wirkstoffzellen mit abgebildet (grau). In den Histogrammen ist die Fluoreszenzintensität (Abszisse, logarithmisch) gegen die Zellzahl (Ordinate, % der max. Zellzahl) aufgetragen.

#### 4.7.2 Sezernierte Proteine

Der Nachweis der Zytokine erfolgt unter Verwendung von DuoSet ELISA (R&D Systems Inc.; vgl. 2.5.3 ELISA; S.29) sowie eines Bead Arrays (Bender MedSystems), der die Detektion mehrerer Zytokine in einer Probe ermöglicht (vgl. 2.5.4 Bead Array; S.29).

Analysiert werden ausschließlich Zytokine, die eine gesteigerte mRNA-Expression in den Wirkstoffzellen aufweisen. Dazu zählen neben IL-7 und GM-CSF, deren Expression durch Transfektion entsprechender Vektoren induziert wurde, auch Zytokine, die bedingt durch den Herstellungsprozess eine gesteigerte mRNA-Expression zeigen (CCL5, CCL2, CXCL10, CCL20, IL-6 und IL-8).



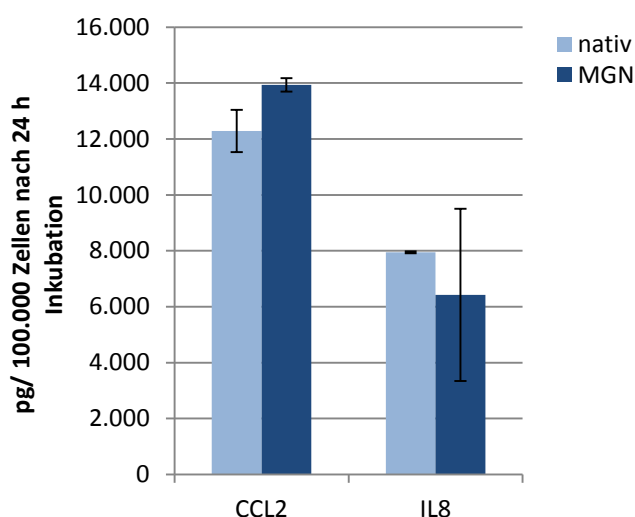
**Abbildung 4.26 Zytokin-Mengen im Überstand nativer B25-MOL-Zellen und Wirkstoffzellen**

Die Detektion der sezernierten Zytokine erfolgt in Zellkulturüberstand, nach 4stündiger bzw. 24stündiger Inkubation von nativen B25-MOL-Zellen (nativ) bzw. Wirkstoffzellen unter normalen Kultivierungsbedingungen mittels ELISA. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung aus mindestens 2 unabhängigen Experimenten.

Der Nachweis der Proteinexpression der beiden durch Transfektion eingebrachten Zytokin-kodierenden Expressionskassetten erfolgt unter Verwendung der entsprechenden DuoSet ELISA für humanes IL-7 bzw. GM-CSF. Nach 4stündiger sowie 24stündiger Inkubation (37°C, 5 % CO<sub>2</sub>, 95 % Luftfeuchtigkeit) der Wirkstoffzellen ist eine hohe Proteinkonzentration von **IL-7** und **GM-CSF** im Zellkulturüberstand detektierbar. Im Gegensatz dazu ist im Überstand von nativen B25-MOL-Zellen (nach 24stündiger Inkubation) keines der beiden Zytokine nachweisbar (Abbildung 4.26). Während im Überstand der Wirkstoffzellen nach einer 4stündigen Inkubationsphase die Menge an IL-7 und GM-CSF noch relativ gering sind, ist nach einer 24stündigen Inkubationsphase nahezu die 10fache Menge jedes der beiden Zytokine im Überstand nachweisbar. Im Überstand der Wirkstoffzellen, die für 4 h inkubiert wurden, können keine signifikanten Mengen der Zytokine detektiert werden, deren mRNA-Expression bedingt durch den Herstellungsprozess eine Steigerung erfahren. In der Annahme, dass ein größerer Zeitraum nötig ist, damit signifikante Mengen dieser Zytokine im Zellkulturüberstand

nachweisbar sind, werden die Zellen für 24 h inkubiert (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>, 95 % Luftfeuchtigkeit). Die Ergebnisse des Nachweises sezernierter Zytokine im Zellkulturüberstand nach 24stündiger Inkubation von nativen B25-MOL und Wirkstoffzellen sind in Abbildung 4.27 und Abbildung 4.28 dargestellt und werden Im Folgenden näher erörtert.

Sowohl die nativen B25-MOL-Zellen als auch die Wirkstoffzellen sezernieren große Mengen **CCL2**. Im Zellkulturüberstand der Wirkstoffzellen ist mit 13.934,8 pg/ 100.000 Zellen jedoch nicht signifikant mehr CCL2 nachweisbar als im Zellkulturüberstand der nativen B25-MOL-Zellen (Abbildung 4.27). Auch **IL-8** wird sowohl von den nativen B25-MOL-Zellen als auch von den Wirkstoffzellen sezerniert. Es kann jedoch keine Aussage darüber getroffen werden, ob von den Wirkstoffzellen eine andere Menge IL-8 sezerniert wird als von den nativen B25-MOL-Zellen. Die Ursache liegt in der geringen Anzahl durchgeführter IL-8 Proteinnachweise (n= 2), die zu stark unterschiedlichen Ergebnissen geführt haben, weshalb weitere Analysen notwendig sind, um zu klären ob die Wirkstoffzellen eine veränderte IL-8 Proteinexpression aufweisen (Abbildung 4.27).

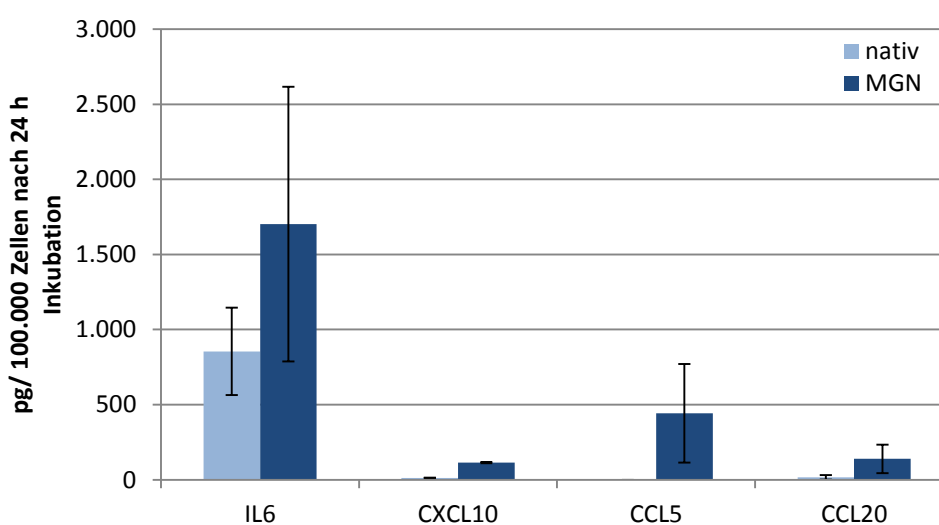


**Abbildung 4.27 Zytokinmenge (CCL2, IL-8) im Zellkulturüberstand nach 24stündiger Inkubation**

Der Nachweis der Zytokine erfolgte nach 24stündiger Inkubation von nativen B25-MOL-Zellen (nativ) und Wirkstoffzellen (MGN) unter normalen Kultivierungsbedingungen mittels Bead Array. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung aus mind. zwei unabhängigen Experimenten.

Die weiteren analysierten Zytokine zeigen deutlich geringere Proteinkonzentration im Zellkulturüberstand als IL-8 oder CCL2. So ist im Zellkulturüberstand der nativen B25-MOL-Zellen eine **IL-6**-Proteinkonzentration von 855 pg/ 100.000 Zellen nachweisbar. Dagegen wurde im Zellkulturüberstand der Wirkstoffzellen mit 1.701,5 pg/ 100.000 Zellen nahezu die doppelte Konzentration detektiert. Auch die Proteinkonzentration von **CXCL10** ist im Zellkulturüberstand der Wirkstoffzellen deutlich höher als im Zellkulturüberstand der nativen B25-MOL-Zellen. Die nativen B25-MOL-Zellen sezernieren über einen Zeitraum von 24 h nur

marginale Mengen an CXCL10 (13,05 pg/ 100.000 Zellen), während die Wirkstoffzellen im gleichen Zeitraum mit 114,6 pg/ 100.000 Zellen deutlich größere Mengen CXCL10 freisetzen. Ähnliches gilt für **CCL5**, das im Zellkulturüberstand der nativen B25-MOL-Zellen überhaupt nicht nachweisbar ist. Bedingt durch den Herstellungsprozess erfolgt eine deutliche Steigerung der Proteinexpression von CCL5; im Zellkulturüberstand der Wirkstoffzellen ist eine Proteinkonzentration von 442,1 pg/ 100.000 Zellen nachweisbar. Die Menge an **CCL20** im Zellkulturüberstand nativer B25-MOL-Zellen ist nur marginal (16,7 pg/ 100.000 Zellen). Im Zellkulturüberstand finaler Wirkstoffzellen kann dagegen eine deutlich höhere CCL20-Konzentration von 139,7 pg/ 100.000 Zellen detektiert werden (Abbildung 4.28).



**Abbildung 4.28** Zytokinmenge (IL-6, CXCL10, CCL5, CCL20) im Zellkulturüberstand nach 24stündiger Inkubation

Der Nachweis der Zytokine erfolgte nach 24stündiger Inkubation von nativen B25-MOL-Zellen (nativ) und Wirkstoffzellen (MGN) unter normalen Kultivierungsbedingungen mittels Bead Array bzw. ELISA. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung aus mind. zwei unabhängigen Experimenten.

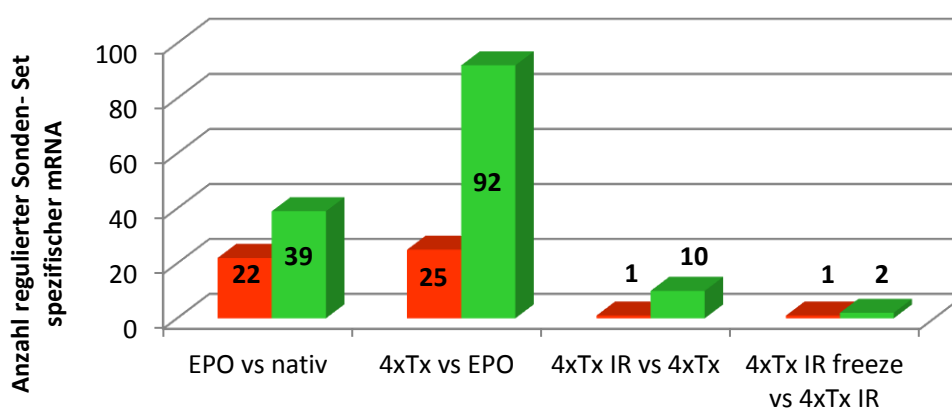
## 4.8 Einfluss der einzelnen Herstellungsschritte auf das Expressionsmuster der B25-MOL-Zellen

Das Expressionsmuster der Wirkstoffzellen wird nicht nur durch das Einbringen der vier Expressionskassetten beeinflusst, sondern auch durch die anderen Prozessschritte der Herstellung. Im zweiten Teil der Arbeit soll analysiert werden, welche Änderungen des Expressionsprofils auf welchen Prozessschritt zurückzuführen sind.

Wie unter „4.4 Differentielle Expressionsanalyse“ (S.72) bereits beschrieben, dienen dabei die detektierten Signalintensitäten der Zellen des vorausgegangenen Prozessschrittes als Referenz des folgenden Prozessschrittes. So werden jeweils nur die Gene als differentiell exprimiert

identifiziert, die gegenüber dem vorausgegangenen Prozessschritt eine signifikant veränderte Expression aufweisen.

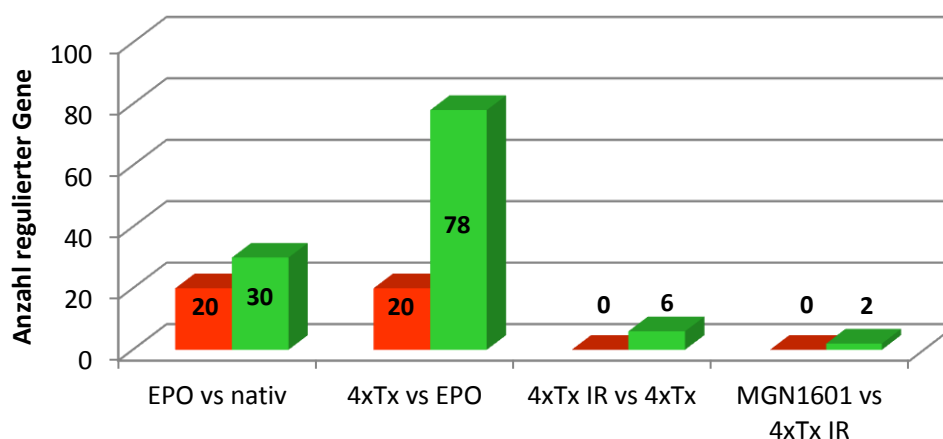
Beim Vergleich der Expressionslevel der nativen B25-MOL-Zellen mit denen der Zellen, die ohne Zugabe der MIDGE®-DNA-Vektoren elektroporiert wurden (EPO vs. nativ), können insgesamt 61 Sonden-Sets detektiert werden, die eine differentielle Expression zeigen. Dabei handelt es sich um 39 Sonden-Sets mit einer erhöhten Expression und 22 Sonden-Sets mit einer verminderten Expression. Die größten Veränderungen werden beim Vergleich der Expressionslevel der Zellen, die ohne Zugabe der MIDGE®-DNA-Vektoren elektroporiert wurden, mit denen der vierfach transfizierten Zellen beobachtet (MOK-hCD40-M, MOK-hCD154-M, MOK-hGM-CSF-M, MOK-hIL7-M; 4xTx vs. EPO). Insgesamt 117 Sonden-Sets zeigen eine differentielle Expression für die entsprechenden spezifischen mRNA auf, von denen 92 eine erhöhte und 25 eine verminderte Expression aufweisen. Die Bestrahlung der Zellen sowie der Einfrier- und Auftauprozess zeigen einen deutlich geringeren Einfluss auf das Expressionsmuster der modifizierten Zellen. So unterliegen in den bestrahlten Zellen im Vergleich zu den vierfach transfizierten Zellen nur 11 Sonden-Set-spezifische RNA einer differentiellen Expression, wobei 10 mRNA eine gesteigerte und eine mRNA eine verminderte Expression aufweisen. Die eingefrorenen und wieder aufgetauten Zellen zeigen gegenüber den bestrahlten Zellen noch geringere Veränderungen des Genexpressionsprofils. Anhand der ermittelten Expressionsdaten aus den Microarray-Analysen können insgesamt drei Sonden-Set-spezifische RNA mit einer differentiellen Expression detektiert werden. Davon zeigen zwei eine erhöhte und die Dritte eine verminderte Expression (Abbildung 4.29).



**Abbildung 4.29** Differentiell exprimierte Sonden-Sets

Die Ermittlung der differentiell exprimierten Sonden-Sets erfolgte jeweils unter Anwendung der TopTable-Funktion des OnechannelGUI-Paketes im Bioconductor. Als Schwellenwert für eine differentielle Expression wurde eine Änderung der Expression um das Dreifache festgelegt. Außerdem wurden nur solche Sonden-Sets als differentiell exprimiert angesehen, bei denen die Wahrscheinlichkeit für eine differentielle Expression bei über 50 % lag (B-Statistik). In Rot ist jeweils die Anzahl der vermindert exprimierten Sonden-Sets angegeben, während in Grün die verstärkt exprimierten Sonden-Sets dargestellt sind.

Für die funktionelle Zuordnung der differentiell exprimierten Gene werden die zu den Sonden-Sets gehörenden Annotationen mit Hilfe der „*Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery*“ (DAVID) ermittelt. Sonden-Sets ohne bekannte Annotation werden ausgeschlossen. Einige Gene sind mit mehreren Sonden-Sets auf dem verwendeten Gene Chip vertreten, was die Anzahl der differentiell exprimierten Gene gegenüber der der Sonden-Sets nochmals verringert. In Abbildung 4.30 ist die Anzahl der Gene dargestellt, die bedingt durch den jeweiligen Herstellungsschritt, eine differentielle Expression erfahren.



**Abbildung 4.30** Differentiell exprimierte Gene

Mit Hilfe der DAVID Datenbank werden den Sonden-Sets aus Abbildung 4.29 ihre entsprechenden Gen-Annotationen zugewiesen. Alle nicht annotierten Gene werden von weiteren Analysen ausgeschlossen. In Rot ist die Anzahl der vermindert exprimierten Gene dargestellt, während in Grün die Anzahl der verstärkt exprimierten Gene gezeigt ist.

Im folgenden Kapitel wird deutlich, dass die Elektroporation allein bereits Auswirkungen auf die Expression von 50 Genen hat. Durch das Einbringen der vier MIDGE®-DNA-Vektoren wird die Expression von 98 Genen beeinflusst. Dagegen haben das Bestrahlen der Zellen sowie der Einfrier- und Auftauprozess einen eher geringen Einfluss auf das Expressionsmuster der Zellen; so weisen nur sechs Gene nach der Bestrahlung und zwei Gene nach dem Einfrier- und Auftauprozess eine veränderte Expression auf.

#### 4.8.1 Einfluss der Elektroporation

Für die Analyse der differentiellen Expression, die durch die Elektroporation ohne Zugabe der MIDGE®-DNA-Vektoren verursacht wird, werden  $5 \times 10^6$  native B25-MOL-Zellen unter Verwendung der für den Herstellungsprozess der Wirkstoffzellen festgelegten Parameter ohne Zugabe der MIDGE®-DNA-Vektoren elektroporiert. Anschließend werden die Zellen für 6 h unter Kultivierungsbedingungen (37°C, 5 % CO<sub>2</sub>, 95 % Luftfeuchtigkeit) inkubiert. Als Referenz dienen native B25-MOL-Zellen, die in identischer Zellkonzentration in Normalmedium



ausgelegt und ebenfalls für 6 h kultiviert werden. Die RNA-Extraktion und Microarray-Analyse erfolgt wie unter „3.2.1 Gesamt-RNA-Extraktion“ (S.47) bzw. „3.3 Genexpressionsanalyse“ (S.53) beschrieben. Die Auswertung der Daten erfolgt unter Verwendung des Bioconductor Softwarepakets. Nach der Präprozessierung der detektierten Signalintensitäten werden die Expressionslevel der Gene aus den beiden betrachteten Versuchsproben einander gegenübergestellt, um die Gene zu identifizieren, die eine differentielle Expression aufweisen.

Insgesamt unterliegen 50 Gene einer differentiellen Expression, von denen 20 eine verminderte Expression und 30 eine verstärkte Expression gegenüber den nativen Zellen aufweisen (Tabelle 7.6; S.204). Von diesen Genen wird unter Verwendung des in DAVID zur Verfügung stehenden Analyse-Tools eine funktionelle Gen-Annotationsanalyse durchgeführt. Die Ergebnisse weisen auf eine veränderte Expression von Genen hin, deren Genprodukte in der Zellmembran lokalisiert sind (Tabelle 4.9). Eine verminderte Expression zeigen neun solcher Membranprotein-kodierenden Gene, während 11 eine verstärkte Expression aufweisen. Desweiteren zeigen 30 weitere Gene eine differentielle Expression, die jedoch sehr unterschiedlichen funktionellen Gengruppen angehören.

**Tabelle 4.9 Bedingt durch die Elektroporation überrepräsentierte funktionelle Gengruppen**

Gengruppe	Bezeichnung	Anzahl Gene	%	p-Wert
<b>verminderte Expression</b>				
GOTERM_CC_5	GO:0016021 integral to membrane	9	47.37	3.42E-02
GOTERM_CC_5	GO:0031224 intrinsic to membrane	9	47.37	4.23E-02
<b>verstärkte Expression</b>				
GOTERM_CC_5	GO:0016021 integral to membrane	10	33.33	1.77E-02
GOTERM_CC_5	GO:0031224 intrinsic to membrane	10	33.33	2.26E-02
GOTERM_CC_5	GO:0044459 plasma membrane part	6	20.00	3.65E-02

#### 4.8.2 Einfluss der vier eingebrachten Expressionskassetten

Für die Analyse des veränderten Expressionsprofils, verursacht durch das Einbringen der vier MIDGE®-DNA-Vektoren, werden jeweils  $1 \times 10^7$  native B25-MOL-Zellen mit 39 µg des MIDGE®-Mix elektroporiert und für 6 h kultiviert, dann auf lebende CD80<sup>+</sup> und CD154<sup>+</sup> Zellen sortiert und im Anschluss die RNA für die Microarray-Analysen extrahiert. Die Auswertung der erhobenen Daten erfolgt mit Hilfe des Bioconductors (Präprozessierung, Filterung und Identifizierung der differentiell exprimierten Gene). Um nur die Gene zu identifizieren, welche bedingt durch das Einbringen der vier Expressionskassetten eine differentielle Expression zeigen, werden die detektierten Signalintensitäten der Gene dieser Zellen denen

gegenübergestellt, bei denen die analysierten Zellen ohne Zugabe der MIDGE®-DNA-Vektoren elektroporiert worden sind.

In Abbildung 4.30 (S. 118) wird deutlich, dass bedingt durch das Einbringen der vier Expressionskassetten und die daraus resultierenden sekundären Veränderungen der Zellen zur größten Anzahl an Genen führt, die einer Regulation unterliegen. Von den insgesamt 98 betroffenen Genen weisen 20 eine verminderte Expression und 78 eine gesteigerte Expression auf. Die funktionelle Gen-Annotationsanalyse der 20 vermindert exprimierten Gene führt zu einer überrepräsentierten funktionellen Gengruppe, GO: 0044446 „*intracellular organelle part*“, in der sieben Gene eine differentielle Expression aufweisen. In dieser Gen-Ontologie werden die Gene zu einer Gruppe zusammengefasst, deren Genprodukte Teil einer organisierten Struktur eines Zellorganells oder charakteristisch für deren Morphologie oder Funktion sind. Dagegen führen die 78 verstärkt exprimierten Gene in der Gen-Annotationsanalyse zu 55 überrepräsentierten funktionellen Gengruppen. Einige können zu Kategorien zusammengefasst werden, die den für uns relevanten biologischen Zusammenhängen (vgl. 4.5.2.1 Funktionelle Gen-Annotationsanalyse verstärkt exprimierter Gene; S.80) zugeordnet werden können.

Eine Apoptose-assoziierte Kategorie kann aus sechs der überrepräsentierten funktionellen Gengruppen zusammengefasst werden (Tabelle 4.10). Innerhalb dieser Kategorie weisen 16 Gene eine differentielle Expression auf.

**Tabelle 4.10 Einfluss der eingebrachten MIDGE®-Vektoren auf Apoptose-assoziierte funktionelle Gengruppen**

Gengruppe	Bezeichnung	Anzahl Gene	%	p-Wert
GOTERM_BP_5	GO:0042981 regulation of apoptosis	16	20.51	3.98E-06
GOTERM_BP_5	GO:0043067 regulation of programmed cell death	16	20.51	4.50E-06
GOTERM_BP_5	GO:0043066 negative regulation of apoptosis	8	10.26	1.46E-03
GOTERM_BP_5	GO:0043069 negative regulation of programmed cell death	8	10.26	1.58E-03
GOTERM_BP_5	GO:0060548 negative regulation of cell death	8	10.26	1.60E-03
GOTERM_BP_5	GO:0006916 anti-apoptosis	6	7.69	3.03E-03

Weitere fünf überrepräsentierte funktionelle Gengruppen können unter einer Zytokin-assoziierten Kategorie zusammengefasst werden (Tabelle 4.11). Innerhalb dieser Kategorie weisen 18 Gene eine signifikant erhöhte Expression gegenüber den Referenzzellen auf.

Tabelle 4.11 Einfluss der eingebrachten MIDGE®-Vektoren auf Zytokin-assoziierte funktionelle Gengruppen

Gengruppe	Bezeichnung	Anzahl Gene	%	p-Wert
GOTERM_BP_5	GO:0006935 chemotaxis	8	10.26	1.07E-05
GOTERM_MF_5	GO:0008009 chemokine activity	7	8.97	4.29E-08
GOTERM_MF_5	GO:0042379 chemokine receptor binding	7	8.97	6.34E-08
KEGG_PATHWAY	hsa04060: Cytokine-cytokine receptor interaction	16	20.51	2.48E-11
KEGG_PATHWAY	hsa04062: Chemokine signaling pathway	9	11.54	2.30E-05

Letztlich werden drei funktionelle Gengruppen zu einer weiteren Kategorie zusammengefasst, die mit der Aktivierung, Differenzierung und Proliferation von Leukozyten assoziiert sind (Tabelle 4.12); insgesamt 10 assoziierte Gene zeigen hier eine verstärkte Expression.

Tabelle 4.12 Einfluss der eingebrachten MIDGE®-DNA-Vektoren auf funktionelle Gengruppen die mit der Differenzierung und Aktivierung von Leukozyten assoziiert sind

Gengruppe	Bezeichnung	Anzahl Gene	%	p-Wert
GOTERM_BP_5	GO:0045637 regulation of myeloid cell differentiation	5	6.41	3.47E-04
GOTERM_BP_5	GO:0051249 regulation of lymphocyte activation	5	6.41	5.50E-03
GOTERM_BP_5	GO:0002694 regulation of leukocyte activation	5	6.41	8.20E-03

Eine Auflistung aller überrepräsentierten Gengruppen und Pathways, die sich aus den verstärkt exprimierten Genen ergeben, die bedingt durch das Einbringen der vier Expressionskassetten eine gesteigerte Expression zeigen, sind im Anhang in

Tabelle 7.7 (S. 205) aufgelistet.

### 4.8.3 Einfluss der Bestrahlung

Ein Teil der vierfach transfizierten Zellen wird nach der sechsstündigen Kultivierung zur Bestrahlung gegeben, während die restlichen für den gleichen Zeitraum bei 4 - 8°C im Kühlschrank gelagert werden. Nach der Bestrahlung mit 100 Gy werden die Zellen zunächst für weitere 3 h in Normalmedium bei 37°C inkubiert bevor sie, wie unter „4.2 Generierung der RNA-Proben“ (S.69) beschrieben, auf lebende, CD80 und CD154 exprimierende Zellen sortiert und ihre RNA extrahiert wird. Nach der Präprozessierung aller detektierten Signalintensitäten aus den Microarrays werden die Expressionslevel der Gene der vierfach transfizierten Zellen denen der vierfach transfizierten und bestrahlten Zellen gegenübergestellt. Mit Hilfe der

TopTable Funktion in OnechannelGUI werden die Gene identifiziert, die bedingt durch die Bestrahlung eine differentielle Expression aufweisen. Wie bereits erwähnt, können sechs annotierte Gene mit einer verstärkten Expression in den bestrahlten Zellen identifiziert werden (Tabelle 4.13). Signifikant vermindert exprimierte Gene können nicht identifiziert werden.

**Tabelle 4.13 Bedingt durch die Bestrahlung differentiell exprimierte Gene**

Sonden-Set ID	Gensymbol	FC	p-Wert	B (diff. Expression)
8177130	SLC9B1	3.07	1.96E-02	0.7694
8112196	RNY	3.10	1.38E-02	0.8727
7981333	RN7SL1	3.26	6.35E-03	0.9921
7896724	PLEK	3.60	3.47E-02	0.4614
8109649	MIR146A	3.75	6.35E-03	0.9966
8015031	CCR7	3.79	2.89E-04	0.9998

Eine funktionelle Gen-Annotationsanalyse wird auf Grund der geringen Anzahl regulierter Gene an dieser Stelle nicht durchgeführt. Neben zwei zytoplasmatischen RNAs (RNY und RN7SL1), für die eine funktionelle Annotation bisher jedoch nicht beschrieben ist, zeigt auch die **miRNA146A** eine verstärkte Expression. Die detektierte Signalintensität dieser miRNA liegt in allen anderen analysierten Versuchsproben unterhalb der Nachweisgrenze, ausschließlich in den vierfach transfizierten und bestrahlten Zellen ist eine Signalstärke von  $S_{\text{int}} = 232,6$  (SD= 15,89) detektierbar.

Weiterhin zeigt der Chemokin-Rezeptor **CCR7** eine signifikant verstärkte Expression in den bestrahlten Zellen. Die Signalstärke dieses Gens steigt von  $S_{\text{int}} = 248,7$  (SD= 1,52) in den vierfach transfizierten Zellen, auf  $S_{\text{int}} = 943,2$  (SD= 44,16) in den vierfach transfizierten, bestrahlten Zellen an was einer Steigerung der Expression um das 3,8fache entspricht.

#### 4.8.4 Einfluss des Einfrier- und Auftauprozesses

Von den vierfach transfizierten und bestrahlten Zellen wird wiederum ein Teil abgenommen und entsprechend des Herstellungsprozesses eingefroren. Dazu werden die Zellen zunächst abzentrifugiert (3 min, 1.200 rpm), anschließend in Einfriermedium aufgenommen und bei -80°C in Kryoröhrchen tiefgefroren. Nach 24 h werden die Kryoröhrchen in flüssigen Stickstoff überführt. Weitere zwei Tage später werden die Zellen wieder aufgetaut. Dazu werden die Kryoröhrchen dem Stickstofftank entnommen und kurz im Wasserbad (37°C) angetaut. Die Zellen werden anschließend 3mal mit jeweils 5 ml PBS gewaschen (3 min, 1.200 rpm), um das Einfriermedium und das darin enthaltene DMSO möglichst vollständig zu entfernen. Im

folgenden Schritt werden die Zellen in 600 µl kaltem PBS aufgenommen und für 8 h auf Eis inkubiert. Dieser Inkubationsschritt soll den Zeitraum simulieren, in dem die Wirkstoffzellen zum Patienten transportiert werden. Im letzten Schritt werden die Zellen in 15 ml vorgewärmtem Medium aufgenommen und weitere 4 h unter Kultivierungsbedingungen (37°C, 5 % CO<sub>2</sub>, 95 % Luftfeuchtigkeit) in einer 10 cm Schale inkubiert. Anschließend werden die Zellen abzentrifugiert (3 min, 1.200 rpm) und die RNA extrahiert (vgl. 3.2.1 Gesamt-RNA-Extraktion; S.47). Nach Durchführung der Microarrays und der Präprozessierung der detektierten Signalintensitäten werden die ermittelten Expressionsdaten dieser vierfach transfizierten, bestrahlten, eingefrorenen und wieder aufgetauten Zellen, die den Wirkstoffzellen entsprechen, mit denen der vierfach transfizierten und bestrahlten Zellen unter Verwendung der Bioconductor Software einander gegenübergestellt, um so die differentiell exprimierten Gene zu identifizieren.

Die Gegenüberstellung der Expressionslevel ergibt für nur drei Sonden-Set-spezifische RNA eine differentielle Expression, von denen zwei eine verstärkte Expression und die andere eine verminderte Expression zeigen. Das vermindert exprimierte RNA-Transkript kann keiner bekannten Gen-Annotation zugeordnet werden, weshalb dieses von einer weiteren Betrachtung ausgeschlossen wird. Bei den beiden verstärkt exprimierten Genen handelt es sich einerseits um das **HSPA6**, ein Hitzeschockprotein, welches bereits in den vierfach transfizierten und bestrahlten Zellen eine konstitutive mRNA-Expression aufweist ( $S_{\text{Int}} = 476,9$ ;  $SD = 3,04$ ) und nach dem Einfrier- und Auftauprozess eine noch höhere Expressionsstärke zeigt ( $S_{\text{Int}} = 1623,3$ ;  $SD = 78,09$ ), was einer Expressionssteigerung um das 3,4fache entspricht. Bei dem zweiten verstärkt exprimierten Gen handelt es sich um eine kleine nukleare RNA, **RNU2**. In den vierfach transfizierten und bestrahlten Zellen liegt das Expressionsniveau dieser RNA unterhalb des Schwellenwertes für nachweisbare mRNA-Expression ( $S_{\text{Int}} < 100$ ), während in den Wirkstoffzellen die Signalintensität mit  $S_{\text{Int}} = 102,5$  ( $SD = 1,63$ ) knapp über diesem Schwellenwert liegt. Allerdings sind dieser nuklearen RNA, RNU2, weitere 12 Sonden-Sets zugeordnet, die eine bedeutend höhere Expressionsstärke ( $S_{\text{Int}} = 488,1$  bis  $11.850,1$ ) in den untersuchten Versuchsproben zeigen. Eine differentielle Expression bei der Gegenüberstellung der transfizierten und bestrahlten Zellen und der transfizierten, bestrahlten, eingefrorenen und wieder aufgetauten Zellen zeigen diese Sonden-Sets jedoch nicht.

## 5 Diskussion

Gegenstand der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Analysen sind die Zellen des zellbasierten Krebstherapeutikums MGN1601, bestehend aus allogenen, proliferationsdefizienten Nierenkarzinomzellen transfiziert mit vier MIDGE®-DNA-Vektoren und gemischt mit einem DNA-basierten Immunmodulator (dSLIM®). Dieser Wirkstoff soll das körpereigene Immunsystem der Patienten stimulieren und aktivieren, um eine effektive Anti-Tumorantwort zu induzieren. Mit Hilfe der Microarray-Technologie soll das Genexpressionsprofil dieser Zellen analysiert werden. Unter Verwendung verschiedener Analysemethoden sollen herstellungsbedingte Veränderungen sowie die mögliche Kontribution jedes eingebrachten DNA-Vektors auf die genomweite Genexpression der Zellen identifiziert werden. Diese Daten sollen die Grundlage für eine weitere Optimierung und Fortentwicklung der Tumorstoffzelle bilden. Dazu werden die genomweiten Expressionsprofile von Zellen aus den verschiedenen Stadien des Herstellungsprozesses miteinander verglichen, um so die Gene zu identifizieren, welche bedingt durch den jeweiligen Herstellungsschritt eine differentielle Expression zeigen.

In den folgenden Kapiteln werden das experimentelle Design (5.1) sowie die Vor- und Nachteile der verwendeten Methoden und, soweit möglich, die Vergleichbarkeit der mit verschiedenen Methoden erhaltenen Genexpressionsergebnisse zwischen den verwendeten Nachweismethoden (5.2) diskutiert. Abschließend werden die inhaltlichen Resultate der durchgeführten Experimente bezüglich ihrer biologischen Relevanz diskutiert (5.3 und 5.4).

### 5.1 Experimentelles Design

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es zu bestimmen, wie sich die einzelnen Schritte des Herstellungsprozesses auf das Expressionsmuster der Zellen auswirken und welche sekundären Effekte durch die Expression der vier eingebrachten DNA-Vektoren hervorgerufen werden. Entsprechend werden Genexpressionsprofile von Zellen aus verschiedenen Stadien des Herstellungsprozesses erstellt und einander gegenübergestellt, um so differenziell exprimierte Gene identifizieren zu können. Eine essentielle Rolle kommt dem Expressionsprofil der Wirkstoffzellen zu, da sich hier alle herstellungsbedingten Effekte niederschlagen und deren Expressionsprofil unmittelbar Folgen für die Wirksamkeit im Patienten haben kann.

Als Wirkstoffzellen der Tumorstoffzelle werden die durch vierfach Transfektion, Bestrahlung und Tiefrierprozess modifizierten B25-MOL-Zellen betrachtet. Tatsächlich besteht die

Zellpopulation der Wirkstoffzellen jedoch aus einem heterogenen Zellgemisch, da nur etwa 20 % (bezogen auf CD80<sup>+</sup>/CD154<sup>+</sup> lebende Zellen) B25-MOL-Zellen erfolgreich mit allen vier Vektoren transfiziert werden. Um möglichst aussagekräftige und vergleichbare Expressionsdaten zu erhalten, werden die zu analysierenden transfizierten Zellen auf die Expression der Oberflächenantigene CD80 und CD154 selektiert, deren Überexpression durch die Transfektion der entsprechenden MIDGE<sup>®</sup>-DNA-Vektoren erreicht wird. So ist sichergestellt, dass der größte Anteil der analysierten Zellpopulation mindestens zwei der eingebrachten MIDGE<sup>®</sup>-DNA-Vektoren exprimiert. Auf eine Selektion der Zytokin-sezernierenden Wirkstoffzellen (IL-7 und GM-CSF) wurde hier verzichtet, da für die Zytokine die sezernierte Menge und damit die Konzentration in der Umgebung entscheidend ist, unabhängig von der Anzahl der erfolgreich transfizierten Zellen. Außerdem würde eine weitere Anreicherung der Zellen auf vierfach transfizierte Zellen zusätzlichen Stress für die Zellen bedeuten sowie einen nicht unerheblichen Zeit- und Kostenfaktor darstellen. Als Vergleichsdaten für die Analyse der Wirkstoffzellen dienen die nativen B25-MOL-Zellen, während für die Identifizierung der herstellungsbedingten Expressionsänderungen der einzelnen Schritte des Herstellungsprozesses die Zellen des jeweils vorausgegangenen Herstellungsschrittes als Referenz dienen.

Auf Grund der großen Anzahl differentiell exprimierter Gene wurden einige biologische Zusammenhänge ausgewählt, deren Veränderungen in der Expression hier näher betrachtet werden. Sie wurden ausgewählt, da Veränderungen der Genexpression innerhalb dieser biologischen Zusammenhänge einen Einfluss auf das Wirkprinzip der Wirkstoffzellen haben könnten. Dazu zählen die Apoptose und die Regulation des Zellzyklus, die Expression von Zytokinen und Chemokinen, die Aktivierung, Differenzierung und Proliferation von Lymphozyten, die Interaktion mit NK-Zellen, die Antigen-Prozessierung und -Präsentation sowie die Expression Tumor-assoziiertes Antigene.

Um individuelle Unterschiede zwischen den analysierten Proben im Microarray-Experiment auszugleichen, wurden jeweils zwei biologische Replikate in die Microarray-Analysen eingeschlossen. Die Validierung der Ergebnisse ausgewählter Microarray-Daten erfolgte mittels quantitativer Taqman<sup>®</sup> PCR. Auch hier lag der Fokus der Analysen auf der Expression der Gene in den Wirkstoffzellen, die eine Assoziation mit den für uns besonders interessanten biologischen Zusammenhängen besitzen.

Der Nachweis der Proteinexpression einiger Gene mittels direkter Antikörperfärbung an der Zelloberfläche (durchflusszytometrische Analyse) sowie mittels Bead Array und ELISA für den

Nachweis sezernierter Proteine sollte klären, inwieweit sich die auf mRNA-Ebene erfassten Änderungen der Genexpression auch auf Ebene der Proteine durchsetzen.

## 5.2 Methodische Diskussion

### 5.2.1 Quantität und Qualität der verwendeten Proben

Bei der Herstellung der Wirkstoffzellen aus den nativen B25-MOL-Zellen entsteht, wie bereits erwähnt (vgl. S. 124), ein heterogenes Zellgemisch. Diese Mischpopulation sowie der Restanteil toter und apoptotischer Zellen führen dazu, dass Veränderungen des Genexpressionsmusters in den Wirkstoffzellen nicht mehr detektiert werden können, weil die Signale der Genexpression aus den anderen Zellen diese „überstrahlen“. Ausschließlich Gene, die einer sehr ausgeprägten Genregulation unterliegen, könnten noch identifiziert werden, während geringere Veränderungen im Expressionsniveau in den Wirkstoffzellen durch eine unveränderte Expression in den nicht modifizierten Zellen überdeckt werden. Um auch Gene mit einer weniger ausgeprägten differentieller Expression identifizieren zu können, werden die Zellen nach der Transfektion mittels paramagnetischer Zellsortierung auf lebende CD80 und CD154 exprimierende Zellen angereichert (vgl. 4.2 Generierung der RNA-Proben, S.69). Das verwendete MACS<sup>®</sup>-System (*magnetic activated cell sorting*) basiert auf dem Einsatz von paramagnetischen Partikeln (Microbeads) mit einer Größe von etwa 100 nm. Durch die kovalente Kopplung hochspezifischer Antikörper können hohe Ausbeuten und eine sehr gute Reinheit der selektierten Zellpopulation erreicht werden. Anschließende Analysen der selektierten Zellen werden kaum beeinflusst, da sich die Partikel auf Grund ihrer geringen Bindungskapazität leicht wieder von der Zelloberfläche lösen (Miltenyi et al., 1990). Dieses System bietet damit die Vorteile einer einfachen und schnellen Separationstechnik, ohne einen nachhaltigen Einfluss auf anschließende Analysemethoden zu nehmen.

Jede der untersuchten Proben unterliegt einer gewissen Variabilität in der Zusammensetzung der Zellpopulation, vor allem in Bezug auf die Expression der beiden eingebrachten Zytokin-Expressionskassetten. Überraschenderweise treten bei den gemessenen Signalen in den Microarray-Analysen wie auch bei den Taqman<sup>®</sup> basierten qPCR-Analysen für die analysierten mRNA-Transkripte keine größeren Schwankungen auf. Betrachtet man alle annotierten, exprimierten Gene, deren Expressionsstärke mit Hilfe der Microarray-Analyse untersucht werden stellt man fest, dass die Variation der detektierten Signale deutlich kleiner ist als die Variabilität in der Zusammensetzung der Zellpopulation vermuten lässt. So liegt der berechnete Variationskoeffizient der detektierten Signalstärken für jeweils über 90 % der



exprimierten Gene bei unter 10 %. Die untersuchten Proben zeigen demnach eine geringere Variabilität in der Zusammensetzung der Zellpopulationen als ursprünglich vermutet.

Ein Problem bei der Separation stellt die Clusterbildung der Zellen dar. Im Verlauf des Herstellungsprozesses zur Generierung einer angereicherten Wirkstoffzellpopulation ist zu beobachten, dass sich die Zellen zu Zellhaufen zusammenschließen und sich teilweise nur schwer wieder voneinander trennen lassen. Dies beeinflusst einerseits die Reinheit der selektierten Zellpopulation negativ und führt andererseits zu einem zeitlich verzögerten Versuchsablauf, da sich die Zellcluster nur sehr langsam durch die Separationssäulen bewegen, wobei es in Einzelfällen zum vollständigen Verschluss der Säulen kommen kann. Offenbar sind diese Zellcluster sehr stabil, da der Versuch, diese durch Scherkräfte aufzulösen, eher zu einem größeren Anteil an toten Zellen als zu einer höheren Ausbeute lebender CD80 und CD154 exprimierender Wirkstoffzellen führt. Außer dem Einsatz eines Präseparationsfilters (Porengröße 30  $\mu\text{m}$ ), um größere Aggregate zurückzuhalten, wurden deshalb für die Zellpräparationen keine weiteren Maßnahmen zur Auflösung der Zellcluster durchgeführt.

Nach der Zellseparation wird eine direkte Antikörperfärbung mit anschließender durchflusszytometrischen Analyse der Zellen auf die Expression von CD80 und CD154 durchgeführt, um die Effizienz der Separation zu prüfen. Gleichzeitig erfolgt eine Diskriminierung der toten Zellen. Bei einem Anteil von toten Zellen von über 40 % wird die entsprechende Probe von den Expressionsanalysen ausgeschlossen, da sich ein zu hoher Anteil an toten Zellen negativ auf die im Microarray gemessene Signalintensität der Gene auswirkt.

Die RNA-Extraktion der Proben erfolgt entweder direkt im Anschluss an die Zellseparation oder aus tiefgefrorenen selektierten Zellen. Mittels photometrischer Analyse und Gelelektrophorese wird die Quantität und Qualität der RNA-Proben bestimmt. Das ermittelte Verhältnis der Absorption bei 260 nm und 280 nm gibt Auskunft über die Reinheit der analysierten RNA-Lösung und soll in jedem Fall einen Wert von mindestens 1,80 (Ratio  $A_{260}/A_{280}$ ) und idealerweise einen Wert von 2,0 betragen. Eine Degradation der RNA kann mit Hilfe der Gelelektrophorese dokumentiert werden. Unabhängig davon, ob die RNA aus frischen Zellen oder aus tiefgefrorenen Zellen extrahiert wurde, konnten kaum qualitative Unterschiede zwischen den Proben festgestellt werden.

Deutliche Unterschiede lassen sich jedoch bei der RNA-Quantität der Proben feststellen. Ausgehend von einer großen Zellzahl, die zunächst transfiziert, später bestrahlt und tiefgefroren werden, werden nach jedem Herstellungsschritt immer genügend Zellen für eine RNA-Extraktion entnommen; bedingt durch den Herstellungsprozess (Waschschritte, Stressbedingtes Absterben der Zellen während der Elektroporation, der Bestrahlung bzw. des

Einfrier- und Auftauprozesses) verliert man über 50 % der ursprünglich eingesetzten Zellen. Dadurch nimmt die für die RNA-Extraktion zur Verfügung stehende Zellzahl im Verlauf der Herstellung immer weiter ab, so dass nach dem letzten Schritt nur noch eine geringe Zellzahl für die RNA-Extraktion zur Verfügung steht und damit auch die Menge an extrahierter RNA deutlich geringer ist. Ein Verlust der Qualität der RNA wird nicht beobachtet. Die benötigten RNA-Mengen für die Microarray-Experimente (2 µg) wie auch für die Taqman® qPCR-Analysen (1 µg) sind jedoch in jedem Fall erreicht worden.

### 5.2.2 Quantitative Taqman® PCR

Trotz der guten Reproduzierbarkeit der RNA-Extraktion aus den verschiedenen Proben ist es notwendig die Variation zu kompensieren, welche aufgrund unterschiedlicher Anteile an rRNA und mRNA in den Proben auftreten und der unterschiedlichen Effizienz der cDNA-Synthese zwischen den Proben vorliegen. Dazu werden die Daten, welche mittels Taqman® qPCR-Analyse erhoben werden, anhand der Expressionsdaten eines endogenen „Housekeeping“-Gens normalisiert. Dabei geht man von der Annahme aus, dass dieses Gen im verwendeten System stabil exprimiert wird. Solche „Housekeeping“-Gene werden ubiquitär exprimiert und sind essentiell für den Erhalt der Zellfunktionen. Häufig zur Normalisierung wird die RNA der folgenden Gene verwendet: Glycerinaldehyd-3-Phosphatase-Dehydrogenase (GAPDH), Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase (HPRT1), 18S ribosomale RNA (18S) oder  $\beta$ -Glucuronidase (GUSB). Dennoch wird in der Literatur beschrieben, dass auch diese Gene unter bestimmten Bedingungen wie Hypoxie oder Zellproliferation einer Genregulation unterliegen (Dheda et al., 2004; Schmid et al., 2003; Valente et al., 2009; Zhong et al., 1999). Daher ist es wichtig, ein Gen zu finden, welches in den hier analysierten Proben eine stabile Expression aufweist. Die Ct-Werte von GUSB weisen, gemessen über alle analysierten Proben, die geringsten Schwankungen des Ct-Wertes auf, weshalb dieses Gen für die Normalisierung der Taqman® qPCR-Daten herangezogen wird. Das GUSB-Gen kodiert eine Hydrolase, die im Lysosomen lokalisiert ist und an der Degradation von Glykosaminglykanen beteiligt ist (Shipley et al., 1993).

### 5.2.3 Affymetrix GeneChip® Human Gene 1.0 ST

Mit Hilfe der Microarray-Technologie ist es möglich, die Expression einer sehr großen Anzahl von Genen parallel zu untersuchen. Mit Hilfe der genomweiten Analyse der Genexpression von Zellen bzw. Zellzuständen ist man in der Lage Gene und biochemische Signalwege zu identifizieren, die für einen bestimmten Zellzustand verantwortlich sind.

Die hohen Kosten der erforderlichen technischen Geräte, die Microarray-Chips selbst, weitere Verbrauchsmaterialien sowie die häufig limitierte Menge an Ausgangsmaterial machen eine sorgfältige Planung erforderlich, um möglichst aussagekräftige Ergebnisse bei einem vertretbaren Kosteneinsatz zu erhalten.

Neben der Varianz der biologischen Proben, die bereits unter „5.2.1 Quantität und Qualität der verwendeten Proben“ beschrieben ist, unterliegen die Ergebnisse der Microarray-Analysen auch technisch bedingten Varianzen. So entstehen bei der Probenaufbereitung, bei der eine Vielzahl komplexe biochemischer Reaktionen ablaufen, von Labor zu Labor und auch innerhalb eines Experiments Unterschiede. Beispielsweise treten bei der Hybridisierung der Biotin-markierten cDNA-Fragmente an die immobilisierten Oligonukleotide auf dem GeneChip® eine Reihe von Varianzquellen auf. Dabei spielen vor allem die Hybridisierungstemperatur, Puffereigenschaften und die Dauer der Hybridisierung eine wichtige Rolle. Auf Grund hoher Sequenzähnlichkeit in GC-reichen Regionen kann es zu Kreuzhybridisierungen kommen, was zu verfälschten Messergebnissen führen kann. Dieses Phänomen wurde von Affymetrix durch die Selektion geeigneter Oligonukleotid-Sequenzen und die Repräsentation eines einzelnen Gens, durch im Schnitt 16 bis 20 verschiedene Sondenpaare reduziert. Weitere Varianzquellen, die während des Experimentes auftreten können, sind beispielsweise eine inhomogene Hybridisierungsleistung oder Intensitätsübergänge am Rand des Chips aufgrund sterischer Effekte. Weiterhin kann die Menge der Probe, die durch einen Roboter auf den Microarray-Chip aufgebracht wird, leicht variieren. Die Effizienz der Probenfixierung auf dem Chip und die Intensität des Hintergrundrauschens sind stark von der Beschichtung des Chips mit der Probe abhängig (Russell et al., 2009). Außerdem können Messungenauigkeiten bei der Konzentrationsbestimmung der RNA auftreten.

Das vom Laserscanner generierte Bild stellt die Rohdaten der Microarray-Experimente dar. Die Umwandlung der Bildinformation in Signalintensitätswerte erfolgt durch einen determinierten Algorithmus.

Nach der Extraktion der Signalintensitätswerte für jedes Sondenpaar müssen diese einer Präprozessierung unterzogen werden, bevor sie einer statistischen Analyse zugeführt werden können. Obwohl in diesem Bereich eine Vielzahl von wissenschaftlichen Arbeiten veröffentlicht wurden, sind diese Methoden bis zum heutigen Zeitpunkt weder routiniert noch standardisiert, sondern unterliegen weiterhin einer kontroversen Diskussion (Russell et al., 2009). Zu den fundamentalen Analyseschritten, denen ein Microarray-Experiment unterzogen werden sollte, gehören die Bildanalyse, die Hintergrundkorrektur, die Berechnung des singulären Signals für jedes Gen als relatives Maß der Expressionsstärke, die Skalierung der

Daten sowie die Normalisierung der Daten. Entsprechend erfolgt die Präprozessierung eines Affymetrix Microarray-Experiments in den folgenden vier Schritten: Die Sondenkorrektur (*probe correction*), Sondensummutation (*probe summarization*), Hintergrundkorrektur (*background correction*) sowie Normalisierung (*normalization*) der Daten (Russell et al., 2009). Für die Präprozessierung der Daten eines Affymetrix Chips stehen im OnechannelGUI Softwarepaket (implementiert im Bioconductor) verschiedene statistische Modelle zur Verfügung, mit deren Hilfe die verschiedenen Schritte der Präprozessierung durchgeführt werden können. Zu diesen statistischen Modellen zählen unter anderem MAS (Affymetrix), RMA und GCRMA (Irizarry et al., 2003b), PLIER (Guide to Probe Logarithmic Intensity Error (PLIER) Estimation, 2001) und dCHIP (Li et al., 2001). Diese werden in der Literatur ausführlich beschrieben und diskutiert; ein Konsens, welches dieser statistischen Modelle generell Anwendung finden sollte, existiert bisher allerdings nicht (Boes, 2007; Bolstad et al., 2003; Irizarry et al., 2003b). Insbesondere für Expressionsdaten, die unter Verwendung von Affymetrix Human GeneChips® generiert werden, ist allgemein anerkannt, dass die von Irizarry beschriebenen statistischen Modelle RMA und GCRMA sehr gut für die Präprozessierung geeignet sind (Russell et al., 2009).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wird das RMA-Model (*robust multi array average*) für die Präprozessierung der mittels Microarray erhobenen Expressionsdaten verwendet. Dafür werden zunächst die Hintergrund-korrigierten PM (*positive match*) Signalintensitäten jeder Sonde auf dem GeneChip berechnet. Die MM (*miss match*) Signale der Sonden werden nicht verwendet. Es wird eine globale Hintergrundkorrektur angewendet, bei der berücksichtigt wird, dass sich die Expressionsstärke eines Gens aus der individuellen Intensität des PM-Signals einer Sonde plus des normalverteilten Hintergrundsignals, welches aus nicht-spezifischen Hybridisierungen und optischen Schwankungen entsteht, zusammensetzt (Russell et al., 2009). Anschließend werden die berechneten Signalintensitäten einer  $\log_2$ -basierten Transformation unterzogen. Zur Normalisierung der Daten wird im Rahmen des RMA-Modells die von Bolstad et al. (2003) beschriebene Quantil-Normalisierung verwendet. Diese Methode beruht auf der Annahme, dass die Verteilung der detektierten Signalintensitäten über zwei oder mehr parallel durchgeführte Microarray-Experimente identisch ist. Schließlich erfolgt eine Sondensummutation der Hintergrund-korrigierten und normalisierten Signalintensitäten, so dass sich für jedes auf dem GeneChip vorhandene Sonden-Set ein Expressionswert ergibt. Diese Summation erfolgt unter der Annahme, dass sich das detektierte Signal aus der wahren Expressionsstärke des analysierten Transkriptes und einem Sonden-spezifischen Affinitätsfaktor zusammensetzt. Dieser Sonden-spezifische Affinitätsfaktor ergibt sich aus der

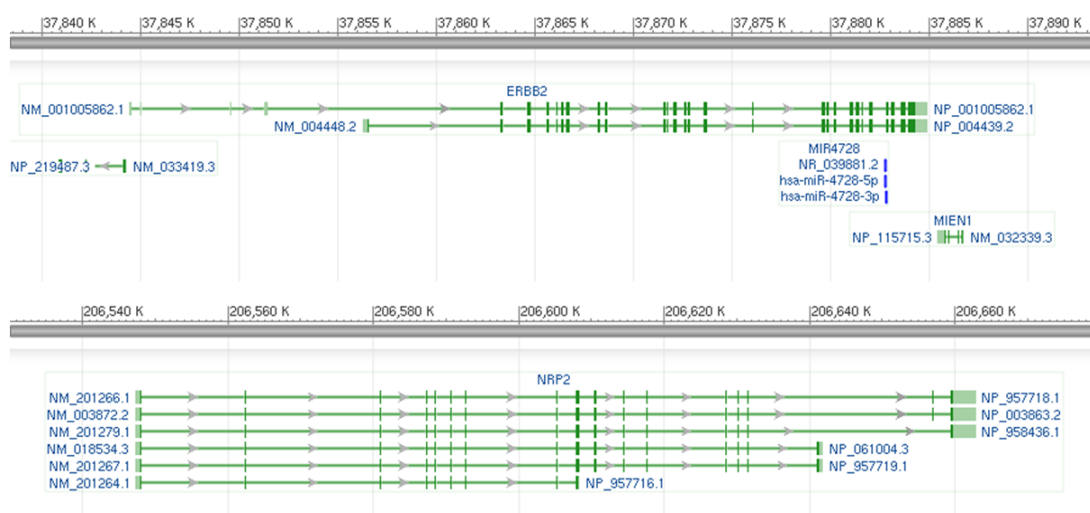
Summe von Positions-abhängigen Effekten der Nucleobasen einer Sonde und kann basierend auf der Sequenzinformation für jede Sonde berechnet werden (Li et al., 2001).

Für die Identifizierung differentiell exprimierter Gene, dem eigentlichen Ziel der hier durchgeführten Analysen, sind in der Literatur eine Reihe verschiedener Algorithmen beschrieben. Häufig werden univariante oder multivariante statistische Methoden wie der t-Test oder verschiedene Formen der Varianzanalyse (ANOVA) zur Identifizierung differenziell exprimierter Gene eingesetzt. Um die gewünschte statistische Signifikanz einer veränderten Expression zu erreichen, muss jedoch eine relativ große Anzahl an Microarray-Experimenten biologischer Replikate durchgeführt werden. So sollten für einen Vergleich von zwei Zuständen jeweils mindestens 5 biologische Replikate analysiert werden, um signifikante Unterschiede in der Genexpression identifizieren zu können (Russell et al., 2009). Da eine solch große Anzahl an Microarray-Experimenten einen nicht unerheblichen Kosten-, Zeit- und Materialaufwand bedeutet, wurde nach einer alternativen statistischen Methode gesucht, die auch bei einer geringeren Anzahl an analysierten Replikaten zuverlässige Ergebnisse liefert.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit kommt ein lineares Modell zur Anwendung, welches von Smyth (2004) beschrieben wird. Das als „limma“ (*linear model for microarray data*) bezeichnete Modell zeichnet sich dadurch aus, dass es auch bei einer geringen Anzahl von Proben bzw. Replikaten verlässliche Ergebnisse liefert (Russell et al., 2009; Smyth, 2004). Bei der Ermittlung der differentiell exprimierten Gene korreliert die Wahrscheinlichkeit falsch-positiver Ergebnisse umgekehrt zu der Höhe der relativen Expressionsänderung. Bei einer einfachen bis zweifachen relativen Änderung der Expression liegt die Wahrscheinlichkeit eines falsch-positiven Ergebnisses um ein Vielfaches höher als bei einer größeren relativen Änderung der Expression. Dabei beträgt die Rate der falsch-positiven Ergebnisse bei einem Vergleich zweier RNA-Populationen bei etwa 1 – 2 % (Mills et al., 2001). Um diese Rate der falsch-positiven Ergebnisse zu minimieren, wird in der vorliegenden Arbeit als Schwellenwert für eine tatsächlich erfolgte Modulation eine dreifache relative Expressionsänderung gewählt. Außerdem wird eine Reihe von Genen ausgewählt, deren Expression zusätzlich mit einer alternativen Nachweismethode analysiert wird (Taqman® qPCR).

## 5.2.4 Verifizierung der Microarray-Daten mittels quantitativer Taqman® PCR

Mit Hilfe verschiedener Techniken zur Analyse der mRNA-Expression können Gene identifiziert werden, deren Expressionsniveau statistisch signifikante Unterschiede zwischen unterschiedlichen Versuchsbedingungen zeigen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit werden Genexpressionsanalysen mittels Microarray-Analyse und Taqman® basierter qPCR durchgeführt. Jede der verwendeten Methoden besitzt Vor- und Nachteile, die sich auf die Aussagekraft der erhobenen Resultate auswirken können. Sowohl die Microarray-Analyse als auch die Taqman® basierte qPCR nutzen die gegenseitige Bindung revers komplementärer Nukleinsäuresequenzen. Während auf dem Human Gene Chip® 1.0 ST (Affymetrix) für ein Gen teilweise über 30 unterschiedliche sequenzspezifische Sonden vorhanden sind, die über den gesamten transkribierten Bereich des Gens verteilt sind, beschränkt man sich bei der Taqman® basierten qPCR auf zwei sequenzspezifische Primer und eine Sonde. Viele Gene weisen jedoch nicht nur ein mögliches Transkript auf; häufig existieren mehrere mögliche Transkripte, die nebeneinander oder nur unter bestimmten Bedingungen transkribiert werden. Beispielhaft seien hier ERBB2, für das bisher zwei verschiedene Transkripte beschrieben sind, und NRP2, für das bisher sechs verschiedene Transkripte identifiziert wurden, erwähnt (Abbildung 5.1). Primer und Sonden, die in einer Taqman® basierten qPCR eingesetzt werden sollen, müssen so gewählt werden, dass möglichst alle Transkripte detektiert werden. Die verschiedenen Sonden auf den GeneChips detektieren dagegen alle möglichen Transkripte eines Gens. Sollte allerdings nur ein bestimmtes Transkript abgelesen werden (z.B. NM\_004448.2 für ERBB2 oder NM\_201264.1 für NRP2), würden die in der Microarray-Analyse detektierten Signalintensitäten der verschiedenen Sonden unterschiedlich stark ausfallen. Die Sonden, die ein Transkript hybridisieren können, weisen eine hohe Signalstärke auf, während die Sonden die kein Transkript hybridisieren eine sehr viel geringere Signalstärke zeigen (unter Umständen sogar unterhalb des Schwellenwertes und damit als nicht exprimiert klassifiziert werden). Durch den Summationsprozess, der die einzelnen Signalintensitäten mehrerer Sonden zu einem Signal für das Sonden-Set eines Gens zusammenfasst, würde insgesamt eine niedrige Signalintensität resultieren, obwohl eines der möglichen Transkripte ein sehr hohes Genexpressionsniveau aufweist.



**Abbildung 5.1** Mögliche Transkripte der Gene ERBB2 (oben) und NRP2 (unten)

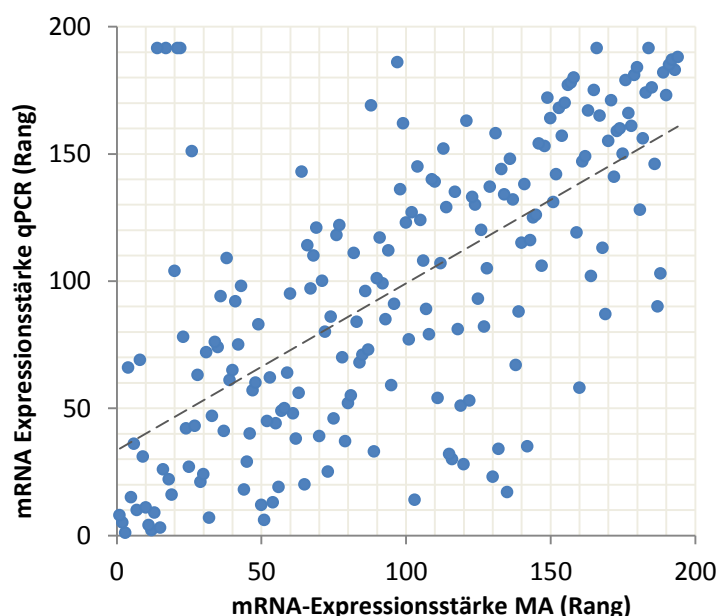
NCBI Referenzsequenzen NC\_0000017.10 (ERBB2) und NC\_000002.11 (NRP2).  
([www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/))

Die Verteilung der Sonden über den gesamten transkribierten Sequenzbereich eines Gens bringt einen weiteren Nachteil der Microarray-Analyse mit sich. So kommt es vor, dass Sequenzbereiche von Sonden hybridisiert werden, die sich an Sequenzbereiche anlagern, welche in der Regel in den Sequenzen eingebrachter Vektoren zuvor entfernt wurden (z.B. Intronsequenzen). Möchte man nun die Expressionsstärke von eingebrachten Vektoren bestimmen, kann es dazu kommen, dass die detektierte Expressionsstärke der betreffenden Expressionskassette deutlich geringer ausfällt als sie tatsächlich ist, da ein Teil der Sonden nur ein sehr schwaches Signal wiedergeben. Ursache dafür ist das Fehlen passender Sequenzabschnitte auf einzelnen Transkripten bzw. das eventuelle Fehlen einzelner vollständiger Transkripte. Dies schlägt sich in der Signalintensität der jeweils komplementären Sonde nieder und wirkt sich durch den Summationsprozess auf die Signalintensität des gesamten Sonden-Sets aus (vgl. 5.2.5.1 Diskrepanzen der ermittelten Expressionsniveaus der vier eingebrachten Expressionskassetten).

Die Analyse der Genexpression mittels Microarray-Analyse ermöglicht die Untersuchung des Expressionsprofils des gesamten Genoms in relativ kurzer Zeit. Entsprechend hoch ist der mögliche Probendurchsatz unter Verwendung dieser Methode. Im Vergleich zur Taqman® basierten qPCR zeigt die Microarray-Analyse eine geringere Genauigkeit in Bezug auf die ermittelte Expressionsstärke eines Gens. Jedoch wäre eine Analyse des gesamten Genoms mittel Taqman® basierter qPCR mit einem enorm großen und kostenintensiven Aufwand verbunden. Dafür ist der dynamische Messbereich der Taqman® basierten qPCR deutlich größer, was dieser Methode gegenüber der Microarray-Analyse einen umfangreicheren Detektionsbereich verleiht. Die Ursache dafür liegt in der begrenzten Anzahl der Moleküle einer sequenzspezifischen Sonde, die auf den Microarray-Chip immobilisiert sind. Bei einem

sehr hohen Expressionsniveau kommt es zu einer Sättigung des detektierbaren Signals, wodurch die berechneten Expressionsunterschiede kleiner ausfallen, als sie tatsächlich sind (Wang et al., 2006). Die statistische Aussagekraft beider Analysemethoden wird zusätzlich durch die Anzahl der Beobachtungen unter identischen Versuchsbedingungen beeinflusst, da geringe Änderungen des Expressionsniveaus bei einer niedrigen Anzahl durchgeführter Experimente nicht als signifikant veränderte Expression identifiziert werden. In der Regel werden beide Methoden, wie auch im Rahmen der vorliegenden Arbeit, aufeinanderfolgend für die Erstellung eines Expressionsprofils eingesetzt. Dabei dient die Microarray-Analyse der Identifizierung der differentiell exprimierten Gene, während die Taqman® basierte qPCR die Ergebnisse validiert und genauer quantifiziert (Wang et al., 2006).

Inwieweit ein Zusammenhang zwischen den mRNA-Expressionsdaten besteht, die sich aus den Ergebnissen der Taqman® basierten qPCR und den Microarray Analysen ergeben, wird anhand einer Rangkorrelationsanalyse nach Spearman ermittelt. Dabei werden die ermittelten mRNA-Expressionsstärken der Gene aus den nativen B25-MOL-Zellen und aus den Wirkstoffzellen (n= 194) in die Analyse eingeschlossen, welche mit Hilfe beider Analysemethoden detektiert wurden. Dabei kann eine signifikante positive Korrelation ( $\rho = 0,656$ ;  $p = 2 \times 10^{-16}$ ; Abbildung 5.2) festgestellt werden. Es darf an dieser Stelle nicht außer Acht gelassen werden, dass die ermittelten Ergebnisse der mRNA-Expressionsanalysen aus verschiedenen biologischen Replikaten stammen und damit nur bedingt vergleichbar sind.

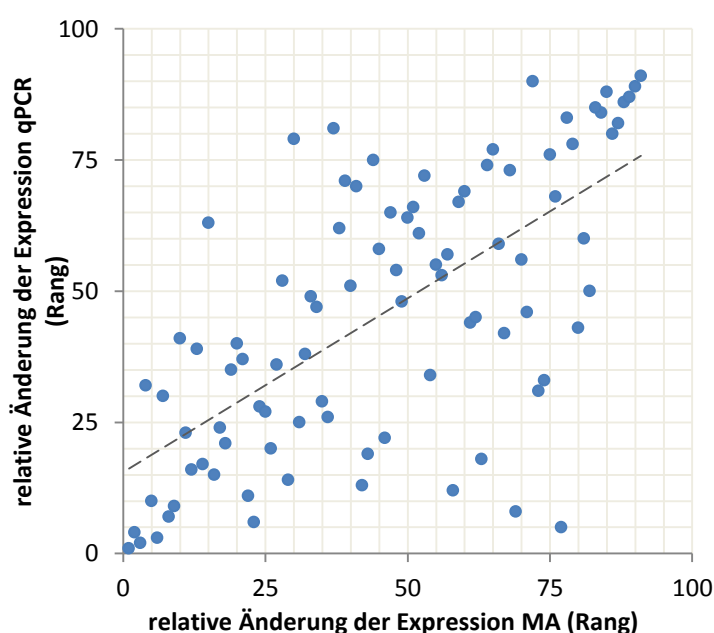


**Abbildung 5.2 Korrelation der detektierten mRNA Expressionsstärken**

Die mRNA-Expressionsstärke von 194 Genen in nativen B25-MOL-Zellen und Wirkstoffzellen, ermittelt unter Anwendung der Taqman® basierten qPCR (qPCR) und Microarray-Analysen (MA) ( $\rho = 0,656$ ;  $P = 2 \times 10^{-16}$ ).



Um zu beurteilen, ob auch ein Zusammenhang zwischen den ermittelten Änderungen der mRNA-Expression besteht, die sich aus den Ergebnissen beider Analysemethoden ableiten lassen, wird der Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman berechnet. Dabei werden die Ergebnisse aus den nativen B25-MOL-Zellen und den Wirkstoffzellen aller Gene in die Berechnung eingeschlossen, für die ein FC-Wert mit Hilfe beider Analysemethoden ermittelt wurde ( $n=91$ ). Auch hier ergibt sich eine positive signifikante Korrelation ( $\rho=0,662$ ;  $p=2,2 \times 10^{-16}$ , Abbildung 5.3) zwischen den ermittelten Änderungen. Daraus lässt sich schließen, dass eine mittels Microarray-Analyse ermittelte Änderung der mRNA-Expression mit relativ hoher Wahrscheinlichkeit durch die Ergebnisse einer Taqman® basierter qPCR bestätigt wird.



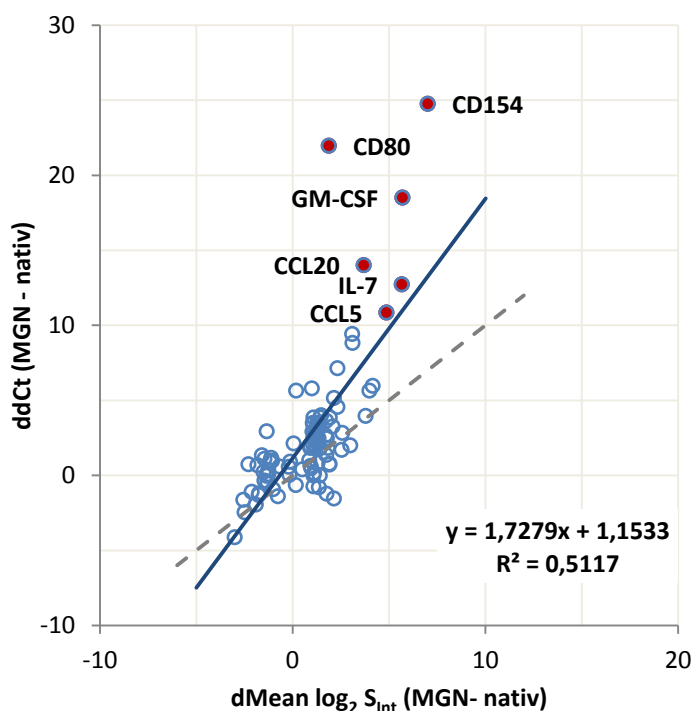
**Abbildung 5.3** Korrelation der relativen Änderung der Expression

Relative Änderungen der mRNA-Expressionsstärke von 91 Genen Wirkstoffzellen gegenüber nativen B25-MOL-Zellen, ermittelt unter Anwendung der Taqman® basierten qPCR (qPCR) und Microarray Analysen (MA) ( $\rho=0,662$ ;  $P=2,2 \times 10^{-16}$ ).

Die Ergebnisse der Korrelationsanalysen nach Spearman zeigen, dass für einen großen Teil der hier analysierten Gene die Stärke der mRNA-Expression sowie Expressionsänderung bzw. stabile Expressionsstärke weitgehend bestätigt werden kann.

Ein Vergleich der tatsächlichen FC-Werte, die sich aus den Ergebnissen beider Analysemethoden ableiten lassen zeigt, dass diese unter Umständen weit auseinander liegen. So kann die tatsächliche Änderung der mRNA-Expression einiger Gene anhand der Berechnungen aus den Daten der Microarray-Analysen unterschätzt werden, während sich aus den Ergebnissen der Taqman® qPCR-Analysen Expressionsänderungen ergeben, die um ein Vielfaches höher sind. Dies trifft insbesondere auf die Expression der vier eingebrachten

Expressionskassetten zu. So liegen die relativen Expressionsänderungen für CD80 ( $FC_{MA} = 3,86$ ;  $FC_{Taq} = 4,29 \times 10^6$  ( $SD = 1,76 \times 10^6$ ), Abbildung 5.4) und CD154 ( $FC_{MA} = 129,63$ ;  $FC_{Taq} = 28,67 \times 10^6$  ( $SD = 3,7 \times 10^6$ ), Abbildung 5.4) liegen am weitesten auseinander.



**Abbildung 5.4** Ermittelte relative Expressionsänderungen von 94 Genen, ermittelt unter Anwendung von Taqman qPCR bzw. Microarray-Analyse

Gene, deren Position im Diagramm nahe der grau gestrichelten Linie lokalisiert ist, weisen in Taqman® qPCR und Microarray-Analysen gleichwertige FC-Werte auf. Je größer der Abstand eines Gens zu diesem Ideal, umso größer ist die Diskrepanz zwischen den beiden FC-Werten. Die rot gefüllten Punkte zeigen die Position der im Text erwähnten Gene.

Aber auch Gene, die bedingt durch den Herstellungsprozess reguliert werden, weisen teilweise hohe Differenzen zwischen den relativen Expressionsänderungen auf. So ergibt sich aus den Daten der Microarray-Analysen für CCL5 eine relative Steigerung der Expression um das 29,3fache, während der Vergleich der Expressionsdaten, die sich aus den Ergebnissen der Taqman® qPCR-Analysen eine 1.886,1fache Steigerung ( $SD = 543,84$ ) der CCL5 mRNA-Expression ergeben; damit liegt die ermittelte Zunahme der CCL5-Expression etwa 64 mal höher als die Expressionsänderung, die sich aus den Daten der Microarray-Analysen ergeben. Das gleiche Phänomen beobachtet man für CCL20. Während anhand der Microarray-Analysen eine Steigerung der Expression um das 13,0fache ermittelt wird, zeigt ein Vergleich der Expressionsdaten, die in den Taqman® qPCR-Analysen detektiert werden, eine Expressionssteigerung um das 16.990,4fache ( $SD = 5598,91$ ).

Die beobachteten Unterschiede der relativen Expressionsänderung (*fold change, FC*) werden auf die unterschiedliche Sensitivität einer PCR-basierten Methode gegenüber einer auf Hybridisierung basierten Methode, sowie den technischen Grenzen der Microarray-

Technologie zurückgeführt; wie den limitierten dynamischen Bereich, die Signalsättigung oder die Kreuzhybridisierung. Außerdem kann diese Komprimierung durch Prozessierungs- und Normalisierungsalgorithmen verursacht werden, die eigentlich die vorhandenen Varianzen minimieren sollen (Provenzano et al., 2007; Qin et al., 2006; Wang et al., 2006; Yuen et al., 2002).

### 5.2.5 Korrelation zwischen RNA- und Proteinexpression

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Genexpressionsanalysen auf Ebene der mRNA (Microarray-Daten) führen zu einer großen Anzahl von Genen, die einer herstellungsbedingten Veränderung ihres mRNA-Expressionsniveaus unterliegen. Jedoch geht ein verändertes Expressionsniveau auf mRNA-Ebene nicht zwangsläufig mit einer veränderten Menge des jeweils resultierenden Proteins einher. Um zu ermitteln, welcher Zusammenhang zwischen der hier ermittelten mRNA-Expression eines Gens und der entsprechenden Proteinexpression besteht, wurde eine Korrelationsanalyse nach Spearman durchgeführt. Bedenkt man die Tatsache, dass die RNA-Expressionswerte aus den Microarray-Analysen aus anderen Proben gewonnen wurden, als die Ergebnisse der Proteinexpressions-Analysen sowie die teilweise großen Standardabweichungen, die sich hinter den Proteinexpressionsdaten verbergen, schränkt dies die Vergleichbarkeit der Daten ein. Die relativ kleine Stichprobenzahl trägt zusätzlich dazu bei, dass die Ergebnisse der Korrelationsanalysen hier mit großer Vorsicht zu interpretieren sind. Da für den Tumorigenitätstest letztlich jedoch das Proteinexpressionsprofil entscheidend ist, ist es essentiell zu untersuchen, ob sich die Änderungen im Transkriptom auch auf die für die Tumorzellvakzinierung relevanten Proteine erstreckt.

Der Nachweis der spezifischen Expression auf Protein-Ebene erfolgt mit grundlegend unterschiedlichen Methoden. Während beim Nachweis mittels direkter Antikörperfärbung und anschließender durchflusszytometrischen Messung der Geomean auf die Anzahl der an der Zelloberfläche exprimierten Proteinmoleküle schließen lässt, wird mittels ELISA und Bead Array die Proteinkonzentration pro 10.000 Zellen im Zellkulturüberstand bestimmt. Aus diesem Grund werden die Gene und ihre resultierenden Proteine in zwei Gruppen eingeteilt und zwei Korrelationsanalysen durchgeführt.

Für die erste Gruppe der Gene (Tabelle 5.1), deren resultierende Proteine mittels direkter Antikörperfärbung nachgewiesen wurden, ergibt die Korrelationsanalyse nach Spearman nur einen mäßigen positiven Zusammenhang ( $\rho = 0,36$ ) zwischen der mRNA-Expression und der Proteinexpression, die statistisch nicht signifikant ist ( $p = 0,1764$ ). Zwar lassen die Daten einzeln betrachtet durchaus den Rückschluss zu, dass ein positiver Zusammenhang zwischen der

detektierbaren mRNA-Menge und der nachweisbaren Proteinmenge besteht, jedoch ist die Anzahl der analysierten Stichproben zu klein, um bei dieser mäßigen Korrelation signifikant zu sein.

**Tabelle 5.1 Signalintensitäten der benannten Gene aus Microarray Analysen und Geomean Daten aus der durchflusszytometrischen Analyse nach direkter Antikörperfärbung**

Analyte gibt die Bezeichnung des untersuchten Gens/Proteins wieder sowie ob es sich dabei um eine Probe der nativen Zellen (nativ) oder der Wirkstoffzellen (MGN1601) handelt.  $S_{\text{int MA}}$  gibt die detektierte  $\log_2$ -basierte Signalintensität aus den Microarray-Analysen wieder. Die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analysen werden durch den Geomean dargestellt.

Analyte	$S_{\text{int MA}}$	Geomean
CD154 nativ	6,38	0,12
CD154 MGN1601	13,40	13,89
CD80 nativ	7,64	0,00
CD80 MGN1601	9,52	16,43
CD54 (ICAM1) nativ	9,64	18,74
CD54 (ICAM1) MGN1601	12,63	17,03
CD40 nativ	8,84	10,24
CD40 MGN1601	11,17	2,46
CD275 (ICOSLG) nativ	8,00	0,09
CD275 (ICOSLG) MGN1601	9,72	0,45
CD95 (FAS) nativ	9,03	17,74
CD95 (FAS) MGN1601	10,78	16,03
cMet nativ	12,75	4,30
cMet MGN1601	12,00	3,70
EGFR nativ	11,21	19,98
EGFR MGN1601	11,08	10,08

Im Gegensatz dazu ergibt die Korrelationsanalyse nach Spearman für die zweite Gruppe der Gene, deren resultierende Proteine mittels ELISA bzw. Bead Array nachgewiesen wurden (Tabelle 5.2), einen hohen positiven Zusammenhang ( $\rho = 0,79$ ), der statistisch signifikant ist ( $p = 2,0 \times 10^{-4}$ ). Demnach besteht in dieser Gruppe ein positiver Zusammenhang zwischen der mRNA-Expression und der entsprechenden Proteinexpression.

**Tabelle 5.2 Signalintensitäten benannter Gene aus Microarray Analyse und ermittelte Proteinmengen im Zellkulturüberstand 24 h nach EPO (Bead Array und ELISA)**

Analyte gibt die Bezeichnung des untersuchten Gens/Proteins wieder sowie ob es sich dabei um eine Probe der nativen Zellen (nativ) oder der Wirkstoffzellen (MGN1601) handelt.  $S_{\text{int}}$  MA gibt die detektierte  $\log_2$ -basierte Signalintensität aus den Microarray-Analysen wieder. Die Ergebnisse der Bead Array und ELISA sind durch die Proteinmenge in pg/ 10.000 Zellen dargestellt (n. d.= nicht detektierbar, da unterhalb der Nachweisgrenze)

Analyte	$S_{\text{int}}$ MA	Proteinmenge (pg/ 10.000 Zellen)
CCL2 nativ	10,86	12290,60
CCL2 MGN1601	12,63	13934,80
CCL20 nativ	6,31	16,72
CCL20 MGN1601	10,01	139,70
CCL5 nativ	6,67	n. d.
CCL5 MGN1601	11,54	442,10
CXCL10 nativ	5,11	13,05
CXCL10 MGN1601	8,22	114,62
IL6 nativ	7,75	855,00
IL6 MGN1601	11,92	1701,50
IL8 nativ	9,01	7948,34
IL8 MGN1601	12,10	6425,50
IL-7 nativ	7,38	n. d.
IL-7 MGN1601	13,05	1562,00
CSF2 nativ	7,46	n. d.
CSF2 MGN1601	13,17	10758,12

An dieser Stelle bleibt unklar, warum sich in Abhängigkeit der Nachweismethode der Proteine einerseits nur eine mäßige, andererseits eine hohe positive Korrelation zwischen mRNA und Proteindaten ergibt. Grundlegende Unterschiede zwischen Membranproteinen und sezernierten Proteinen könnten jedoch ursächlich für diese Beobachtung sein. So haben Membranproteine einen anderen Translationsort, werden anders prozessiert, benötigen einen Transport zur Zellmembran und müssen dort richtig eingebaut werden. Außerdem unterliegt die Expression von Membranproteinen einer stärkeren Kontrolle, da nur eine limitierte Anzahl von Proteinen in der Membran vorhanden sein kann. Eine zu hohe Anzahl in die Zellmembran eingebauter Proteine würde die Integrität der Zellmembran und damit das Überleben der Zelle gefährden. Zu sezernierende Proteine durchlaufen weniger Prozessierungsschritte, weshalb die Fehlerquote geringer ausfällt und der Transkript besser und schneller in einen Protein umgesetzt wird. Andererseits werden zu sezernierende Proteine häufig auch innerhalb der

Zellen eingelagert, was jedoch eher zu einer geringeren Korrelation der Proteinexpressionslevel gegenüber der mRNA-Expression führen würde, da solche Proteine bei einer Analyse des Zellkulturüberstandes nicht nachweisbar sind.

Im Allgemeinen kann eine schwache oder fehlende Korrelation unter anderem auf posttranskriptionale Regulationsmechanismen oder Faktoren zurückgeführt werden, welche die Stabilität der mRNA bzw. der Proteine beeinflussen (z.B. proteasomaler Abbau, Halbwertszeit, usw.).

#### ***5.2.5.1 Diskrepanzen der ermittelten Expressionsniveaus der vier eingebrachten Expressionskassetten***

Durch die Transfektion der vier Expressionskassetten, die für CD80, CD154, IL-7 und GM-CSF kodieren, und die Sortierung der Zellen auf die beiden Oberflächenproteine CD80 und CD154 wird eine hohe Expression dieser Gene in den Wirkstoffzellen erreicht. Diese wird durch den Nachweis der Proteinexpression in den Vorversuchen bestätigt (vgl. 4.1 Optimierung der Gentransfer-Bedingungen; S.61). Entsprechend sollten auch die detektierten Signalintensitäten der mRNA-Transkripte der Wirkstoffzellen in den Microarrays ein entsprechend hohes Niveau erreichen.

Anhand der Expressionsdaten aus den Microarray-Analysen kann diese Annahme für CD154, IL-7 und GM-CSF bestätigt werden. Während in den nativen B25-MOL-Zellen eine sehr geringe Signalintensität für diese Gene detektiert wird, zeigen die Wirkstoffzellen eine extrem hohe Signalintensität und damit ein hohes Expressionsniveau dieser Gene. Entsprechend hoch fallen auch die ermittelten Änderungen der Genexpression aus. Im Gegensatz dazu steigt die mittels Microarray-Analysen nachweisbare Menge an CD80 spezifischer mRNA nur geringfügig an. Lediglich eine Expressionssteigerung um das 3,7fache kann hier ermittelt werden (Tabelle 5.3).

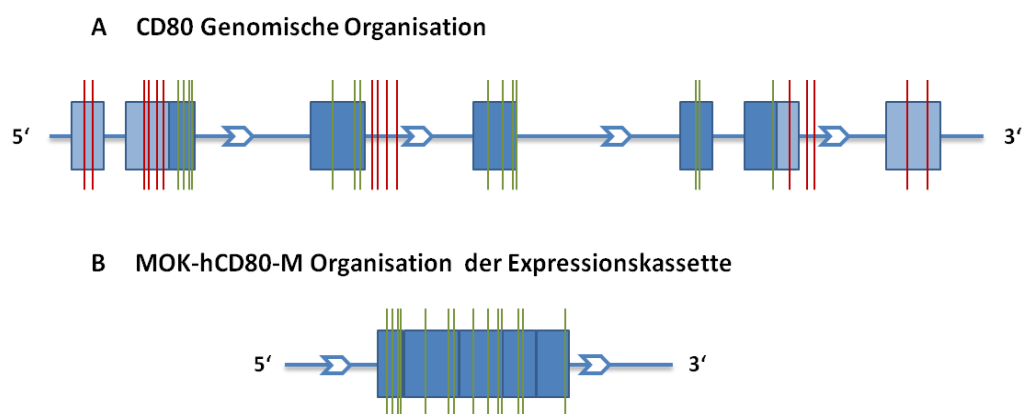
**Tabelle 5.3 Signalintensitäten (MA), Änderung der Genexpression (*fold change*) und Ct-Werte (Taqman®) sowie  $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Werte (Taqman®) der eingebrachten Expressionskassetten**

Detektierte Signalintensitäten der Gene der vier eingebrachten Expressionskassetten in den Microarray-Experimenten und den qPCR-Analysen:  $S_{\text{int}}$  (nativ)= Signalintensität des jeweiligen genspezifischen Sonden-Sets in nativen B25-MOL-Zellen;  $S_{\text{int}}$  (MGN)= Signalintensität des jeweiligen genspezifischen Sonden-Sets in Wirkstoffzellen;  $\text{FC}_{\text{MA}}$ = relative Änderung der Genexpression (*fold change*) im MA, Ct (nativ)= Ct-Wert der jeweils spezifischen Taqman®-Probe aus nativen B25-MOL-Zellen; Ct (MGN)= Ct-Wert der jeweils spezifischen Taqman®-Probe aus Wirkstoffzellen;  $\Delta\Delta\text{Ct}_{\text{Taq}}$ = relative Änderung der Genexpression im Taqman®;  $\text{FC}_{\text{Taq}}$ = relative Änderung der Genexpression im Taqman (*fold change*), basierend auf  $\Delta\Delta\text{Ct}_{\text{Taq}}$

Gen	CD80	CD154	IL-7	GM-CSF
$S_{\text{int}}$ (nativ)	199,47 ( $\log_2= 7,64$ )	83,29 ( $\log_2= 6,38$ )	166,00 ( $\log_2= 7,38$ )	176,07 ( $\log_2= 7,46$ )
$S_{\text{int}}$ (MGN)	724,08 ( $\log_2= 9,50$ )	10.772,01 ( $\log_2= 13,40$ )	8.480,89 ( $\log_2= 13,05$ )	9.184,59 ( $\log_2= 13,17$ )
<b><math>\text{FC}_{\text{MA}}</math></b>	<b>3,68</b>	<b>129,63</b>	<b>51,05</b>	<b>52,20</b>
Ct (nativ)	37,13	38,95	29,13	32,99
Ct (MGN)	16,38	15,40	17,63	15,71
<b><math>\Delta\Delta\text{Ct}_{\text{Taq}}</math></b>	<b>21,79</b> ( $\text{FC}_{\text{Taq}}= 4.294.939,72$ )	<b>24,77</b> ( $\text{FC}_{\text{Taq}}= 28.671.843,79$ )	<b>12,73</b> ( $\text{FC}_{\text{Taq}}= 6.900,31$ )	<b>18,50</b> ( $\text{FC}_{\text{Taq}}= 370.724,62$ )

Die Ergebnisse der Taqman® qPCR-Analyse aller vier eingebrachten Expressionskassetten entsprechen dagegen den Erwartungen, alle Gene zeigen gegenüber den nativen B25-MOL-Zellen eine massive Überexpression in den Wirkstoffzellen (Tabelle 5.3). Zwischen den Ergebnissen beider Analysemethoden treten vor allem bei der Betrachtung der CD80-spezifischen Ergebnisse deutliche Unterschiede auf.

Die Expression von CD80, CD154 und der beiden Zytokine IL-7 und GM-CSF in den Wirkstoffzellen beruht jedoch in erster Linie nicht auf dem „natürlichen“ mRNA-Transkript des im Genom kodierten Gens, sondern auf den cDNA-kodierten Expressionskassetten der eingebrachten MIDGE®-DNA-Vektoren. Die Signalintensität eines Gens auf den Human Gene Chip® 1.0 ST beruht auf der Summation von Signalintensitäten mehrerer Sonden (vgl. 5.2.3 Affymetrix GeneChip® Human Gene 1.0 ST; S.128). Die Ermittlung der Hybridisierungssequenzen der 30 Sonden (PM-Sonden) für CD80 auf dem Human Gene Chip® 1.0 ST zeigt, dass mehr als die Hälfte dieser Sonden spezifisch Intronsequenzen bzw. nicht translatierte Bereiche des CD80-mRNA-Transkripts (UTR) hybridisieren (Abbildung 5.5 A, rote Sonden-markierung). Da diese in dem CD80-kodierendem MIDGE®-DNA-Vektor nicht vorhanden sind, besitzt auch das entsprechende mRNA-Transkript diese Sequenzen nicht (Abbildung 5.5 B). Das Fehlen komplementärer Transkripte führt an der Position des Chips, an dem diese CD80-spezifischen Sonden lokalisiert sind, zu einem entsprechend sehr schwachen Signal.



**Abbildung 5.5 Organisation des CD80-Gens im humanen Genom und der CD80-kodierenden Expressionskassette im MOK-hCD80-M**

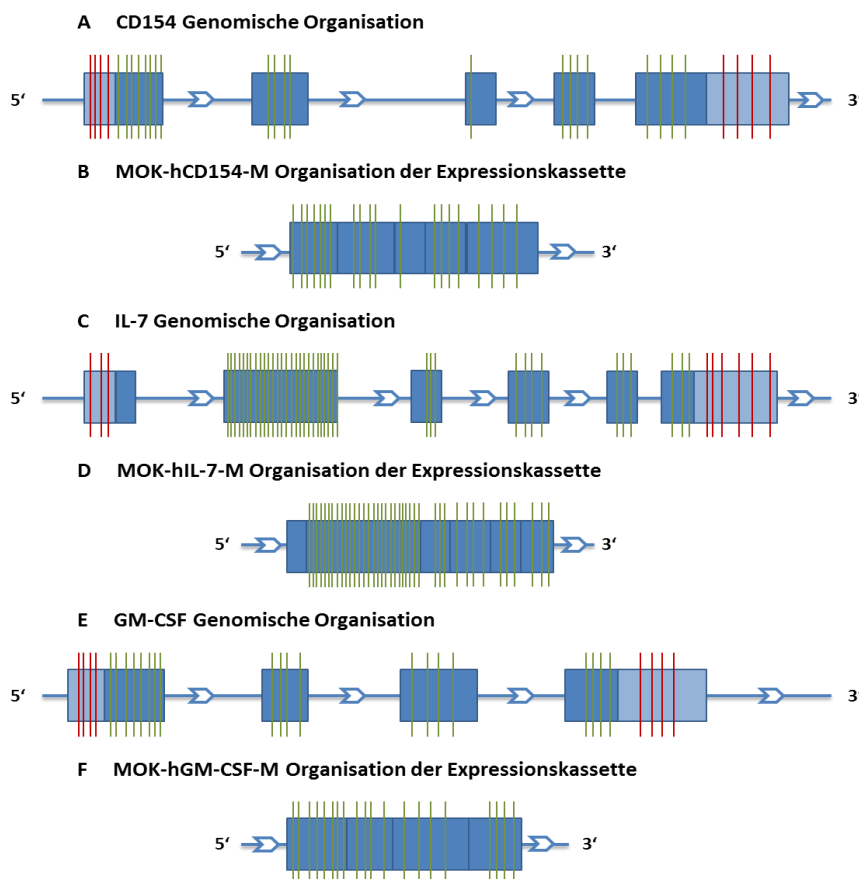
Dargestellt ist die Organisation von CD80 im Genom (A) und in der Expressionskassette im MIDGE MOK-hCD80-M (B). Die Exons werden als dunkelblaue Boxen dargestellt, während nicht translatierte Bereiche der 5'- und 3'-Region des Gens als hellblaue Boxen dargestellt sind. Die Introns liegen entsprechend dazwischen (nicht gesondert dargestellt). Die senkrechten roten und grünen Linien markieren die Zielsequenz der Affymetrix Sonden auf dem GeneChip® Human 1.0 ST. Alle grünen Zielsequenzen liegen innerhalb eines Exons und sind auch in der Expressionskassette des MIDGE enthalten (B). Alle roten Hybridisierungssequenzen sind in nicht translatierten Bereichen oder in Introns lokalisiert (A). Ein Transkript, das in der Expressionskassette des MIDGE kodiert ist, besitzt die roten Zielsequenzen nicht, das detektierte Signal für diese Sonden würde in dem Fall sehr niedrig ausfallen.

Dies führt dazu, dass in den Microarray-Analysen der Wirkstoffzellen nur für 14 der insgesamt 29 CD80-spezifischen Sonden ein hohes Signal detektiert wird. Die Summation der Einzelsignale zu einem gemeinsamen CD80-spezifischen Signal in der durchgeführten Präprozessierung führt zu einer augenscheinlich geringen Signalintensität für CD80 in den Wirkstoffzellen und damit auch zu der Berechnung einer geringeren differentiellen Expression zwischen den nativen B25-MOL und den Wirkstoffzellen. Prinzipiell könnte durch eine manuelle Reduktion um 15 der CD80-spezifischen Sonden auf die 14 MIDGE®-relevanten Sonden vor der Präprozessierung dieses Summationsartefakt eliminiert werden. Da diese Reduktion auf alle miteinander zu vergleichenden Microarray-Experimente ebenso angewendet werden müsste sind die Folgen dieser Reduktion auf die Gesamtanalyse der Microarray-Daten jedoch nicht absehbar. Außerdem ist die massive Steigerung der CD80-Expression durch die Taqman® qPCR und den Proteinnachweis mehr als ausreichend nachweisbar, weshalb auf diese manuelle Korrektur verzichtet wird.

Die Überprüfung der Sondensequenzen für die anderen drei Gene (CD154, IL-7, GM-CSF) zeigt, dass diese ausnahmslos in Exonbereichen, welche auch in den Sequenzen der eingebrachten Expressionskassetten vorhanden sind oder den nicht-translatierten 3'- bzw. 5'-Sequenzbereichen liegen. Sonden, die Transkripte von Intronsequenzen dieser Gene hybridisieren kommen dagegen nicht vor (Abbildung 5.6). Damit ist auch für diese drei Gene die tatsächliche Expressionsstärke höher als die Ergebnisse der Microarray-Analysen es suggerieren. Allerdings ist der Anteil der Sonden, die Transkripte der Sequenzbereiche



hybridisieren, welche nicht in diesen Vektoren enthalten sind, wesentlich geringer (18,4 – 28,6 %) als beim CD80-kodierenden Vektor (51,7 %), weshalb sich dies in sehr viel geringerem Maß auf die Ergebnisse der Microarray-Analysen auswirkt als bei der detektierten Expressionsstärke von CD80.



**Abbildung 5.6 Organisation der Gene CD154, IL-7 und GM-CSF im Genom und den kodierenden Expressionskassetten**

Exons werden als dunkelblaue Boxen, nicht-translatierte Sequenzbereiche der 5'- und 3'-Region als hellblaue Boxen dargestellt. Introns, welche zwischen den Exons lokalisiert sind, sind nicht dargestellt. Die senkrechten roten und grünen Linien markieren die Hybridisierungssequenzen der Sonden auf dem Human GeneChip® 1.0 ST. Alle grünen Zielsequenzen liegen innerhalb eines Exons und sind auch in der Expressionskassette des MIDGE enthalten. Alle roten Hybridisierungssequenzen sind in den nicht-translatierten Bereichen oder in Introns lokalisiert. Ein MIDGE®-kodiertes Transkript (B, D, F) besitzt die roten Zielsequenzen nicht; das detektierte Signal für diese Sonden wird in diesen Fällen sehr niedrig ausfallen.

Anhand der Proteinexpressionsanalysen, die routinemäßig nach der Transfektion der MIDGE®-DNA-Vektoren durchgeführt werden, ist in jedem Fall eine hohe Expression aller vier Expressionskassetten nachweisbar. Dieses Phänomen zeigt, dass gerade der Versuch, die mRNA-Expression transfizierter Expressionskassetten mittels DNA-Microarray-Analyse nachzuweisen, eher kritisch betrachtet werden sollte, da die verwendeten Sonden für den Nachweis der physiologisch vorhandenen mRNA entworfen sind und nicht für den Nachweis von auf cDNA-Expressionskassetten basierender mRNA.

### 5.3 Differentielles Genexpressionsprofil der Wirkstoffzellen

Die Gegenüberstellung der Expressionsdaten, die unter Verwendung des Affymetrix Human GeneChips® 1.0 ST zur Genexpressionsanalyse von nativen B25-MOL und Wirkstoffzellen ermittelt werden, führt zu einer großen Anzahl differentiell exprimierter Gene, welche zum Teil biologisch funktionellen Gengruppen bzw. Pathways zugeordnet werden können, die für die angestrebte Wirkung der Wirkstoffzellen von besonderem Interesse sind. Dazu gehören die Expression von Tumor-assoziierten Antigenen, Apoptose- und Zellzyklus-assoziierte Gene, Zytokine und Chemokine, Gene der Antigen-Prozessierung und -Präsentation sowie Gene, die an der Proliferation, Differenzierung und Aktivierung von Lymphozyten beteiligt sind oder eine Assoziation mit der NK-Zellinteraktion zeigen. Zur Verifikation und genaueren Quantifizierung wurde an einer Auswahl von Genen, deren Expressionsniveau mittels Taqman® qPCR untersucht. Um festzustellen, ob eine veränderte mRNA-Expression mit einer entsprechenden Veränderung der Proteinexpression korreliert, ist für einige Gene zusätzlich ein Nachweis der Proteinexpression durchgeführt worden. In den folgenden Abschnitten soll nun die biologische Relevanz dieser funktionellen Gengruppen bzw. einiger ausgewählter Gene näher erörtert werden.

#### 5.3.1 Regulation des Zellzyklus und der Apoptose

Die an der Apoptose beteiligten überrepräsentierten funktionellen Gengruppen zeigen ein sehr uneinheitliches Bild. Sie können teilweise mit einer negativen und teilweise mit einer positiven Regulation der Apoptose assoziiert werden (Tabelle 5.4).

Bei den drei Gengruppen „*hsa 04210: Apoptosis*“, „*regulation of apoptosis*“ und „*regulation of programmed cell death*“ handelt es sich um übergeordnete Kategorien, in denen zwischen einer Hoch- und Runterregulation nicht unterschieden wird. Die gelisteten Gene der funktionellen Gengruppen, die an der Runterregulation der Apoptose beteiligt sind („*negative regulation of programmed cell death*“, „*negative regulation of apoptosis*“, „*negative regulation of cell death*“, „*anti-apoptosis*“) sind nahezu identisch. Für die Liste der Gene der funktionellen Gruppen, die mit der positiven Regulation der Apoptose assoziiert sind („*positive regulation of apoptosis*“, „*positive regulation of programmed cell death*“, „*positive regulation of cell death*“) trifft dies ebenso zu. Die Signifikanzwerte der überrepräsentierten Gengruppen weisen ähnliche Werte auf. Damit ist die Wahrscheinlichkeit, dass eine Regulation in diesen funktionellen Gengruppen vorliegt für beide Gruppen etwa gleich groß. Auch wenn die Signifikanzwerte der funktionellen Gengruppen einer positiven Regulation der Apoptose geringfügig niedriger sind, rechtfertigt dies nicht die Annahme, dass die Zellen eher einer

Runterregulation der Apoptose unterliegen, da die hier durchgeführte Analyse die Funktion der einzelnen Gene und damit die Tragweite ihrer Wirkung nicht berücksichtigt, sondern nur die Anzahl der Gene an der Gesamtanzahl der Gene in dieser funktionellen Gruppe. So hätte die Regulation der Expression eines Tumorsuppressorgens wie p53 (keine herstellungsbedingte Regulation nachweisbar) eine weit größere Auswirkung auf die Regulation der Apoptose, als beispielsweise eine veränderte Expression eines „*BH3-only*“ Proteins (Kodama et al., 2011; Willis et al., 2005).

**Tabelle 5.4 Überrepräsentierte funktionelle Gengruppen, die eine Assoziation mit der Apoptose aufweisen**

Aufgeführt sind alle überrepräsentierten Apoptose-assoziierten funktionellen Gengruppen, die sich aus dem Vergleich der Expressionsprofile der nativen B25-MOL-Zellen mit denen der Wirkstoffzellen ergeben. Zu den grün unterlegten funktionellen Gengruppen gehören Gene, die in der Lage sind, Apoptose an verschiedenen Stellen zu inhibieren, während zu den rot unterlegten funktionellen Gengruppen Gene gehören, welche die Apoptose begünstigen. Bei den drei übrigen funktionellen Gengruppen handelt es sich um übergeordnete Gengruppen.

Code	Kategoriebezeichnung	p-Wert
GOTERM_BP_5	GO:0042981 regulation of apoptosis	4,80E-06
GOTERM_BP_5	GO:0043067 regulation of programmed cell death	5,69E-06
GOTERM_BP_5	GO:0006916 anti-apoptosis	3,97E-04
GOTERM_BP_5	GO:0012502 induction of programmed cell death	7,20E-04
GOTERM_BP_5	GO:0043066 negative regulation of apoptosis	1,59E-03
GOTERM_BP_5	GO:0043069 negative regulation of programmed cell death	1,78E-03
GOTERM_BP_5	GO:0060548 negative regulation of cell death	1,82E-03
GOTERM_BP_5	GO:0043065 positive regulation of apoptosis	2,42E-03
GOTERM_BP_5	GO:0043068 positive regulation of programmed cell death	2,56E-03
GOTERM_BP_5	GO:0010942 positive regulation of cell death	2,66E-03
KEGG_PATHWAY	hsa04210: Apoptosis	4,73E-02

Entsprechend der funktionellen Gengruppen können auch die verstärkt exprimierten Gene in zwei Gruppen aufgeteilt werden: die Gene, deren Überexpression eine Apoptose der Zelle begünstigen, und die Gene, die eine Apoptose eher inhibieren (Tabelle 5.5). Allein anhand der Anzahl der regulierten Gene lässt sich ebenfalls nicht feststellen, ob eine Apoptose der Zelle eher begünstigt oder inhibiert wird.

**Tabelle 5.5 Zuordnung der verstärkt exprimierten Gene zur positiven bzw. negativen Regulation der Apoptose**

Entsprechend der Einteilung in funktionelle Gengruppen der positiven bzw. negativen Regulation der Apoptose sind hier die jeweils zugeordneten Gene gelistet. Die kursiv markierten Gene tauchen entweder in beiden Listen auf (*CDKN1A*) oder sind an Regulationsmechanismen (entsprechend publizierter Forschungsergebnisse) der positiven und negativen Regulation der Apoptose beteiligt (*NFKBIA*).

	Anzahl der regulierten Gene	Regulierte Gene
Positive Regulation der Apoptose	13 (+1)	SFN, TNF9, Fas, ETS1, DDIT3, GCH1, AEN, PMAIP3, DEDD2, MX1, <i>CDKN1A</i> , INHBA, TNFRSF10B, IFIH1
Negative Regulation der Apoptose	13 (+2)	<i>NFKBIA</i> , CCL2, STAT5, SPHK1, CSF2, HSPA1A, HSPA1B, <i>CDKN1A</i> , TNFAIP3, IL-6, IL-7, CD154, TRAF1, IRAK1, PIK3R3

Das Gen **CDKN1A** (*cyclin dependent kinase inhibitor 1A*) ist sowohl in der Liste der beteiligten Gene der positiven Regulation, wie auch in der der Runterregulation der Apoptose vorhanden. Das kodierte Protein p21 bindet und inhibiert verschiedene Cycline und verursacht damit einen Zellzyklusarrest. Die Expression unterliegt der transkriptionellen Kontrolle des Transkriptionsfaktors (TF) p53, welcher beispielsweise nach Schädigung der chromosomalen DNA aktiviert wird. Unter physiologischen Bedingungen agiert p21 eher als anti-apoptotisches Protein. Neben Cyclinen bindet p21 auch inaktive Pro-Caspase-3 und -2 und verhindert dadurch deren Konvertierung in eine aktive Effektor-Caspase. Außerdem bildet es Komplexe mit der Apoptose-Signalregulierenden Kinase 1 (ASK1) und inhibiert die stressaktivierte MAP-Kinase-Signalkaskade. Allerdings zeigt eine Reihe von Untersuchungen, dass eine Chemotherapeutika- oder Strahlungs-induzierte Apoptose in verschiedenen Tumorzellen mit einer verstärkten Expression von p21 assoziiert ist, weshalb auch eine pro-apoptotische Funktion von p21 diskutiert wird (Cazzalini et al., 2010; Liu et al., 2003). Ob sich die verstärkte Expression von *CDKN1A* (p21) in den Wirkstoffzellen eher pro- oder anti-apoptotisch auswirkt, kann an dieser Stelle nicht abschließend geklärt werden und bedarf weiterführender Analysen.

Die Apoptose kann durch extrinsische, intrinsische oder ER-Stress-induzierte Signale initiiert werden. Der Herstellungsprozess-bedingte Stress legt die Vermutung nahe, dass vor allem Gene der intrinsischen Apoptose-Initiation in den Wirkstoffzellen verstärkt exprimiert werden. Entsprechend dieser Vermutung zeigen die Gene **DDIT3** (*DNA damage induced transcript 3*), **SFN** (*stratifin*) und **AEN** (*apoptosis enhancing nuclease*) eine verstärkte Expression. Die Expression dieser Gene wird nach Beschädigung der chromosomalen DNA induziert und steht unter der Kontrolle des Transkriptionsfaktors p53. Eine Überexpression dieser Gene verhindert die Progression des Zellzyklus. Die entsprechenden Genprodukte inhibieren den Zellzyklus an unterschiedlichen Stellen über verschiedene Mechanismen (Cazzalini et al., 2010; Jauhainen et al., 2012; Lee et al., 2005; Taylor et al., 2001).

Noxa, welches durch das Gen **PMAIP** kodiert wird, gehört ebenfalls zum intrinsischen Weg der Apoptose. Es gehört zur Gruppe der pro-apoptotischen „*BH3-only*“ Proteine, diese binden anti-apoptotische Bcl-2 Proteine. Diese sind in gesunden Zellen an pro-apoptotische Proteine (Bax-Proteine) gebunden und verhindern deren Oligomerisierung und damit die Generierung von Strukturen, die zur Permeabilisierung der Mitochondrienmembran führen. Eine Überexpression der „*BH3-only*“ Proteine führt zu einer höheren Konzentration freier pro-apoptotischen Bax-Proteine, die nach Oligomerisierung letztlich zur Permeabilisierung der Mitochondrienmembran, zur Freisetzung von Cytochrom C und schließlich zum Tod der Zelle führen. Allerdings handelt es sich bei PMAIP1 um ein „*BH3-only*“ Protein mit einer eher schwachen Potenz zur Apoptose-Induktion. Erst eine kombinierte Überexpression weiterer „*BH3-only*“ Proteine wie Bad induziert die intrinsischen Apoptose der Zelle. (Kim et al., 2006a; Kim et al., 2006b; Willis et al., 2005). Die gesteigerte Expression von PMAIP1 ist in den Microarray-Analysen (16fach höhere Expression in Wirkstoffzellen), wie auch in den Taqman-basierten qPCR-Analysen (50,6fache Steigerung der Expression) belegt. Eine gesteigerte Expression eines weiteren „*BH3-only*“ Proteins, was zur Induktion der intrinsischen Apoptose führt, kann in den Wirkstoffzellen jedoch nicht nachgewiesen werden.

Auch Gene, die mit dem extrinsischen Weg der Apoptose assoziiert sind, zeigen eine signifikant erhöhte Expression in den Wirkstoffzellen. Dazu zählen einige Oberflächenproteine, durch die Apoptose in den Zellen induziert werden kann, wie Fas oder TNFRSF10B; aber auch Gene, deren Genprodukte in der Signaltransduktionskette der Apoptose lokalisiert sind, zeigen eine erhöhte Expression in den Wirkstoffzellen.

**Fas** (CD95) zählt zu den TNF-Rezeptoren, die nach Interaktion mit einem geeigneten Liganden in der Lage sind, Apoptose über die Formierung des DISC-Komplexes (*death-inducing-signaling-complex*) zu induzieren. Die Auswertung der Expressionsdaten, die mittels Microarray-Analysen erhoben wurden, zeigen, dass dieses Gen im Verlauf des Herstellungsprozesses von den nativen B25-MOL-Zellen zu den Wirkstoffzellen eine relative Expressionssteigerung um den Faktor 3,35 erfährt. Die bereits konstitutiv relativ hohe Expression von Fas in den nativen B25-MOL-Zellen wird demnach durch den Herstellungsprozess zusätzlich verstärkt. Die Daten der qPCR Taqman® Analyse stützen dieses Ergebnis allerdings nicht, sie zeigen eine unveränderte mRNA-Expression von Fas. Auch die Daten der Proteinexpression an der Zelloberfläche zeigen keine Veränderung der Expression des kodierten Proteins in beiden Zellpopulationen. Wie Fas gehört auch **TNFRSF10B** (DR5, CD262) zur Familie der TNF-Rezeptoren. Über die Aktivierung von Initiator- und Effektor-Caspasen kommt es zum Abbau zahlreicher essentieller Zellproteine und der DNA, was letztlich zum Tod der Zelle führt (Martinez-Lostao et al., 2012). Analog zu Fas liegt auch für TNFRSF10B in den nativen B25-

MOL-Zellen eine vergleichbar hohe konstitutive Expression auf mRNA-Ebene vor, die durch den Herstellungsprozess eine zusätzliche Steigerung erfährt. Für TNFRSF10B konnte mit Hilfe der Expressionsdaten aus den Microarray-Analysen eine 3,4fache Steigerung der mRNA-Expression ermittelt werden. Die Ergebnisse der qPCR Taqman® Analysen untermauern die Tendenz der Expressionssteigerung mit einer 5,7fachen Steigerung der Expression. Proteinexpressionsdaten für TNFRSF10B wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht erhoben. Eine gesteigerte Proteinexpression hätte eine höhere Sensitivität gegenüber Apoptose-induzierenden Signalen zur Folge.

Ein weiteres Gen, dessen Produkt mit der Rezeptor-vermittelten Apoptose assoziiert ist und im Verlauf des Herstellungsprozesses eine Expressionssteigerung zeigt, ist **DEDD2**. Das kodierte Protein weist eine „*death effector domain*“ (DED) auf. Über diese DED ist dieses Protein bei Überexpression oder Fas-induzierter Apoptose in der Lage, Procaspase 8 bzw. Procaspase 10 zu rekrutieren, zu aktivieren und in den Zellkern zu transportieren, welche dort die Protein-Translationsapparatur inhibieren (Alcivar et al., 2003). Die Auswertung der Daten der Microarray-Experimente zeigt, dass DEDD2 in den Wirkstoffzellen eine 3,8fach höhere mRNA-Expression aufweist als in den B25-MOL-Zellen. Die Ergebnisse der Auswertung der qPCR Taqman® Analysen bestätigten diese Expressionssteigerung jedoch nicht, hier ist eine stabile mRNA-Expression nachweisbar. Da die hier erfolgten Expressionsanalysen widersprüchliche Ergebnisse ergeben, kann an dieser Stelle nicht eindeutig festgestellt werden, ob eine Änderung der mRNA-Expression vorliegt. Diese Diskrepanz kann durch eine Analyse der Expression des resultierenden Proteins von DEDD2 geklärt werden, denn letztlich entscheidet eine veränderte Expression des Proteins über die Folgen für die Zelle.

Den zuvor erwähnten pro-apoptotischen Genen stehen ebenso viele anti-apoptotische Gene gegenüber, welche bei Betrachtung der Ergebnisse der Microarray-Analysen ebenfalls eine verstärkte Expression in den Wirkstoffzellen zeigen. Die beiden Gene **HSPA1A** und **HSPA1B**, welche molekulare Chaperone kodieren, weisen eine verstärkte Expression in den Wirkstoffzellen auf, die sowohl mittels Microarray-Analyse als auch mit Hilfe der Taqman basierten qPCR-Analyse nachweisbar ist (spezifische Sonden-Sets des verwendeten Microarray Chips hybridisieren cDNA beider Gene gleichermaßen, daher gilt der angegebene FC für die Expressionsstärke beider mRNAs,  $FC_{MA} = 3,57$ ; Primer und Sonde in Taqman-Analyse hybridisieren beide cDNA,  $FC_{Taq} = 3,53$ ). Diese Chaperone wirken an multiplen Kontrollpunkten der Apoptose und sorgen unter anderem dafür, dass eine Stress-induzierte Schädigung der Zelle wieder behoben werden kann und nicht im Tod der Zelle enden muss. So blockieren sie die Translokation von Bax in die Mitochondrienmembran und binden und inaktivieren APAF-1. Weiterhin sind sie in der Lage, die Proteolyse essentieller nuklearer Proteine durch Caspase-3

zu blockieren, was ebenfalls zu einer negativen Regulation der Apoptose führt (Garrido et al., 2006). Das Gen **TNFAIP3**, welches das Protein A20 kodiert, weist in den Wirkstoffzellen eine massiv verstärkte Expression auf ( $FC_{MA} = 23,84$ ). Es inhibiert die aktivierende Proteolyse von den Caspasen 8, 2, 3 und 6 und verhindert außerdem die Trunkierung von Bid. Durch diese Mechanismen kann die Progression einer Rezeptor-vermittelten Apoptose inhibiert werden (Daniel et al., 2004).

Ein weiteres verstärkt exprimiertes Gen, welches mit der Runterregulation der Apoptose assoziiert ist, ist **NFKBIA**. Das Produkt dieses Gens ( $I\kappa B\alpha$ ) inhibiert die Aktivität von NF $\kappa$ B/REL-Komplexen, indem es diese im Zytoplasma zurückhält, so dass diese ihre Funktion als Transkriptionsfaktoren im Nukleus nicht ausüben können. Allerdings fungiert NF $\kappa$ B sowohl für pro-apoptotische Gene (p53, Fas, BCL2L1) als auch für anti-apoptotische Gene (XIAP, BCL2, A20, GADD45 $\beta$ ) als Transkriptionsfaktor. Die Überexpression von NFKBIA kann dementsprechend weder als pro- noch als anti-apoptotisch gewertet werden (Kucharczak et al., 2003).

Generell kann anhand der vorliegenden Daten nicht eindeutig geklärt werden, ob die Wirkstoffzellen eher in Apoptose gehen bzw. sensibler gegenüber der Induktion der Apoptose sind als die nativen B25-MOL-Zellen. Dies liegt vor allem darin begründet, dass die Apoptose vor allem über die Aktivität und Lokalisation entscheidender Schlüsselproteine reguliert wird und weniger über deren Expressionsstärke (Jin et al., 2005; Otera et al., 2012; Plati et al., 2011).

Allerdings steht diesem sehr heterogenen Bild der Apoptose-Regulation bezüglich der verstärkt exprimierten Gene ein eindeutiges Bild der vermindert exprimierten Gene gegenüber. Insgesamt 131 der vermindert exprimierten Gene weisen eine Assoziation mit überrepräsentierten funktionellen Gengruppen und Pathways auf, die mit dem Zellzyklus bzw. dessen Regulation assoziiert sind (Tabelle 4.8, S. 94, und Tabelle 4.9, S.119). Dazu gehört beispielsweise das Gen **CCNA2** (*cyclin A2*), welches in den Microarray-Analysen der nativen B25-MOL-Zellen eine hohe Signalstärke von 1470,6 ( $SD = 180,18$ ) aufweist, in den Wirkstoffzellen jedoch stark vermindert exprimiert wird und nur noch eine Signalstärke von 183,2 ( $SD = 12,50$ ) zeigt. Dies entspricht einer verminderten relativen Expression um das 8fache. Die Ergebnisse der Expressionsdaten aus den Taqman<sup>®</sup> qPCR-Analysen zeigen sogar eine Reduktion der Expressionsstärke um das 17,5fache in den Wirkstoffzellen. Das von CCNA2 kodierte Protein bindet und aktiviert die beiden Cyclin-Kinasen CDK1 und CDK2 und unterstützt den Übergang von der G1 zur S-Phase sowie von der G2 zur M-Phase des mitotischen Zellzyklus. Eine verminderte Expression dieses Gens führt zwangsläufig zum

Zellzyklusarrest (Fung et al., 2007; Pagano et al., 1992). Ein weiteres Beispiel stellt das **CDK1** (*cyclin dependent kinase 1*) Gen dar. Während es in nativen B25-MOL-Zellen eine moderate Expressionsstärke aufweist, konnte in den Wirkstoffzellen nur noch eine marginale Expression nachgewiesen werden. Insgesamt verringerte sich die Expressionsstärke von CDK1 um den Faktor ( $FC_{MA}$ ) 4,26. Diese Ser/Thr-Kinase stellt eine Komponente des hoch konservierten Protein-Kinase-Komplexes MPF (*M-phase promoting factor*) dar, welcher essentiell für den Übergang von der G1 zur S-Phase und der G2 zur M-Phase der Mitose ist. Des Weiteren phosphoryliert diese Kinase eine Reihe Zellzyklus-assoziiierter Proteine (z.B. CDC20, p53, CDK7), welche im Rahmen des Zellzyklus ebenfalls wichtige Funktionen übernehmen. Analog zu CCNA2 führt auch eine verminderte Expression von CDK1 zum Zellzyklusarrest (Salaun et al., 2008; Timofeev et al., 2010).

Für die Ser/Thr-Kinase Aurora A (**AURKA**, *aurora kinase A*) kann in den Wirkstoffzellen ebenfalls eine signifikant verminderte Expression nachgewiesen werden. Die Microarray-Analysen ergeben in den Wirkstoffzellen eine 5,56fach verminderte Expression, welche durch die Ergebnisse der Taqman® basierten qPCR-Analyse ( $FC_{Taq} = -5,49$ ) bestätigt wird. Die Aurora A Kinase übernimmt wichtige regulatorische Funktionen in der Mitose. Im aktiven Zustand ist sie mit Centrosomen und den Spindel-Mikrotubuli assoziiert; hier übernimmt sie eine essentielle Rolle bei der Centrosomen-Reifung und –Separation, in der Anordnung der Spindelapparatur, sowie der Reifung und Anordnung der Chromosomen in der Metaphase. Eine verminderte Expression der Aurora A Kinase führt nicht nur zur Inhibition der Progression des Zellzyklus, sondern kann auch Apoptose induzieren (Evans et al., 2008; Nikonova et al., 2012). Weiterhin weisen Gene eine verminderte Expression in den Wirkstoffzellen auf, deren Genprodukte Komponenten des NDC80-Kinetochore-Komplexes sind. Dieser Komplex ist Teil des Kinetochores, der essentiell für die Chromosomen-segregation in der Mitose ist. Er verbindet die Mikrotubuli des Spindelapparates mit den Centrosomen der Chromatiden (Takeuchi et al., 2012). Der NDC80-Komplex setzt sich aus vier Proteinen zusammen: Spc24, Spc25, Nuf2 und Ndc80 (Sundin et al., 2011). Die kodierenden Gene von Spc25 (**SPC25**, *NDC80 kinetochore complex component, spindle pole body component 25*), Nuf2 (**NUF2**, *NDC80 kinetochore complex component, kinetochore complex protein Nuf2*) und Ndc80 (**NDC80**, *NDC80 kinetochore complex component, kinetochore complex protein Hec1*) zeigen eine teilweise deutlich verminderte Expression in den Wirkstoffzellen. Während die mittels Microarray-Analysen erhobenen Expressionsdaten der nativen B25-MOL-Zellen auf eine mittlere Expressionsstärke der entsprechenden Gene hinweisen, sind die detektierten Signalstärken der mRNA in den Wirkstoffzellen so niedrig, dass diese unterhalb des Schwellenwertes für eine nachweisbare mRNA-Expression fallen (Tabelle 5.6). Allerdings kann die beobachtete



verminderte Expression von NDC80 anhand der Taqman® basierter qPCR nicht bestätigt werden ( $FC_{Taq} = -2,13$ ), hier ergibt sich eine stabile Expression dieses Gens. Weiterhin zeigt das Kinetochore-assoziierte Kinesin-7 CENP-E (**CENPE**, *centromere-associated protein E*) eine verminderte Expression in den Wirkstoffzellen (Tabelle 5.6), welche mittels Taqman® basierter qPCR bestätigt werden kann ( $FC_{Taq} = -3,11$ ). Dieses Protein etabliert die Chromosomen-Mikrotubuli-Verbindung und fungiert als Motorprotein, um die Chromatiden zu den Spindelpolen zu transportieren (Sardar et al., 2012; Yen et al., 1992). Das Centrosomen-assoziierte Protein CENP-I (CENPI), welches essentielle Funktionen im Centrosomen übernimmt, zeigt auf Ebene der mRNA ebenfalls eine verminderte Expression (Tabelle 5.6).

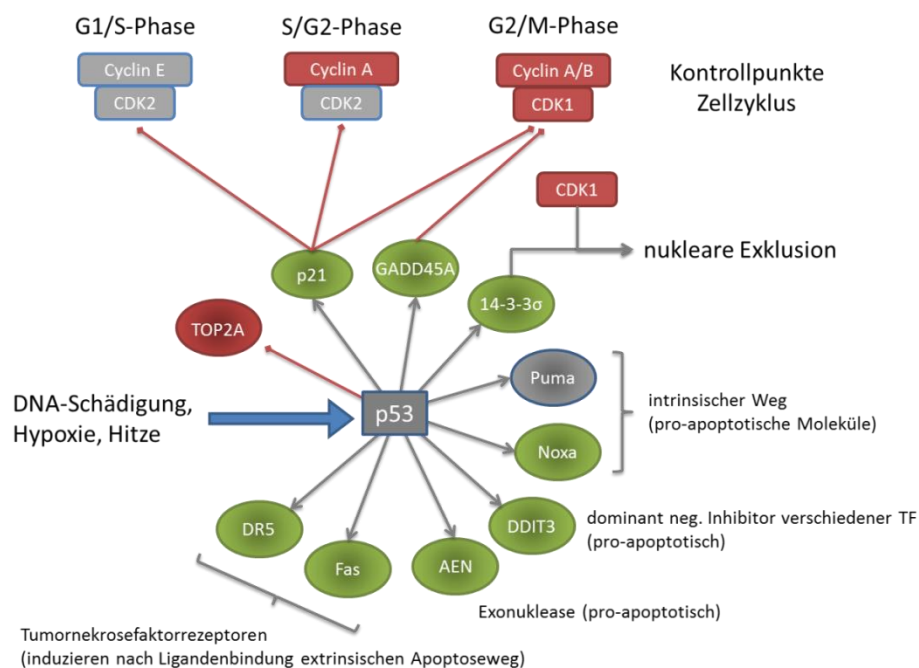
**Tabelle 5.6 MA-Signalintensitäten und Änderungen der Expression von Genen, deren Proteine Kinetochore- und Centrosomen-assoziiert sind**

Gen	NDC80	NUF2	SPC25	CENPE	CENPI
$S_{Int}$ (nativ)	284,05 ( $\log_2 = 8,15$ )	388,02 ( $\log_2 = 8,60$ )	634,73 ( $\log_2 = 9,31$ )	270,60 ( $\log_2 = 8,08$ )	770,69 ( $\log_2 = 9,59$ )
$S_{Int}$ (MGN)	65,34 ( $\log_2 = 6,03$ )	63,56 ( $\log_2 = 5,99$ )	72,00 ( $\log_2 = 6,17$ )	46,21 ( $\log_2 = 5,53$ )	85,04 ( $\log_2 = 6,41$ )
FC	-4,34	-6,09	-8,87	-5,84	-9,05

Diese Ergebnisse legen nahe, dass der Aufbau des Kinetochore-Centrosomen-Komplexes, der für die Chromosomensegregation essentiell ist, in den Wirkstoffzellen stark beeinträchtigt ist. Versuche zeigen, dass die Depletion verschiedener Centrosomen-assoziiierter Proteine zum Zellzyklusarrest und Tod der Zellen führen (Takeuchi et al., 2012). Die deutliche Verminderung der Expression der Kinetochore-Proteine Nuf2 verhindert eine stabile Verbindung der Spindelmikrotubuli und der Centrosomen, damit kommt es nicht zu einer Anordnung der Chromosomen in der Äquatorialebene (Sundin et al., 2011). Die ungebundenen Centrosomen bilden einen Proteinkomplex, der als Spindelkontrollpunkt bezeichnet wird. Dieser Komplex blockiert die Aktivierung des *Anaphase-Promoting-Complex*, wodurch der Übergang von der Metaphase in die Anaphase verhindert wird (Karess, 2005).

Die Expression vieler regulierter Gene, die mit der Apoptose oder mit der Regulation des Zellzyklus assoziiert sind, unterliegen der transkriptionellen Kontrolle von p53, einem Transkriptionsfaktor, der infolge von DNA-Schädigung, Hypoxie oder Schädigung der Spindelapparatur aktiviert wird. Dieser liegt unter physiologischen Bedingungen in inaktiver Form, gebunden an seinen negativen Regulator MDM2 im Zytoplasma vor. Infolge von Stress kommt es zur Aktivierung von p53 und Translokation in den Nukleus, wo p53 als Transkriptionsfaktor zahlreicher Gene fungiert. In den Wirkstoffzellen können einige Gene als differentiell exprimiert identifiziert werden, deren Expression durch p53 kontrolliert wird. Es

liegt nahe, dass es im Verlauf des Herstellungsprozesses Stress- und DNA-Schädigungs-bedingt zur Aktivierung von p53 kommt, was zu einer veränderten Expression verschiedener Gene in den Wirkstoffzellen führt. So kommt es einerseits zu einer verstärkten Expression zyklushemmender Gene (CDKN1A, SFN), während andererseits eine vermehrte Expression pro-apoptotischer Gene (PMAIP1, DDIT3) zu beobachten ist (Abbildung 5.7).



**Abbildung 5.7 Aktivierung von p53 und damit assoziierter Genregulation**

Gentoxische Schädigung, Hypoxie bzw. Hitze führen zur Aktivierung von p53; als Transkriptionsfaktor (TF) kontrolliert p53 die Expression zahlreicher Gene, die unter anderem zyklushemmend und pro-apoptotisch wirken. So kommt es zur verstärkten Expression von CDKN1A (p21) und GADD45A, welche zyklushemmende Wirkung haben. Die verstärkte Expression von SFN (14-3-3σ) verhindert die Translokation von CDK1 in den Nucleus. Des Weiteren wird die Expression eine Reihe pro-apoptotischer Gene forciert, wie PMAIP1 (Noxa), DDIT3, AEN, Fas, TNFRSF10B (DR5) und BBC3 (Puma). Die Transkription von TOP2A (Topoisomerase 2a) wird dagegen inhibiert. Gene, die in den Wirkstoffzellen vermehrt exprimiert werden sind in grün, während vermindert exprimierte Gene in rot dargestellt sind. Unverändert exprimierte Gene sind in grau dargestellt.

Die Aktivierung von p53 hätte zusätzlich dessen Translokation in die äußere Mitochondrienmembran zur Folge, wo p53 mit pro- und anti-apoptotischen Proteinen der Bcl-2-Familie interagiert, wodurch die Permeabilisierung der äußeren mitochondrialen Membran induziert wird. Die Interaktion von p53 mit Bcl-2 und Bcl-xl (BCL2L1) neutralisiert deren inhibitorischen Effekt auf die pro-apoptotischen Moleküle Bak und Bax, wodurch es zur Oligomerisierung und damit zur Porenbildung in der äußeren Membran und schließlich zur Freisetzung von Cytochrom C und Aktivierung von pro-apoptotischen Caspasen kommt. Durch direkte Interaktion mit Bak wird eine Komplexbildung mit dem anti-apoptotischen Molekül Mcl-1 blockiert, während die Interaktion mit Bax dessen Oligomerisierung stimuliert (Vaseva et al., 2009). Bis hierhin ergibt sich aus den beobachteten Veränderungen von p53-regulierenden und p53-regulierten Genprodukten ein stimmiges Bild von verstärkt apoptotisch aktiven

Wirkstoffzellen. Allerdings ist eine veränderte Expression von p53 auf mRNA-Ebene in den Wirkstoffzellen gegenüber den nativen B25-MOL-Zellen ist jedoch nicht nachweisbar und ein veränderter Aktivierungsstatus mit den hier verwendeten Methoden nicht nachvollziehbar.

Andererseits zeigen auch einige anti-apoptotische Gene in den Wirkstoffzellen eine verstärkte Expression, die diesem Mechanismus entgegenwirken kann. So inhibiert HSP70 (HSPA1A, HSPA1B, HSPA6) die Oligomerisierung von Bax, was die Freisetzung von Cytochrom C verhindert; außerdem inhibiert es die Komplexbildung von Cytochrom C mit Apaf-1, wodurch die Bildung des Apoptosoms und damit die Aktivierung von Effektor-Caspasen verhindert wird (Kim et al., 2008; Stankiewicz et al., 2005). Die verstärkte Expression von TNFAIP3 (A20) wirkt sich eher im extrinsischen Apoptoseweg aus. Dabei interagiert A20 mit RIP1 im DISC-Komplex und blockiert sowohl eine Aktivierung von NF- $\kappa$ B als auch die Autoproteolyse von Caspase 8 (Daniel et al., 2004; Verstrepen et al., 2009).

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Expressionsanalysen zeigen, dass eine Vielzahl von Zellzyklus- und Apoptose-assoziierten Genen in den Wirkstoffzellen eine differentielle Expression aufweisen. Eine nähere Betrachtung der regulierten Gene spricht für ein gehäuftes Auftreten von Zellzyklusarrest und Stress-induzierte Apoptose, welche durch den Herstellungsprozess ausgelöst werden. Die verstärkt exprimierten anti-apoptotischen Gene wirken sich eher auf den extrinsischen Apoptoseweg aus, inhibieren jedoch nicht eine intrinsische oder Stress-induzierte Apoptose. Der Proliferationsstopp der Wirkstoffzellen ist durchaus beabsichtigt und soll im Verlauf des Herstellungsprozesses durch die Bestrahlung erreicht werden. In Versuchen, in denen Wirkstoffzellen unter Laborbedingungen kultiviert werden, kann ein Stopp der Proliferation und vollständiges Absterben der Wirkstoffzellen innerhalb von Stunden bis wenige Tage beobachtet werden. Auf der Grundlage der hier erhobenen Daten und den Beobachtungen *in vitro* ist davon auszugehen, dass die Wirkstoffzellen auch *in vivo* nur eine kurze Überlebenszeit haben, nicht mehr proliferieren und entweder Stress-induziert oder im Patienten vermittelt durch Immunzellen in Apoptose gehen.

### **5.3.2 Pro- und anti-entzündliche Wirkung von Zytokinen und Chemokinen**

Die funktionelle Gen-Annotationsanalyse der verstärkt exprimierten Gene in den Wirkstoffzellen ergibt eine Liste von 10 funktionellen Gengruppen und Pathways, die einen Einfluss auf die Aktivität und Regulation von Zytokinen und Chemokinen aufweisen. Zytokine und Chemokine spielen in den verschiedensten zellulären Mechanismen und Reaktionen eine Rolle. Im Rahmen der vorliegenden Analysen beschränkt sich die Betrachtung allerdings auf

deren inflammatorische und anti-inflammatorische Eigenschaften. Bezüglich der hier vorliegenden Fragestellung ist in erster Linie ausschlaggebend welche Zytokine von den Wirkstoffzellen exprimiert werden und welche Funktion diese im Wirkprinzip einnehmen.

Das Chemokin **CCL2** (*chemokine ligand 2, monocyte chemotactic protein 1*) wirkt sowohl als pro- wie als anti-inflammatorisches Zytokin. Es rekrutiert in erster Linie Monozyten, NK-Zellen und T-Lymphozyten, aber auch regulatorische T-Lymphozyten (Deshmane et al., 2009; Robertson, 2002). Eine verstärkte Expression dieses Zytokins ist in vielen Tumoren beschrieben und mit einer erhöhten Infiltration von Tumor-assoziierten Makrophagen, sowie einer verstärkten Angiogenese verbunden. Zusätzlich fördert eine hohe CCL2-Konzentration die Ausbildung einer T<sub>H</sub>2-basierten Immunantwort (Deshmane et al., 2009), was jedoch nicht als primäres Ziel dieser Tumorstoffzellen angestrebt wird. Anhand der Ergebnisse der Microarray-Analysen ist auf mRNA-Ebene eine Hochregulation um den Faktor 3,41 in den Wirkstoffzellen nachweisbar, welche sich allerdings im Rahmen der Taqman® qPCR-Analysen nicht bestätigen lassen. Hier liegt die relative Änderung der Expression unterhalb des festgesetzten Grenzwertes. Allerdings weisen bereits die nativen B25-MOL-Zellen eine hohe mRNA-Expression von CCL2 auf. Die Ergebnisse der Analyse der Proteinkonzentration aus dem Zellkulturüberstand von Zellen, die für 24 h unter Kulturbedingungen inkubiert werden, bestätigen die Expressionsdaten, die mit Hilfe der Taqman® qPCR-Analyse erhoben wurden. Auf Proteinebene ist eine leichte, jedoch nicht signifikante Zunahme der CCL2 Expression in den Wirkstoffzellen zu beobachten.

Eine chemotaktische Wirkung auf T-Lymphozyten, NK-Zellen und Dendritischen Zellen weist auch das Chemokin **CCL5** (*chemokine ligand 5, RANTES*) auf, für das auf Proteinebene eine *de novo* Expression in den Wirkstoffzellen nachgewiesen ist. CCL5 stellt einen Liganden für den CCR5-Rezeptor dar, der vor allem auf T<sub>H</sub>1-Lymphozyten, nicht aber auf T<sub>H</sub>2-Lymphozyten exprimiert wird. Entsprechend migrieren in erster Linie T<sub>H</sub>1-Lymphozyten entlang eines CCL5-Konzentrationsgradienten, wodurch die Ausbildung einer T<sub>H</sub>1-Lymphozyten-vermittelten Immunantwort forciert wird (Viola et al., 2012; Wong et al., 2003).

Das Chemokin **CCL20** (*chemokine ligand 20, macrophage inflammatory protein 3 alpha*) gehört, wie auch CCL2 und CCL5, zur C-C Motiv-Chemokinfamilie. Es mobilisiert vor allem Lymphozyten des peripheren Blutes, zeigt aber auch eine schwache chemotaktische Wirkung auf neutrophile Zellen (Hieshima et al., 1997). Für native B25-MOL-Zellen konnte auf mRNA- und auf Proteinebene nur eine marginale Expression von CCL20 nachgewiesen werden. Die Ergebnisse der Microarray-Analysen zeigen eine herstellungsbedingte massive Steigerung der mRNA-Expression in den Wirkstoffzellen, welche mittels Taqman® qPCR-Analyse bestätigt werden

kann. Diese deutliche Steigerung der Expression bestätigt sich ebenfalls auf Proteinebene; die Wirkstoffzellen sezernieren deutlich höhere Mengen CCL20 als die nativen B25-MOL-Zellen. So liegt die Vermutung nahe, dass bedingt durch eine erhöhte CCL20-Konzentration am Vakzinierungsort vermehrt Lymphozyten dorthin einwandern, welche durch die Wirkstoffzellen oder Antigen-präsentierende Zellen aktiviert werden können. Bedingt durch die Herstellung wird sekundär die Expression und Sezernierung von CCL20 in den Wirkstoffzellen induziert. Diese Regulation wird durch den Herstellungsprozess zwar nicht angestrebt, stellt aber einen willkommenen Effekt dar, der sich positiv auf das Wirkprinzip der Tumorstoffvakzine auswirkt.

Das Interferon- $\gamma$  induzierbare Zytokin **IP-10** oder CXCL10 weist neben chemotaktischen Eigenschaften für Monozyten/Makrophagen, Dendritische Zellen, ruhende T-Lymphozyten und NK-Zellen auch regulatorische Eigenschaften auf, so werden beispielsweise T-Lymphozyten zur Reifung angeregt (Dufour et al., 2002; Neville et al., 1997). Die Ergebnisse der Microarray-Analysen zeigen, dass analog zu CCL5 und CCL20, auch IP-10 in den nativen B25-MOL-Zellen eine sehr geringe Signalintensität aufweist, die auf eine nicht vorhandene oder nur marginale mRNA-Expression hinweist. Die Wirkstoffzellen zeigen dagegen eine höhere Signalintensität ( $S_{\text{int}} = 297$ ), was für eine nicht sehr starke, aber dennoch vorhandene mRNA-Expression spricht. In diesem Fall bestätigt sich die Tendenz der relativen Expressionsänderung in der Taqman<sup>®</sup> qPCR-Analyse jedoch nicht, hier ist eine um den Faktor 4,2 verminderte Expression in den Wirkstoffzellen feststellbar. Auf Proteinebene bestätigen sich in diesem Fall die Ergebnisse aus den Microarray-Analysen. Während im Zellkulturüberstand von nativen B25-MOL-Zellen nach 24-stündiger Inkubation nur marginale Mengen von IP-10 nachweisbar sind, ist die Menge die von den Wirkstoffzellen im gleichen Zeitraum sezerniert wird, zwar immer noch gering, aber dennoch deutlich höher als bei den nativen B25-MOL-Zellen. Dementsprechend sind die Wirkstoffzellen eher in der Lage, Antigenpräsentierende Zellen, T-Lymphozyten und NK-Zellen zu rekrutieren, als die nativen B25-MOL-Zellen. Dies stellt einen weiteren Sekundäreffekt des Herstellungsprozesses dar, der ursprünglich nicht intendiert ist, sich jedoch positiv auf das Wirkprinzip auswirkt.

Interleukin 6 (**IL-6**) agiert vor allem am Übergang der Immunantwort vom angeborenen zum adaptiven Immunsystem. Dabei werden Vorgänge des angeborenen Immunsystems reprimiert, während Vorgänge des adaptiven Immunsystems forciert werden. Weiterhin spielt es eine essentielle Rolle bei der Differenzierung und Proliferation von T-Lymphozyten und regt B-Lymphozyten zur vermehrten Immunglobulin-Produktion an. Außerdem löst es Fieber aus und induziert die Produktion von Akute-Phase-Proteinen (Jones, 2005). Die mittels Microarray-Analysen erhobenen Daten bezüglich der mRNA-Expression für IL-6 zeigen eine relativ geringe

Expressionsstärke in den nativen B25-MOL-Zellen. In den Wirkstoffzellen ist eine relative Steigerung der Expression um den Faktor 18 nachweisbar, also eine massive Erhöhung der mRNA-Expression. Die Tendenz der relativen Expressionsänderung kann anhand der Ergebnisse der Taqman® qPCR-Analysen bestätigt werden. Der mit dieser Methode ermittelte Faktor der relativen Expressionsänderung beträgt jedoch 182,7. Sowohl die nativen B25-MOL-Zellen wie auch die Wirkstoffzellen sezernieren IL-6. Dabei ist die nachweisbare Menge im Zellkulturüberstand von Wirkstoffzellen, die 24 h inkubiert werden, nahezu doppelt so hoch als die Menge des nachweisbaren IL-6 im Zellkulturüberstand nativer B25-MOL-Zellen, die unter den gleichen Bedingungen inkubiert werden. Eine höhere IL-6-Proteinkonzentration am Vakzinierungsort verursacht die Induktion von anti-apoptotischen Regulatoren in T-Lymphozyten; es beeinflusst außerdem die Differenzierung von Monozyten, welche unter Einfluss von IL-6 eher in Makrophagen als in Dendritische Zellen differenzieren. Als negativer Effekt ist die Suppression der CCR7-Expression in Dendritischen Zellen zu beurteilen, welche durch IL-6 verursacht wird, da dadurch deren Reifung und Einwanderung in Lymphknoten erheblich beeinträchtigt wird (Jones, 2005).

Das Interleukin 8 (**IL-8**, CXCL8) fungiert als pro-inflammatorisches Zytokin, es rekrutiert neutrophile, basophile Zellen, sowie T-Lymphozyten. Andererseits besitzt IL-8 auch einige Eigenschaften, die im Zusammenhang mit der Karzinogenese als negativ betrachtet werden können. So fördert die Expression von IL-8 die Angiogenese, Tumorgenität und Entwicklung von Metastasen (Waugh et al., 2008). Eine Expression in nativen B25-MOL-Zellen auf mRNA-Ebene ist sowohl anhand der Ergebnisse der Microarray-Analysen als auch der Taqman® qPCR-Analysen nachweisbar. In den Wirkstoffzellen kann mit beiden Nachweismethoden eine erhöhte mRNA-Expression gegenüber den nativen B25-MOL-Zellen festgestellt werden. Auf Proteinebene lassen sich diese Ergebnisse allerdings nicht bestätigen; sowohl die nativen B25-MOL-Zellen als auch die Wirkstoffzellen sezernieren relativ große Mengen an IL-8, eine signifikante Steigerung der sezernierten Menge an IL-8 in den Zellkulturüberstand durch die Wirkstoffzellen ist jedoch nicht nachweisbar. Vermutlich sind posttranskriptionale Regulationsmechanismen dafür verantwortlich, dass sich die erhöhte Expression der IL-8 spezifischen mRNA nicht auf die sezernierte Proteinmenge auswirkt.

Insgesamt deuten die hier erhobenen Expressionsdaten der analysierten Zytokine und Chemokine auf ein erhöhtes Potential der Wirkstoffzellen hin, das Immunsystem zu aktivieren. Dabei können die aktivierten Immunzellen nicht nur effektiver gegen die eingebrachten körperfremden Zellen agieren, sondern auch gegen die körpereigenen Tumorzellen, vorausgesetzt sie werden von den aktivierten Immunzellen als solche erkannt. Das veränderte Expressionsprofil der hier analysierten Zytokine und Chemokine ist zwar ursprünglich nicht

intendiert, wirkt sich insgesamt jedoch weitgehend positiv auf das angestrebte Wirkprinzip der Tumorstoffvakzine aus.

### 5.3.3 Regulation der Aktivierung, Differenzierung und Proliferation von Lymphozyten

Eine Gruppe von 19 verstärkt exprimierten Genen zeigt eine Assoziation mit verschiedenen funktionellen Gengruppen, die im Zusammenhang mit der Aktivierung, Differenzierung und Proliferation von Lymphozyten stehen (Tabelle 4.5, Tabelle 4.6). Daran sind vor allem Zytokine, aber auch verschiedene Oberflächenmoleküle beteiligt, die im Folgenden näher besprochen werden.

In mehreren Studien konnte ein sehr guter immuntherapeutischer Effekt von IL-7 und GM-CSF gegen Tumorzellen gezeigt werden (Li et al., 2007; Schadendorf et al., 1995; Wittig et al., 2001). Dabei spielt das Interleukin 7 (**IL-7**) eine wichtige Rolle in der T-Lymphozyten-Entwicklung sowie deren Überleben durch Vermittlung kostimulatorischer proliferativer und anti-apoptotischer Signale (Mackall et al., 2011). Weiterhin fungiert IL-7 als Modulator bei einer durch niedrig-affine Antigene induzierten T-Lymphozyten-Proliferation (Li et al., 2007). In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass eine transiente Verabreichung von IL-7 im Rahmen einer Vakzinierung zu größeren Populationen Antigen-spezifischer Effektor-T-Lymphozyten sowie Memory-T-Lymphozyten führt. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass die Gabe von IL-7 im Zusammenhang mit einer Tumorstoffvakzinierung zu einer stärkeren Immunantwort gegen „schwache“ Tumorantigene führt (Mackall et al., 2011). Bedingt durch die Transfektion eines IL-7-kodierenden MIDGE®-DNA-Vektors ist eine deutliche Überexpression von IL-7 in den Wirkstoffzellen sowohl auf mRNA- wie auf Proteinebene nachweisbar ( $FC_{MA} = 51,1$ ).

Im Vergleich zu anderen Zytokinen zählt **GM-CSF** zu denen, die eine hoch potente lang anhaltende Reaktion gegen verschiedenste Antigene induzieren können (Abe et al., 1995; Paillard, 1998). GM-CSF stimuliert die Proliferation der Vorläuferzellen der Granulozyten und Makrophagen, beeinflusst deren Differenzierung und Reifung und stimuliert die funktionelle Aktivität von Antigen-präsentierenden Zellen. Außerdem unterstützt es die Verlagerung in Richtung einer  $T_H1$ -basierten Immunantwort (Arellano et al., 2008). Die Sezernierung von GM-CSF durch die Wirkstoffzellen stimuliert eine spezifische Anti-Tumorantwort über  $CD4^+$  und  $CD8^+$  T-Lymphozyten. Dieser Effekt wird vor allem durch dessen Eigenschaft erreicht, Dendritische Zellen zu rekrutieren und aktivieren (Chiodoni et al., 1999; Li et al., 2007). Auch die Expression von GM-CSF wird durch die Transfektion eines GM-CSF-kodierenden MIDGE®-

DNA-Vektors erreicht: die Wirkstoffzellen zeigen eine deutlich erhöhte Expression dieses Gens auf mRNA- und Proteinebene.

Wie für die Zytokine bestätigt sich ebenso die erwartete Überexpression der beiden eingebrachten kostimulatorischen Oberflächenantigene **CD154** und **CD80** auf mRNA- und Proteinebene in den Wirkstoffzellen. Eine konstitutive Expression dieser kostimulatorischen Moleküle in den nativen B25-MOL-Zellen kann nicht beobachtet werden. Durch das Einbringen eines CD80-kodierenden DNA-Vektors in eine Tumorzelle wird diese immunogener und führt zu einer potenten T-Lymphozyten-vermittelten Immunantwort gegen diese und weitere Tumorzellen, welche die gleichen Antigene über ihre MHC-Moleküle präsentieren. **CD154** (CD40L) gehört ebenfalls zu den kostimulatorischen Molekülen. Sein Rezeptor CD40, der zur Familie der TNF-Rezeptoren gehört, wird auf verschiedenen Zellen exprimiert: B-Lymphozyten, Dendritischen Zellen, Monozyten, Thrombozyten und Makrophagen (Elgueta et al., 2009). Entsprechend vielfältig sind auch die zellulären Reaktionen, die eine Bindung von CD154 an seinen Rezeptor auslöst. Das CD40-Molekül wird außerdem von den nativen B25-MOL-Zellen, wie auch den Wirkstoffzellen exprimiert. Eine Interaktion zwischen den Wirkstoffzellen über CD154 und CD40 ist damit sehr wahrscheinlich; eine infolge der Interaktion beider Moleküle stattfindende Internalisierung des Molekül-Komplexes erklärt das relativ schwache Signal des Zelloberflächennachweises der CD154-Expression auf den Wirkstoffzellen. Ebenso kann diese Interaktion für die Ausbildung von Zellaggregaten mitverantwortlich gemacht werden, welche häufig infolge des Herstellungsprozesses beobachtet werden (Zellaggregation kann auch durch die gesteigerte Expression von ICAM1 bzw. VCAM1 verursacht werden).

Die Ergebnisse der Expressionsanalysen dieser Transgene zeigt, dass gerade bei stark exprimierten Genen ein linearer Zusammenhang zwischen der mRNA-Menge und der entsprechenden Proteinmenge beobachtet werden kann. Ebenso liefern die verwendeten Methoden zur Quantifizierung der mRNA-Mengen dieser Transgene vergleichbare Ergebnisse (Abbildung 5.4, S.136). Durch die genetische Manipulation der nativen B25-MOL-Zellen mit den entsprechenden MIDGE<sup>®</sup>-DNA-Vektoren wird das primäre Ziel, die Expression dieser vier Transgene in den Wirkstoffzellen und die damit verbundene verbesserte Aktivierung des Immunsystems, erreicht.

Neben der Expression der Transgene, die eine Aktivierung, Differenzierung und Proliferation von Lymphozyten unterstützen, zeigen weitere Gene dieser funktionellen Gengruppe eine verstärkte Expression in den Wirkstoffzellen.

Der induzierbare Kostimulator ICOS (*inducible T-cell costimulator*) gehört zu den CD28 kostimulierenden Molekülen, dessen Expression erst nach Aktivierung in CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten



induziert wird. Unter physiologischen Bedingungen wird der Ligand dieses Rezeptors **ICOSLG** (*inducible T-cell costimulator ligand*) von Monozyten, aktivierten Dendritischen Zellen und B-Lymphozyten exprimiert. ICOS fungiert als ein essentieller Regulator der Aktivierung, Differenzierung und Effektorfunktion von CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten (Nurieva et al., 2003). Außerdem hat eine Kostimulation über ICOSLG-ICOS eine höhere Sensitivität von CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten gegenüber IL-2 zur Folge (Watanabe et al., 2005). Eine verstärkte Kostimulation von T-Lymphozyten durch die Wirkstoffzellen ist jedoch dennoch fraglich, da die gesteigerte mRNA-Expression ( $FC_{MA} = 3,31$ ) von ICOSLG auf Proteinebene nicht bestätigt werden kann (Abbildung 4.23; S.112).

Die beiden Adhäsionsmoleküle **ICAM-1** (*intracellular adhesion molecule 1*) und **VCAM-1** (*vascular cell adhesion molecule 1*) interagieren mit LFA-1 bzw. VLA-1 auf Effektor-T-Lymphozyten und B-Lymphozyten, sowie aktivierten Endothelzellen. Sie übernehmen eine essentielle Rolle in der Interaktion von Antigen-präsentierenden Zellen mit T-Lymphozyten bzw. B-Lymphozyten, da sie an der Ausbildung der Immunologischen Synapse beteiligt sind (Carrasco et al., 2006; Nolz et al., 2007). Die verstärkte Expression dieser beiden Adhäsionsmoleküle in den Wirkstoffzellen ( $FC_{MA}(\text{ICAM1}) = 7,94$ ;  $FC_{MA}(\text{VCAM1}) = 5,96$ ) führt zu einer vermehrten Interaktion dieser Zellen mit Lymphozyten. Dadurch werden mehr Lymphozyten potentielle Antigene präsentiert, wodurch die Wahrscheinlichkeit steigt, einen geeigneten Lymphozyten zu aktivieren.

Für **CCL5** ist eine *de novo* Expression in den Wirkstoffzellen auf Proteinebene nachweisbar. Die Sezernierung führt zu einer vermehrten von NK-Zellen, sowie CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten (Robertson, 2002; Viola et al., 2012). Wie für andere pro-inflammatorische Zytokine ist auch für CCL5 ein kostimulatorischer Effekt auf T-Lymphozyten beschrieben. Außerdem induziert CCL5 die Proliferation und Zytokin-Produktion von T-Lymphozyten mittels eines Antigen-unabhängigen Mechanismus (Wong et al., 2003). Neben diesen positiven Effekten, die CCL5 in einer Anti-Tumorantwort einnimmt, ist jedoch auch ein immunsuppressiver Effekt beschrieben. So zeigen Mellado et al. (2001) das CCL5, welches von Melanomzellen sezerniert wird, in Tumor-infiltrierenden aktivierten T-Lymphozyten eine Cytochrom C abhängige (intrinsische) Apoptose induzieren kann.

Das Interleukin 6 (**IL-6**) nimmt in der Regulation des Zellwachstum, der Differenzierung und der Proliferation von Lymphozyten eine wichtige Rolle ein und zeigt in den Wirkstoffzellen eine verstärkte Expression, sowohl auf mRNA-, wie auf Proteinebene. IL-6 induziert die Differenzierung von B-Lymphozyten in Antikörper-sezernierenden Plasmazellen, was über den Jak/Stat-Signaltransduktionsweg vermittelt wird, an dem auch p21 beteiligt ist und dort als

Mediator differenzierungs- und anti-apoptotischer Effekte dient (Hirano et al., 2000). Weiterhin induziert IL-6 anti-apoptotische Regulatoren in naiven und aktivierten T-Lymphozyten und unterbindet so eine Fas-induzierte Apoptose in diesen Zellen (Jones, 2005). Aufgrund der Beteiligung von p21 (**CDKN1A**) an der IL-6 vermittelten Signaltransduktion in den Lymphozyten gehört dieses Protein in die funktionellen Gengruppen, die mit der Aktivierung, Differenzierung und Proliferation assoziiert sind. Die hier beobachtete vermehrte Expression des kodierenden Gens von p21 in den Wirkstoffzellen steht jedoch nicht in direktem Zusammenhang mit einer verstärkten Potenz, Lymphozyten zu aktivieren oder deren Differenzierung oder Proliferation zu beeinflussen.

Eine erhöhte Expression von **Fas** steht ebenfalls in Verbindung mit der Aktivierung, Differenzierung und Proliferation von Lymphozyten. Der FasL-Fas-Signalweg spielt eine essentielle Rolle in der Homöostase des lymphatischen Systems. Durch diesen Apoptose-induzierenden Signalweg können Lymphozyten an verschiedenen Kontrollpunkten der Entwicklung eliminiert werden. Er dient aber auch dazu, aktivierte Lymphozyten im späten Stadium einer Immunantwort zu eliminieren; dabei sinkt die Konzentration von IL-2 und IL-7 im umgebenen Milieu, zwei Zytokinen, die das Überleben der Lymphozyten fördern. Die vermehrte Expression von Fas ist dabei jeweils auf den Lymphozyten zu beobachten, welche jedoch nicht Gegenstand der vorliegenden Untersuchungen sind. Es ist daher wahrscheinlich, dass die detektierte Steigerung der Expression von Fas auf den Wirkstoffzellen keine Auswirkung auf die Aktivierung, Differenzierung und Proliferation von Lymphozyten hat, sondern eher zu einer erhöhten Sensitivität dieser Zellen gegenüber einer Rezeptor-vermittelten (extrinsischen) Apoptose führt.

Histondeacetylasen wie **HDAC9** spielen eine wichtige Rolle bei der Modifizierung der Chromatinstruktur. Sie katalysieren die Deacetylierung von Lysinresten in Histonen und inhibieren damit eine Transkription der assoziierten chromosomalen DNA auf epigenetischer Ebene. Sie agieren dabei nicht autonom, sondern in Multiprotein-Komplexen, häufig zusammen mit transkriptionellen Korepressoren und sind aufgrund einer Vielzahl verschiedener möglicher Interaktionspartner an diversen biologischen Regulationsmechanismen beteiligt (Verdin et al., 2003). Weiterhin können auch verschiedene nicht-Histon-Proteine von HDAC9 deacetyliert werden. Dazu gehört der Transkriptionsfaktor Foxp3, welcher in regulatorischen T-Lymphozyten eine essentielle Rolle in deren Entwicklung und Funktion einnimmt. Die Deacetylierung von Foxp3 durch HDAC9 forciert die Polyubiquitinierung dieses Transkriptionsfaktors, was das immunsuppressive Potential regulatorischer T-Lymphozyten negativ beeinflusst (Beier et al., 2011). Dies erklärt die Einordnung dieses Gens in die funktionellen Gruppen, die mit der Entwicklung von

Lymphozyten assoziiert sind. Unklar bleibt, welche Auswirkung eine erhöhte Expression von HDAC9 in den Wirkstoffzellen hat, eventuell kommt es zur Aktivierung von Gengruppen auf bestimmten Chromosomenabschnitten, welche jedoch mit den hier durchgeführten funktionellen Analysen der Expressionsdaten nicht erfasst werden können. Auch wenn die vermehrte Expression einiger dieser Gene in den Wirkstoffzellen in keinen direkten Zusammenhang mit der Aktivierung, Differenzierung und Proliferation von Lymphozyten gebracht werden kann, spricht vor allem die Expression der eingebrachten Transgen (CD80, CD154, IL-7, GM-CSF), sowie die verstärkte Expression von Adhäsionsmolekülen (ICAM1, VCAM1), Zytokinen (CCL5, IL-6) und stimulierenden Oberflächenmolekülen (ICOSLG) für eine verbesserte Potenz der Wirkstoffzellen, Lymphozyten zu aktivieren und deren Differenzierung bzw. Proliferation zu forcieren.

#### **5.3.4 Antigen-Prozessierung und -Präsentation in den Wirkstoffzellen**

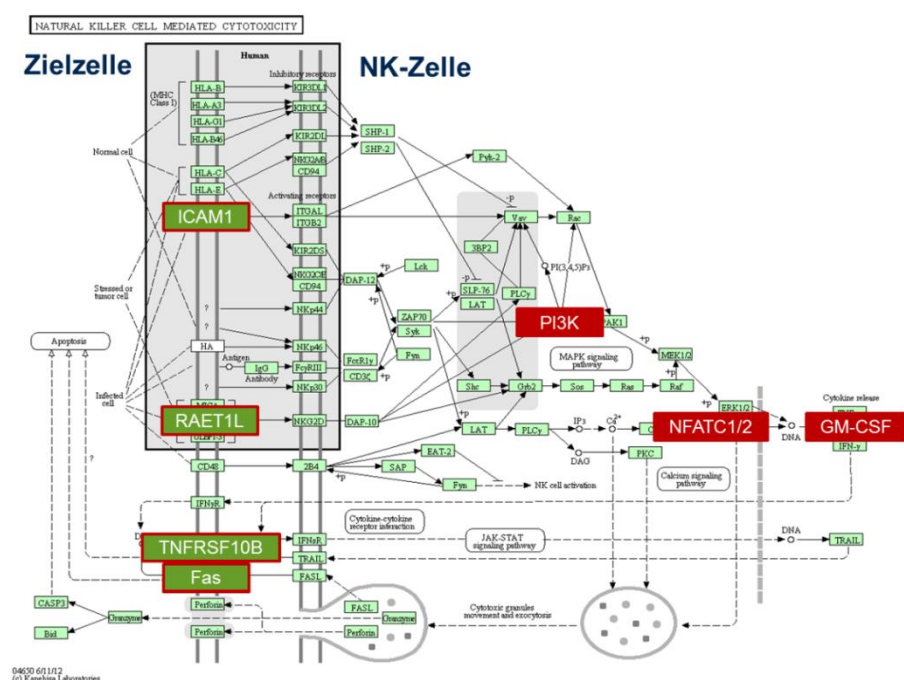
Eine überrepräsentierte funktionelle Gengruppe, die mit der Antigen-Prozessierung und Antigen-Präsentation assoziiert ist, kann anhand der Liste der differentiell exprimierten Gene nicht identifiziert werden. Die Daten der Microarray-Analyse deuten darauf hin, dass in diesem biologischen Zusammenhang keine herstellungsbedingte Genregulation stattfindet. Dagegen zeigen die Daten der Taqman® qPCR-Analyse eine verstärkte Expression der MHC-Klasse-I-Moleküle sowie von TAP1. Dieses verstärkte Expressionsniveau auf mRNA-Ebene wirkt sich jedoch nicht auf die Proteinexpression der MHC-Klasse-I-Moleküle aus. Diese ist sowohl in nativen B25-MOL-Zellen wie in den Wirkstoffzellen unverändert hoch. Dabei ist ein hohes Expressionsniveau der klassischen MHC-Klasse-I-Moleküle (HLA-A, -B und -C) von essentieller Bedeutung für das Wirkprinzip der Wirkstoffzellen. Durch die Präsentation eines Proteinfragmentes eines TAA über ein MHC-Klasse-I-Molekül zusammen mit der Expression des kostimulatorischen Moleküls CD80 können naive CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten direkt aktiviert werden. So aktivierte CD8<sup>+</sup>-Effektor-T-Lymphozyten sind in der Lage, diese und weitere Tumorzellen, die das gleiche TAA-Proteinfragment präsentieren, zu erkennen und in diesen Zellen Apoptose zu induzieren.

#### **5.3.5 Regulation der NK-Zell Immunantwort**

Eine der überrepräsentierten Kategorien der verstärkt exprimierten Gene ist mit der NK-Zell-vermittelten Zytotoxizität assoziiert (hsa04650: *Natural killer cell mediated cytotoxicity*). Kommt es zu einer verstärkten Interaktion der Wirkstoffzellen mit NK-Zellen, kann dies zu einer Lyse bzw. Apoptose der Wirkstoffzellen führen. Dies führt zu einer vermehrten

Freisetzung von Antigenen, die von Antigenpräsentierenden Zellen aufgenommen, prozessiert und mittels MHC-Molekülen zytotoxischen T-Lymphozyten präsentiert werden. Die so aktivierten  $CD8^+$  T-Lymphozyten sind dann in der Lage, andere Tumorzellen, die das gleiche Antigen präsentieren, zu erkennen und zu eliminieren.

Insgesamt sind 8 verschiedene Gene innerhalb dieses KEEG-Pathways verstärkt exprimiert (Tabelle 4.7, S. 93). An diesem Pathway ist neben einer Wirkstoffzelle, welche der Zielzelle entspricht, auch die NK-Zelle selbst beteiligt. Betrachtet man die Lokalisation der differentiell exprimierten Gene innerhalb dieses Pathways, so ist festzustellen, dass vier der Gene am Signalweg innerhalb der NK-Zelle beteiligt sind und damit für das Expressionsmuster der Zielzelle und deren Funktion als Tumorzelle keine Bedeutung haben (Abbildung 5.8).



**Abbildung 5.8 Überrepräsentierter KEEG-Pathway "natural killer cell mediated cytotoxicity"**

Interaktion zwischen NK-Zelle und Zielzellen (hier die Wirkstoffzellen). Auf Seite der Zielzelle sind vor allem Oberflächenmoleküle dargestellt, die als Liganden für die inhibitorischen und stimulierenden Rezeptoren der NK-Zellen dienen. Hervorgehoben in grün und rot umrandet sind die Moleküle, deren Gene in den Wirkstoffzellen eine verstärkte Expression zeigen. Auf Seite der NK-Zelle sind neben den Oberflächenrezeptoren ebenso an der Signaltransduktion beteiligte Moleküle dargestellt. In rot hervorgehoben sind die Moleküle, deren Gene in den Wirkstoffzellen eine verstärkte Expression zeigen, im Rahmen dieses Pathways jedoch nur in den NK-Zellen eine essentielle Rolle spielen.

Die anderen vier differentiell exprimierten Gene kodieren Oberflächenproteine, über welche die NK-Zelle mit der Zielzelle in Interaktion treten kann. So ist eine verstärkte Expression von **ICAM1** nachweisbar, ein Adhäsionsmolekül, das mit verschiedenen anderen Integrinen interagiert. Exprimiert wird ICAM-1 unter physiologischen Bedingungen auf Endothelzellen und Zellen des Immunsystems. Es dient der Translokation von Immunzellen durch das Endothel und ist außerdem an der Ausbildung der Immunologischen Synapse zwischen Immunzellen und

Zielzellen beteiligt (Griffiths et al., 2010). Weiterhin werden zwei TNF-Rezeptoren verstärkt exprimiert, **Fas** und **TNFRSF10B**: durch diese kann eine aktivierte NK-Zelle Apoptose in der Zielzelle induzieren (Caligiuri, 2008). Beide Oberflächenrezeptoren können aber auch von anderen Immunzellen genutzt werden, um Apoptose zu induzieren, sie sind demnach nicht spezifisch für eine NK-Zellinteraktion.

Dagegen stellt das Oberflächenmolekül, welches von **RAET1L** (*retionic acid early transcript 1L*) kodiert wird, einen spezifischen Liganden für den NK-Zell-spezifischen stimulierenden Rezeptor NKG2D (*NK group 2, member D*) dar. Unter physiologischen Bedingungen wird dieser und weitere NKG2D-Liganden nicht exprimiert, ihre Expression kann jedoch durch eine Virusinfektion der Zelle oder Tumorgenese induziert werden. Die nativen B25-MOL-Zellen exprimieren bereits RAET1L-spezifische mRNA ( $S_{\text{int}} = 344,98$ ), während die Wirkstoffzellen eine 5,1fach höhere Expression zeigen ( $S_{\text{int}} = 1758,34$ ). Neben den stimulierenden Rezeptoren besitzen NK-Zellen auch inhibitorische Rezeptoren, die spezifisch für MHC-Klasse-I-Moleküle sind. Um den Tötungsmechanismus der NK-Zellen zu aktivieren, müssen die stimulierenden Signale die inhibitorischen Signale überwiegen. Da das Genprodukt von RAET1L mit aktivierenden Rezeptoren auf den NK-Zellen interagiert führt eine erhöhte Oberflächenexpression zu einem stärkeren stimulatorischen Signal für die NK-Zellen.

Die verstärkt exprimierten Gene NFATC1 (nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic 1), NFATC2 (nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic 2) und PIK3R3 (phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit 3) sind an der Signaltransduktion innerhalb der NK-Zellen beteiligt (Abbildung 5.8); eine verstärkte Expression dieser Gene in den Wirkstoffzellen hat demnach keine Auswirkung auf eine potentielle NK-Zellinteraktion dieser Zellen. Ebenso verhält es sich mit der verstärkten Expression von GM-CSF durch die Wirkstoffzellen. In dem überrepräsentierten Pathway gehört das GM-CSF zu den Zytokinen, welche von den NK-Zellen nach Aktivieren sezerniert werden. Eine verstärkte Expression von GM-CSF durch die Zielzellen hat jedoch keine Auswirkung auf die NK-Zellinteraktion.

Essentiell für eine verstärkte Sensitivität der Wirkstoffzellen gegenüber NK-Zellen ist jedoch eine deutlich verminderte Expression von MHC-Klasse-I-Molekülen, wodurch die inhibitorischen Signale den stimulatorischen Signalen in den NK-Zellen unterliegen und die zytotoxische Aktivität der NK-Zelle induziert wird. Eine solche Runterregulation der MHC-Klasse-I Expression liegt jedoch weder auf mRNA-, noch auf Proteinebene vor (vgl. 5.3.4 Antigen-Prozessierung und -Präsentation in den Wirkstoffzellen). Aus diesem Grund ist nicht davon auszugehen, dass eine verstärkte NK-Zell-vermittelte Zytolyse der Wirkstoffzellen vorliegt.

### 5.3.6 Expression Tumor-assoziiertes Antigene

Bedingt durch Mutationen und epigenetischen Veränderungen unterscheiden sich Tumorzellen von physiologisch gesunden Zellen in ihrem Proteinexpressionsmuster und entsprechenden Degradationsprodukten. Das daraus resultierende veränderte Repertoire der Antigenepitope, die über die MHC-Moleküle präsentiert werden, kann durch autologe zytotoxische CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten erkannt werden, was zur spezifischen Abtötung dieser Tumorzelle führt. Zuvor ist jedoch eine Aktivierung der naiven CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten notwendig. In der Regel erfolgt diese Aktivierung über professionelle Antigen-präsentierende Zellen, wie beispielsweise den Dendritischen Zellen. Diese nehmen im peripheren Gewebe unter anderem Tumorantigene auf, prozessieren diese und wandern gleichzeitig in nahegelegene Lymphknoten ein. Dort präsentieren die ausgereiften Dendritischen Zellen die prozessierten Tumorantigene den dort vorliegenden naiven T-Lymphozyten (Shen et al., 2006). Da Dendritische Zellen nicht nur MHC-Klasse-I-Moleküle, sondern auch MHC-Klasse-II-Moleküle exprimieren, sind diese Zellen in der Lage, zusätzlich naive CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten zu aktivieren, die ihrerseits durch Interaktion von CD154 auf den CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten und CD40 auf den Dendritischen Zellen die Aktivierungskapazität für CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten verstärken (Bennett et al., 1998).

Um mit Hilfe der Wirkstoffzellen eine effektive Antitumorantwort gegen möglichst viele verschiedene Tumore zu induzieren, ist ein breites Repertoire verschiedener Tumor-assoziiertes Antigene (TAA) notwendig. Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Microarray-basierten Expressionsanalysen von 261 in der Literatur beschriebenen TAA zeigen, dass für etwa 75 % dieser TAA eine mRNA-Expression nachweisbar ist. Viele zeigen jedoch nur ein geringes Expressionsniveau. Einige wichtige TAA, die bei Nierenzellkarzinomen besonders häufig nachgewiesen werden, sollen im Folgenden näher besprochen und auf deren Expression in den Wirkstoffzellen eingegangen werden.

Unter physiologischen Bedingungen besitzt die c-Met Tyrosinkinase (**MET**) eine essentielle Bedeutung in der embryonalen Entwicklung und Geweberegeneration. Die Bindung des natürlichen Liganden HGF (*hepatocyte growth factor*) löst über eine Signalkaskade verschiedene biologische Reaktionen aus; dazu gehören Zellwachstum, Zellbeweglichkeit und Angiogenese, aber auch Schutz vor Apoptose. Eine Überexpression und Aktivierung von c-Met unter pathophysiologischen Bedingungen in Tumorzellen führt zu einer Steigerung der prävalenten metastatischen Eigenschaften der Tumorzellen. In der Literatur ist für zahlreiche Tumore verschiedenen Ursprungs eine Überexpression von c-Met beschrieben, so beispielsweise in Nierenzellkarzinomen, Tumoren des Pankreas, Lungen- und Brustkrebs u.a.

(Sierra et al., 2011). Bereits seit 2004 ist ein immunogenes Peptid des c-Met Proteins bekannt, welches über MHC-Klasse-I-Moleküle entarteter Zellen präsentiert wird (Schag et al., 2004). Die nativen B25-MOL-Zellen wie auch die Wirkstoffzellen weisen eine hohe Expression des c-Met kodierenden Gens auf. Damit ist es sehr wahrscheinlich, dass ein entsprechendes Epitop von den MHC-Molekülen der Zellen präsentiert wird. Eine Regulation der Genexpression auf mRNA-Ebene, bedingt durch den Herstellungsprozess, kann weder anhand der Ergebnisse der Microarray-Analysen noch mittels Taqman® basierter qPCR nachgewiesen werden. An der Zelloberfläche von nativen B25-MOL-Zellen und Wirkstoffzellen können mittels direkter Antikörperfärbung nur geringe Mengen des c-Met-Proteins nachgewiesen werden. Dabei zeigen die Wirkstoffzellen eine niedrigere Oberflächenexpression als die nativen B25-MOL-Zellen. Hier liegt offensichtlich eine herstellungsbedingte Reduktion der Proteinexpression vor, die jedoch posttranskriptional erfolgt, da auf mRNA-Ebene keine Expressionsänderung beobachtet werden kann. In B16-Melanomzellen beschreiben Elia et al. (2001) eine Diskrepanz zwischen der RNA- und Protein-spezifischen Expression von c-Met. Neben einer verminderten Stabilität der MET-spezifischen mRNA, die von Elia et al. beschrieben wird, wäre auch eine posttranskriptionale Regulation durch microRNA denkbar. So besitzt die MET-spezifische mRNA Bindungssequenzen verschiedener microRNA (miR-34a, miR-23b, miR-206); eine Überexpression einer dieser microRNA würde jeweils in einer verminderten Proteinexpression von c-Met resultieren (Salvi et al., 2009; Yan et al., 2009a; Yan et al., 2009b). Da sich eine geringere Proteinexpression von c-Met eher negativ auf das Wirkprinzip der Tumorstoffe auswirken würde, könnte in Folgeexperimenten versucht werden, diese zu stabilisieren bzw. zu verstärken. Sollte eine hohe Expression der oben erwähnten microRNAs vorliegen, könnte eine zusätzliche Transfektion geeigneter siRNA zu einer Stabilisierung der Proteinexpression beitragen. Eine weitere Ursache für die hier beobachtete Diskrepanz zwischen einer hohen mRNA- und einer geringeren Proteinexpression können Probleme bei der Faltung des Proteins oder dessen Transport, wie auch eine geringe Proteinestabilität sein. Im Fall der TAA muss sich diese geringe Proteinexpression jedoch nicht unbedingt negativ auf die Tumorstoffe auswirken, solange Peptidfragmente des Proteins von den MHC-Molekülen der Zellen präsentiert werden.

Durch Kinase-abhängige und Kinase-unabhängige Reaktionen aktiviert **EGFR** eine Reihe von Signalmolekülen. Dadurch werden Signalkaskaden ausgelöst, die Entwicklungs- und Differenzierungsprozesse steuern sowie das Zellwachstum, die Proliferation und die Apoptose regulieren (Han et al., 2012; Holbro et al., 2004). Außerdem ist eine Überexpression des EGFR in zahlreichen Tumoren beschrieben, so zum Beispiel in Lungenkrebs, Nierenzellkarzinomen, sowie Mamma- und Pankreaskarzinomen. Der EGFR-Signalweg zählt zu den am häufigsten

fehlregulierten molekularen Signalwegen in malignen Zellen (Han et al., 2012; Nedergaard et al., 2012; Seshacharyulu et al., 2012). Aufgrund dieser verbreiteten Expression in verschiedenen malignen Tumoren ist EGFR das Ziel zahlreicher Tumorthera­pieansätze. Neben therapeutischen Ansätzen, die auf die Inhibition von EGFR durch verschiedene Antikörper setzen, ist seit 2004 ein immunogenes T-Zellepitop bekannt, was eine weitere Möglichkeit einer gerichteten Therapie gegen maligne EGFR überexprimierende Zellen eröffnet (Shomura et al., 2004). Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Wirkstoffzellen weisen eine ebenso hohe Expression von EGFR auf, wie die nativen B25-MOL-Zellen. Der Herstellungsprozess wirkt sich demnach nicht auf die Expressionsstärke der EGFR-kodierenden mRNA aus. Damit gehören die B25-MOL-Zellen, wie auch die Wirkstoffzellen zu der großen Gruppe an Nierenkarzinomzellen, für die eine Überexpression von EGFR auf mRNA-Ebene beschrieben ist (Minner et al., 2012; Thomasson et al., 2012). Die Analyse der Proteinexpression zeigt jedoch keine Überexpression des EGFR. Sowohl die nativen B25-MOL-Zellen wie auch die Wirkstoffzellen weisen eine eher niedrige Proteinexpression an der Zelloberfläche auf. Dabei liegt der ermittelte Geomean für EGFR in den Wirkstoffzellen etwas niedriger als in den nativen B25-MOL-Zellen (vgl. Abbildung 4.24, S.113). EGFR weist entsprechend eine herstellungsbedingte leichte Reduktion der EGFR-Proteinexpression auf. Auch hier müsste zunächst geklärt werden, worauf die geringe Proteinexpression zurückzuführen ist, bevor eventuell versucht werden kann diese durch geeignete Maßnahmen zu steigern.

Im Gegensatz zu den klassischen MHC-Klasse-I-Molekülen, die auf nahezu allen Körperzellen konstitutiv exprimiert werden, ist eine physiologische Expression des nicht klassischen MHC-Klasse-I-Moleküls G (**HLA-G**) fast ausschließlich auf immunprivilegierten Zellen wie den Zytotrophoblasten der Plazenta nachgewiesen (Kovats et al., 1990). Weitere physiologische Expressionsorte neben der Plazenta sind vor allem Thymusepithelzellen und aktivierte Makrophagen (Moreau et al., 1999). Unter pathophysiologischen Bedingungen ist eine *de novo* Expression von HLA-G in zahlreichen Tumorzellen beschrieben, z.B. für Melanome, Nieren-, Lungen- und Mammakarzinome (Ibrahim et al., 2001; Lefebvre et al., 2002; Paul et al., 1998; Urosevic et al., 2001). Häufig exprimieren diese entarteten Zellen die klassischen MHC-Klasse-I-Moleküle nicht, wodurch sie zu potentiellen Zielen von natürlicher Killerzellen (NK-Zellen) werden. Diese erkennen Zellen mit einer abnorm verminderten oder fehlenden Expression von MHC-Klasse-I-Molekülen und eliminieren diese. Die Expression von HLA-G stellt einen Immun-Escape-Mechanismus dar. Es schützt die Tumorzellen vor der zytolytischen Aktivität der NK-Zellen, indem die HLA-G-Moleküle mit inhibitorischen Molekülen auf der Zelloberfläche der NK-Zellen interagieren und Anergie in den NK-Zellen induzieren (Rouas-Freiss et al., 1997). Anhand der Expressionsdaten der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Microarray-



Analysen lässt sich zunächst eine hohe Expression von HLA-G-spezifischer mRNA in nativen B25-MOL-Zellen, wie in Wirkstoffzellen nachweisen ( $S_{\text{int}}= 5585,38$ ;  $SD= 283,89$ ). Dieses hohe Expressionsniveau lässt sich durch die Daten der Taqman® qPCR-Analysen allerdings nicht bestätigen. Mit Hilfe der hier verwendeten Sonden und Primer ist weder in den nativen B25-MOL-Zellen noch in den Wirkstoffzellen eine HLA-G-spezifische mRNA-Expression nachweisbar. Die Homologie zu den anderen HLA-Klasse-I-Genen könnte die Ursache für diese Diskrepanz darstellen. Das hohe mRNA-Expressionsniveau der anderen HLA-Klasse-I-Gene führt im Verlauf des Microarray-Experimentes zu einer hohen Anzahl von markierter cDNA, die nicht nur an die Sonden auf dem GeneChip hybridisieren, die spezifisch für die cDNA klassischer HLA-Klasse-I-Gene sind, sondern auch an die Sonden, welche spezifisch für HLA-G cDNA sind, wodurch ein verzerrtes Bild der HLA-G-Expression in den analysierten Zellen entsteht. Während die HLA-G-spezifischen Sonden, die auf dem GeneChip® Human 1.0 ST (Affymetrix) immobilisiert sind, neben den HLA-G-spezifischen mRNA-Transkripten auch Transkripte anderer MHC-Klasse-I-Moleküle hybridisieren, wurden für die Taqman® qPCR-Analysen Primer/Sonden-Kombinationen gewählt, die ausschließlich HLA-G-spezifische mRNA-Transkripte hybridisieren, wodurch das Ergebnis der Taqman® qPCR-Analysen ein verlässlicheres Bild der HLA-G-Expression wiedergeben als die Microarray-Analysen. Die durch die Taqman® qPCR-Analysen belegte fehlende Expression von HLA-G in den Wirkstoffzellen kann positiv ausgelegt werden, da so durch die Wirkstoffzellen keine HLA-G-induzierte Anergie der NK-Zellen in den Patienten ausgelöst werden kann.

Eine Überexpression des ursprünglich als Hypoxie-induzierbares Protein 2 (*hypoxia-inducible protein 2*, **HIG2**) bezeichnete Protein wurde erstmals von Togashi et al. (2005) in Nierenzellkarzinomen beschrieben. Unter physiologischen Bedingungen wird es dagegen mit Ausnahme der fetalen Leber, in verschiedenen Geweben nur in marginalen Mengen exprimiert. Obwohl ursprünglich als Hypoxie-induzierbares Gen identifiziert, gehen die Meinungen bezüglich der Regulation der Expression und der Funktion auseinander. Togashi geht von einer weitgehend HIF-1 (*hypoxia-inducible factor 1*) unabhängigen Regulation der Expression aus, da bisher nahe der genomischen Sequenz des HIG2-Gens kein „*hypoxia-inducible element*“ identifiziert werden konnte. Darüber hinaus ist eine Überexpression von HIG2 in zahlreichen Nierenzellkarzinomen unabhängig von den oxidativen Bedingungen beschrieben. Die Ergebnisse der von Togashi et al. durchgeführten Experimente lassen die Schlussfolgerung zu, dass HIG2 eine autokrine Wirkung auf Nierenkarzinomzellen besitzt und eine essentielle Rolle für die Proliferationskapazität der Tumorzellen einnimmt. Dagegen beschreiben Gimm et al. (2010) HIG2 als ein direktes und spezifisches Target von HIF-1. Eine Verbindung zwischen einer durch Hypoxie induzierten Überexpression von HIG2 und der

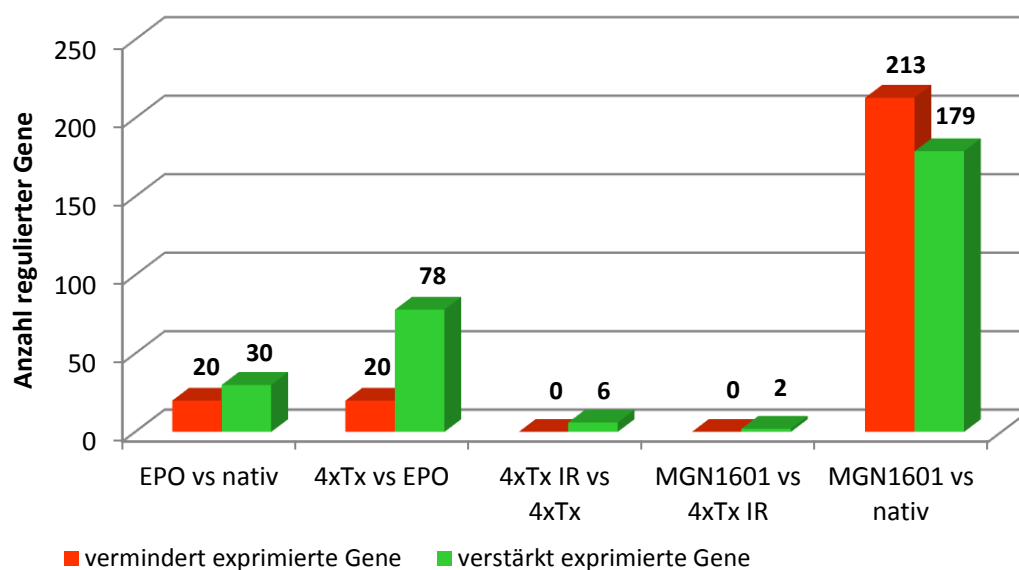
Proliferationskapazität von Tumorzellen konnte durch die Experimente dieser Arbeitsgruppe nicht nachgewiesen werden. Vielmehr wurde eine HIG2 bedingte intrazelluläre Akkumulation von Lipiden in speziellen Vesikeln (*lipid droplets*) beobachtet, welche die Tumorzellen vermutlich vor einer Lipidtoxizität schützt bzw. als Energiereserve der Tumorzellen dienen könnte (Gimm et al., 2010). Unabhängig von der Regulation der Expression bzw. der Funktion stellt HIG2 ein TAA in Nierenzellkarzinomen dar, gegen welches eine Anti-Tumorantwort induziert werden kann. Die Ergebnisse der Microarray-basierten Expressionsanalysen deuten zunächst auf eine hohe Expression in den nativen B25-MOL-Zellen und eine 3,4fach verminderte Expression in den Wirkstoffzellen hin. Allerdings bestätigen die Taqman® qPCR-Analysen die verminderte Expression in den Wirkstoffzellen nicht. Daher bleibt an dieser Stelle zunächst unklar, ob tatsächlich eine verminderte Expression von HIG2 vorliegt. Da das Expressionsniveau jedoch nicht unter die Nachweisgrenze absinkt, kann unter der Voraussetzung einer vorhandenen Proteinexpression, welche im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht untersucht wurde, eine Anti-Tumorantwort gegen Epitope dieses Antigens als wahrscheinlich angenommen werden. Körper eigene Tumorzellen, die Epitope dieses Antigens präsentieren, können demnach mit Hilfe der Wirkstoffzellen bekämpft werden.

Die Expression der beiden Gene **HSPA1A** und **HSPA1B** ist mit einer negativen Regulation der Apoptose assoziiert. Es handelt sich um Hitze-Schock-Proteine, deren Expression durch Stress induziert bzw. hochreguliert werden kann. Ihre Genprodukte gehören zur HSP70-Familie und besitzen eine zytoprotektive Wirkung; sind in der Lage, die Cytochrom C abhängige Aktivierung von Procaspase-9 zu inhibieren und unterbinden damit einen, über den intrinsischen Weg der Apoptose ausgelösten Zelltod. Darüber hinaus fungieren sie vor allem als Chaperone für neu synthetisierte, denaturierte und „fehlerhaft gefaltete“ Proteine (Atkins et al., 2005). Eine Überexpression beider Gene ist für Nierenzellkarzinome, Mammakarzinome, Bauchspeicheldrüsenkrebs und Leberkarzinome beschrieben (Atkins et al., 2005; Calderwood, 2010; Teng et al., 2010). Die Expression von HSP70 durch Tumorzellen kann immunsuppressive wie immunstimulierende Effekte haben. HSP70, welches von Tumorzellen sezerniert wird, kann von professionellen Antigenpräsentierenden Zellen aufgenommen und prozessiert werden. Die Präsentation entsprechender Epitope kann einerseits zur Induktion einer T-Lymphozyten-vermittelten Anti-Tumorantwort führen, jedoch auch zur Stimulation regulatorischer T-Lymphozyten, welche immunsuppressiv wirken und damit die Progression der Tumorzellen unterstützen (Calderwood et al., 2012). Für beide Gene ist anhand der Ergebnisse der Microarray-Analysen eine verstärkte Expression in den Wirkstoffzellen gegenüber den nativen B25-MOL-Zellen nachweisbar. HSPA1A zeigt eine 3,1fach verstärkte

Expression, während HSPA1B eine 3,7fach höhere Expression aufweist. Die Ergebnisse der Taqman® qPCR-Analysen bestätigen die Tendenz der verstärkten Expression beider Gene.

## 5.4 Einfluss der einzelnen Herstellungsschritte auf das Expressionsmuster der Wirkstoffzellen

Die Modifikation der B25-MOL-Zellen verursacht im Verlauf der Herstellung Veränderungen im Expressionsmuster der Zellen. Dazu zählen nicht nur das Einbringen der vier cDNA-Expressionskassetten, sondern auch die Effekte der Elektroporation selbst, der anschließenden Bestrahlung der Zellen, sowie des Einfrier- und Auftauprozesses. Ein Vergleich der Listen der regulierten Gene, die auf die einzelnen Prozessschritte zurückzuführen sind zeigt, dass sich die B25-MOL-Zellen und die Wirkstoffzellen in ihrem Expressionsprofil deutlicher unterscheiden, als aus der Summation der detektierbaren Veränderungen in den sequentiellen Herstellungsschritten zu erwarten ist (Abbildung 5.9).



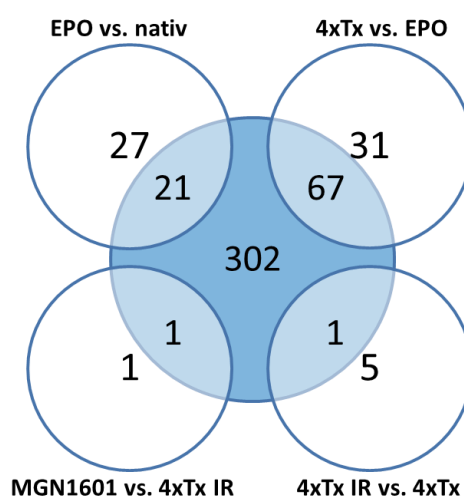
**Abbildung 5.9 Übersicht differentiell exprimierter Gene**

Zusammenfassende Darstellung der differentiell exprimierten Gene, deren veränderte Expression auf den Einfluss einzelner Herstellungsschritte zurückzuführen ist, sowie die detektierten Veränderungen des gesamten Herstellungsprozesses.

Die Summation der differentiell exprimierten Gene aus den einzelnen Herstellungsschritten führt zu einer Gesamtanzahl von 156 regulierten Genen. Demgegenüber stehen 392 differentiell exprimierte Gene, die beim Vergleich der Genexpressionslevel der Wirkstoffzellen gegenüber den nativen B25-MOL-Zellen ermittelt werden können. Ein großer Anteil der als differentiell exprimiert identifizierten Gene ist demnach nur beim Vergleich der detektierten Expressionslevel der Gene der Wirkstoffzellen mit dem der nativen B25-MOL-Zellen

nachweisbar. Daher ist zu klären, ob die 156 regulierten Gene, deren Regulation auf einzelne Herstellungsschritte zurückzuführen ist, auch nach Durchlaufen des gesamten Herstellungsprozesses gegenüber den nativen B25-MOL-Zellen als differentiell exprimiert identifiziert werden können.

Es zeigt sich, dass die differentielle Expression einiger Gene, die auf einen bestimmten Herstellungsschritt zurückzuführen sind, bei einem Vergleich der Expressionsniveaus der Wirkstoffzellen gegenüber den nativen B25-MOL-Zellen sich nicht bestätigen. Insgesamt können 302 Gene identifiziert werden, deren Genexpressionslevel nur dann eine signifikante Veränderung zeigen, wenn die Expressionslevel der Wirkstoffzellen mit denen der nativen B25-MOL-Zellen verglichen werden (Abbildung 5.10). Diese Gene weisen nur eine geringfügige Änderung ihres Expressionsniveaus von Schritt zu Schritt auf, so dass erst bei der Betrachtung der Genexpressionslevel des gesamten Herstellungsprozesses der Schwellenwert für eine differentielle Expression überschritten wird. So kann nachgewiesen werden, dass die Expression dieser Gene einer herstellungsbedingten Regulation unterliegen; jedoch ist nicht nachvollziehbar welcher Herstellungsschritt ursächlich für die Genregulation ist.



**Abbildung 5.10 Mengendiagramm differenziell exprimierter Gene**

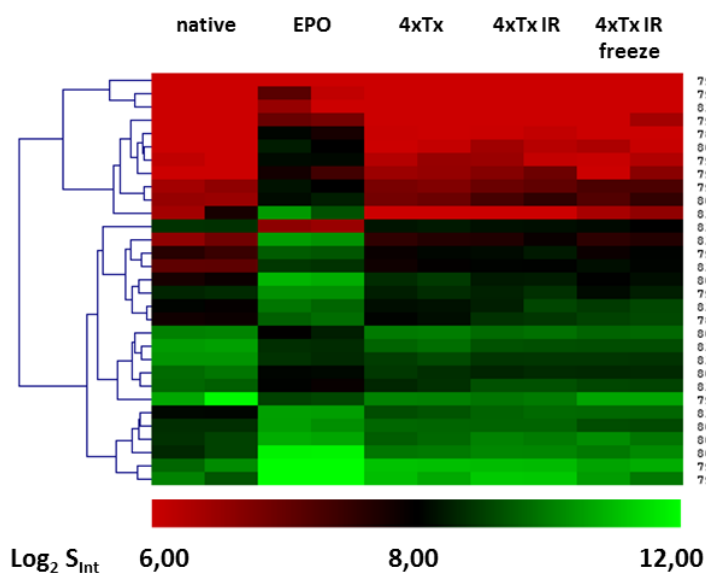
Grafische Darstellung der Anzahl der differenziell exprimierten Gene, die auf die einzelnen Herstellungsschritte (ungefüllte äußere Mengenkreise), bzw. den gesamten Herstellungsprozess zurückzuführen sind (großer gefüllter Mengenkreis, Mitte). Gene, deren differentielle Expression sowohl bei der Analyse der einzelnen Herstellungsschritte, als auch bei der Analyse des gesamten Herstellungsprozesses als differentielle exprimiert identifiziert werden, sind als Teilmenge der Liste der differentielle exprimierten Gene des gesamten Herstellungsprozesses dargestellt.

Die differentielle Expression der anderen 90 Gene kann dagegen eindeutig den verschiedenen Herstellungsschritten zugeordnet werden, da der Schwellenwert für eine signifikant differentielle Änderung der Genexpression überschritten wird, wenn man die Expressionslevel dieser Gene zwischen den verschiedenen Herstellungsschritten einander gegenüberstellt. Entsprechend zählen diese Gene zu der Gruppe von 156 Genen, die sich aus der Summation

der regulierten Gene der jeweils einzelnen Herstellungsschritte ergeben. Für die übrigen 64 Gene ist eine differentielle Expression nur beim Vergleich der Expressionslevel der einzelnen Herstellungsschritte nachweisbar, bei einer Gegenüberstellung der Expressionslevel der nativen B25-MOL-Zellen gegen die Wirkstoffzellen zeigen diese jedoch keine herstellungsbedingte Regulation.

#### 5.4.1 Einfluss der Elektroporation auf das Expressionsmuster der Zellen

Unter den 48 Genen, welche bedingt durch die Elektroporation (EPO vs. nativ) eine veränderte Expression zeigen, sind 21 Gene, die auch beim Vergleich der Expressionslevel der Gene in den Wirkstoffzellen mit denen in den nativen B25-MOL-Zellen identifiziert werden. Davon zeigen 10 Gene eine verstärkte und 11 Gene eine verminderte Expression. Für insgesamt 27 Gene, die bei der Analyse dieses Herstellungsschrittes als differentiell exprimiert identifiziert werden, kann dagegen bei der Analyse des gesamten Herstellungsprozesses keine veränderte Expression nachgewiesen werden (Abbildung 5.11). Bedingt durch die Elektroporation kommt es kurzzeitig zu einer Steigerung bzw. Verminderung der entsprechenden mRNA-Expression. Im weiteren Verlauf des Herstellungsprozesses wird jedoch wieder das ursprüngliche Expressionsniveau erreicht. Ob sich diese Genregulation auf das Expressionsmuster der Wirkstoffzellen auswirkt bleibt jedoch unklar.



**Abbildung 5.11 Heat Map. Genexpressionsprofil exemplarisch ausgewählter Gene, deren Expressionstärke durch die Elektroporation verändert wird, die jedoch beim Vergleich des Expressionsniveau der nativen gegen die Wirkstoffzellen keine Veränderung zeigen**

Die ausgewählten Gene zeigen nach der Elektroporation (EPO) eine signifikant veränderte Expression im Vergleich zu den detektierten Expressionslevel der nativen B25-MOL-Zellen (native). Dagegen unterscheiden sich die detektierten Expressionslevel der nativen B25-MOL-Zellen nicht signifikant von denen, die in den Wirkstoffzellen (4xTx IR freeze) detektiert werden.

Auf die Elektroporation kann unter anderem die verstärkte Expression von VCAM1 in den Wirkstoffzellen zurückgeführt werden. Zusammen mit der Expression von weiteren Adhäsionsmolekülen kann dies zu einer verbesserten Zell-Zell-Interaktion der Wirkstoffzellen mit Lymphozyten führen (vgl. Aktivierung, Differenzierung und Proliferation von Lymphozyten, S.88). Andererseits wirkt sich die Elektroporation eventuell negativ auf die Expression des TAA HIG2 aus, da mittels der Microarray-Analysen für dieses Gen eine verminderte Expression in den Wirkstoffzellen nachgewiesen wird (vgl. 5.3.6 Expression Tumor-assoziiertes Antigen, S.164). Eine Modifikation der Elektroporationsbedingungen würde sich jedoch massiv auf die Expressionsstärke der vier eingebrachten Transgene auswirken; da diese jedoch essentiell für das Wirkprinzip der Tumorstoffzellen sind, stellen entsprechende Folgeexperimente keine Option dar.

#### **5.4.2 Einfluss der vier MIDGE®-DNA-Vektoren auf das Expressionsmuster der Zellen**

Stellt man die Ergebnisse der Genexpressionsanalyse der elektroporierten Zellen (EPO) denen gegenüber, die mit den vier MIDGE®-Vektoren (4xTx) transfiziert wurden, fällt der Blick natürlich zunächst auf die Expression dieser vier Gene. Entsprechend der Erwartungen fallen die Expressionsniveaus für CD154, IL-7 und GM-CSF in den vierfach transfizierten Zellen deutlich höher aus als in den Zellen, die ohne Zugabe von DNA elektroporiert werden. Dagegen scheint die Expression von CD80 nur relativ geringfügig anzusteigen. Die Ursache dafür liegt in der Auswahl der CD80-spezifischen Sonden auf dem verwendeten GeneChip und wurde bereits unter „5.2.5.1 Diskrepanzen der ermittelten Expressionsniveaus der vier eingebrachten Expressionskassetten“ (S.140) diskutiert. Sekundär ist das Einbringen dieser vier Transgene ursächlich für die Regulation weiterer 94 Gene, so dass die Regulation von insgesamt 98 Genen auf das Einbringen der vier Transgene zurückzuführen ist. Etwa  $\frac{2}{3}$  der hier ursächlichen Genregulationen (67 Gene) bleiben erhalten und sind auch bei der Analyse der Wirkstoffzellen gegenüber den nativen B25-MOL-Zellen nachweisbar. Unter den anderen 31 Genen, deren Regulation in den Wirkstoffzellen nicht nachweisbar ist, kann jedoch kein Gen identifiziert werden, dessen Regulation eine deutliche Verbesserung des Expressionsmusters in Bezug auf das Wirkprinzip der Zellen hat und eine Modifikation dieses Herstellungsschrittes rechtfertigen würde. Allerdings kann die Regulation der meisten Zytokine und Chemokine auf die Transfektion der Zellen mit den vier MIDGE®-DNA-Vektoren zurückgeführt werden. Da die Expression zahlreicher Zytokine der transkriptionalen Kontrolle von NF- $\kappa$ B ((Gilmore), <http://www.bu.edu/nf-kb/gene-resources/target-genes/>) unterliegt, könnte durch das Einbringen von Vektoren die Gene kodieren, welche an den entsprechenden Signalwegen

beteiligt sind, eine weitere Steigerung der bereits vorhandenen Zytokin-Expression bzw. die Expression weiterer Zytokine in den Wirkstoffzellen erreicht werden. Ob eine solche Steigerung der Zytokin-Expression einen positiven Effekt auf die Wirkung der Tumorstoffzelle hat müsste in weiteren Versuchen geklärt werden.

### **5.4.3 Einfluss der Bestrahlung und des Einfrierprozesses auf das Expressionsmuster der Zellen**

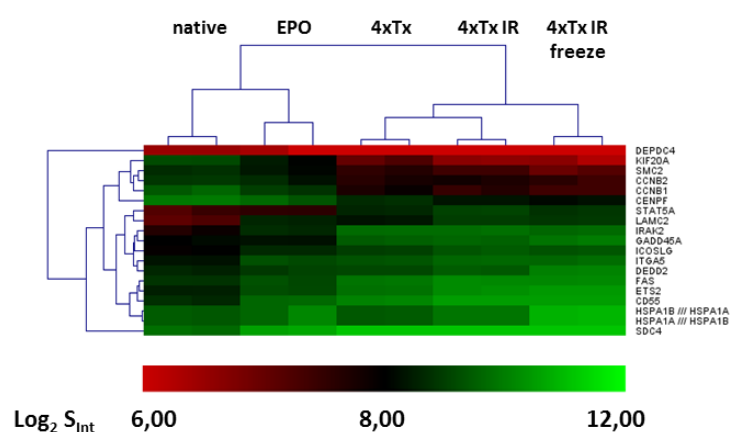
Die Bestrahlung (4xTx IR vs. 4xTx) und der Einfrierprozess (MGN1601 vs. 4xTx IR) haben nur einen geringeren Einfluss auf das Expressionsmuster der Zellen (Abbildung 5.10). So werden bedingt durch die Bestrahlung nur sechs Gene reguliert; dabei bleibt nur die gesteigerte Expression von CCR7 erhalten und ist auch bei der Gegenüberstellung der Expressionsniveaus der nativen B25-MOL-Zellen gegen die der Wirkstoffzellen nachweisbar. Die übrigen fünf Gene würden nach derzeitigem Wissensstand nicht signifikant zur Verbesserung der Wirkung der Wirkstoffzellen beitragen, weshalb auch hier eine Modifikation dieses Herstellungsschrittes nicht sinnvoll ist.

Der Einfluss des Einfrierprozesses auf das Expressionsmuster der Wirkstoffzellen fällt am geringsten aus. Insgesamt werden nur zwei Gene reguliert, HSPA6 und RNU2; dabei ist ausschließlich die gesteigerte Expression von HSPA6 auch in den Wirkstoffzellen nachweisbar, eine Regulation der Expression von RNU2 ist in den Wirkstoffzellen gegenüber den nativen B25-MOL-Zellen nicht detektierbar. Da es sich bei HSPA6 um ein durch Temperaturstress induzierbares Gen handelt, dürfte sich eine Modifikation des Einfrier- und Auftauprozesses nicht auf die gesteigerte Expression dieses Gens in den Wirkstoffzellen auswirken. Allerdings gehört dieses Gen zu keiner der für uns interessanten und hier näher analysierten funktionellen Gengruppen, eine Modifikation dieses Prozessschrittes zur weiteren Expressionssteigerung ist daher wenig sinnvoll.

## **5.5 „Schleichende“ Veränderungen des Expressionsmusters**

Im Gegensatz zu den 156 Genen, deren veränderte Expression auf einen bestimmten Herstellungsschritt zurückgeführt werden kann, stehen 302 Gene, deren differentielle Expression nur bei einer Gegenüberstellung der Genexpressionslevel mehrerer aufeinanderfolgender Herstellungsschritte bzw. der nativen B25-MOL-Zellen gegen die der Wirkstoffzellen nachweisbar ist. Bei diesen Genen verändert sich das Expressionsniveau im Verlauf des Herstellungsprozesses nur langsam, weshalb der Schwellenwert einer dreifach

differentiellen Expression nicht nach einem einzelnen Herstellungsschritt erreicht bzw. überschritten wird, sondern dies erst deutlich wird nach Durchlaufen mehrerer Herstellungsschritte bzw. des gesamten Prozesses (Abbildung 5.12). Für diese Gene kann nicht eindeutig nachvollzogen werden, durch welchen Herstellungsschritt ihre Expressionsstärke beeinflusst wird. Allerdings kann durch dieses Phänomen erklärt werden, warum die Anzahl der differentiell exprimierten Gene bei der Analyse des gesamten Herstellungsprozesses so viel größer ist, als sich aus der Summation der differentiell exprimierten Gene der einzelnen Herstellungsschritte ergeben.



**Abbildung 5.12 Heat Map der Genexpressionslevel von Genen, deren Expressionsniveau sich im Verlauf der Herstellung nur langsam verändern (20 exemplarisch ausgewählte Gene)**

Insgesamt 302 Gene zeigen im Verlauf der Herstellung eine langsame Veränderung der Genexpression. Daher wird der Schwellenwert für eine signifikant differentielle Expression (dreifach veränderte Genexpression) nicht nach einem einzelnen Herstellungsschritt nachweisbar, sondern nur wenn die Genexpressionslevel mehrerer aufeinanderfolgender Schritte bzw. die der nativen MOL-B25 Zellen und die der Wirkstoffzellen einander gegenübergestellt werden.



## 5.6 Schlussfolgerungen

Im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit wurden Genexpressionsanalysen nativer B25-MOL-Zellen und Wirkstoffzellen durchgeführt und deren Expressionsprofile miteinander verglichen. Bereits die nativen B25-MOL-Zellen, welche das Ausgangsmaterial für die Herstellung der zellbasierten Tumorstoffzellen darstellen, eignen sich aufgrund ihrer Eigenschaften besonders für die Verwendung als allogene Tumorstoffzellen. So weisen die B25-MOL-Zellen eine konstant hohe Oberflächenexpression von MHC-Klasse-I-Molekülen auf. Dagegen wird häufig eine verminderte oder fehlende Expression von MHC-Klasse-I-Molekülen in Tumorzellen beobachtet; ein Escape-Mechanismus durch den die Tumorzellen einer Erkennung und Eliminierung durch T-Lymphozyten entgehen. Dies macht sie zwar gleichzeitig sensitiv gegenüber einer Diskriminierung durch NK-Zellen; durch eine gleichzeitige Expression des nicht-klassischen MHC-Moleküls HLA-G, die häufig auf Nierenkarzinomzellen beobachtet wird, sind solche Tumorzellen jedoch resistent gegen eine T-Lymphozyten- oder NK-Zell-vermittelten Toxizität. Eine HLA-G-Expression kann auf den B25-MOL-Zellen aber nicht festgestellt werden. Außerdem exprimieren die nativen B25-MOL-Zellen ein großes Repertoire TAA (vgl. 4.5.2.3 Gengruppe Tumor-assoziiertes Antigen (TAA), S.97). Durch das resultierende breite Spektrum von Peptidfragmenten, die über MHC-Moleküle präsentiert werden können, steigt die Wahrscheinlichkeit, dass CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten diesen MHC::Peptid-Komplex erkennen. Jedoch ist für eine direkte und effektive Aktivierung von CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten neben dem ersten Aktivierungssignal über den TCR ein zweites Signal notwendig, welches über die Interaktion eines kostimulatorischen Moleküls mit CD28 auf den T-Lymphozyten vermittelt wird, welches jedoch von den nativen B25-MOL-Zellen nicht gestellt werden kann.

Durch die gentechnische Manipulation im Verlauf des Herstellungsprozesses kommt es zu einer weiteren Verbesserung der Eigenschaften der Wirkstoffzellen. Durch die intendierte Expression des kostimulatorischen Moleküls CD80 sind die Wirkstoffzellen in der Lage gegenüber den CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten neben dem primären auch das sekundäre Signal für eine direkte und effektive Aktivierung der CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten zu stellen. Die Expression von CD154 ermöglicht den Wirkstoffzellen mit verschiedenen Zellen des Immunsystems zu interagieren (z. B. B-Lymphozyten, Monozyten, Makrophagen). Die CD154-CD40 Interaktion fördert in B-Lymphozyten deren Proliferation, Differenzierung und Immunglobulin-Produktion und wirkt sich außerdem positiv auf die Expression weiterer kostimulatorischer Moleküle aus. Monozyten und Makrophagen werden nach CD154-CD40 Interaktion zur Produktion von immunstimulatorischen Zytokinen angeregt; außerdem kommt es zu einer Steigerung der Expression weiterer kostimulatorischer Moleküle. Das von den Wirkstoffzellen sezernierte IL-7

fördert einerseits die Proliferation von T-Lymphozyten und führt gleichzeitig zu einer erhöhten Sezernierung weiterer Zytokine durch T-Lymphozyten. Die Sezernierung von GM-CSF durch die Wirkstoffzellen fördert die Differenzierung und Reifung hämatopoetischer Zellen und beeinflusst deren funktionelle Aktivität. Dies fördert eine Anti-Tumorantwort, die über CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten und CD4<sup>+</sup> T<sub>H</sub>1-Lymphozyten vermittelt wird (vgl. 1.2.1 MGN1601 Wirkmechanismus, S.7).

Neben der Expression der vier eingebrachten Transgene (CD80, CD154, IL-7, GM-CSF) zeigen eine Vielzahl von Genen eine veränderte Expression in den Wirkstoffzellen. So ist herstellungsbedingt eine verminderte Expression von über 130 Zellzyklus-assoziierten Genen und eine verstärkte Expression von 28 Apoptose-assoziierten Genen festzustellen, was insgesamt zu einem gehäuften Auftreten von Zellzyklusarrest führt und eine erhöhte Sensitivität gegenüber Stress-induzierter Apoptose forciert (vgl. 5.3.1 Regulation des Zellzyklus und der Apoptose, S.144); eine durchaus willkommene Veränderung der Wirkstoffzellen, welche eine Proliferation der Zellen im Patienten verhindert und das beobachtete Absterben der Wirkstoffzellen *in vitro* innerhalb von Stunden bis wenigen Tagen erklärt. Die nachweisbar gesteigerte Expression von CCL5, CCL20, IP-10 und IL-6 wirkt sich positiv auf das angestrebte Wirkprinzip aus. Bedingt durch die Sezernierung dieser Zytokine werden Immunzellen (APC, NK-Zellen und T-Lymphozyten) zum Vakzinierungsort gelockt und deren Proliferation und Differenzierung forciert (vgl. 5.3.2 Pro- und anti-inflammatorische Wirkung von Zytokinen und Chemokinen, S.153). Außerdem weisen einige Adhäsionsmoleküle (ICAM1; VCAM1) eine verstärkte Expression in Wirkstoffzellen auf, wodurch diese besser mit T-Lymphozyten in Interaktion treten können (vgl. 5.3.3 Regulation der Aktivierung, Differenzierung und Proliferation von Lymphozyten, S.157). Die Oberflächenexpression der MHC-Klasse-I-Moleküle wird durch den Herstellungsprozess nicht beeinflusst, sie bleibt auch in Wirkstoffzellen auf einem konstant hohen Niveau, während eine Expression des nicht-klassischen MHC-Klasse-I-Moleküls HLA-G nicht beobachtet wird. Da eine Erkennung der Wirkstoffzellen durch NK-Zellen eine verminderte Expression der MHC-Moleküle voraussetzt, kann eine direkte Eliminierung der Wirkstoffzellen durch NK-Zellen trotz der gesteigerten Expression von Fas und TNFRSF10B ausgeschlossen werden (vgl. 5.3.5 Regulation der NK-Zell Immunantwort, S.161). Dagegen sind die Wirkstoffzellen in der Lage, Proteinfragmente endogener Antigene (auch TAA) über MHC-Klasse-I-Moleküle den TCR von CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten zu präsentieren und mit Hilfe der Kostimulation durch CD80 direkt zu aktivieren (vgl. 5.3.4 Antigen-Prozessierung und -Präsentation in den Wirkstoffzellen, S.161). Leider ist für einige TAA eine verminderte Expression in den Wirkstoffzellen zu beobachten. So liegt die Zelloberflächenexpression von c-Met und EGFR auf einem niedrigerem Expressionsniveau als auf den nativen B25-MOL-Zellen

(vgl. 4.7.1 Zelloberflächenproteine, S.109). Die TAA NDC80, CDK1, HMMR und TTK unterliegen einer starken Repression, eine spezifische mRNA-Expression dieser TAA ist in Wirkstoffzellen nicht nachweisbar, was zu einer Schwächung des angestrebten Wirkprinzips führen kann (vgl. 5.3.6 Expression Tumor-assoziiertes Antigens, S.164). Durch eine Transfektion von DNA-Vektoren, die TAA kodieren kann dieser Schwächung entgegengewirkt und die Wirkung der Tumorstoffzellen unterstützt werden. Insgesamt können bezogen auf das Expressionsprofil der Wirkstoffzellen keine Schritte innerhalb des Herstellungsprozesses identifiziert werden, die verändert werden müssten, da das angestrebte Wirkprinzip durch die nicht-intendierten herstellungsbedingten Veränderungen eher positiv als negativ beeinflusst wird.

Um die angestrebte Wirkung und die Einsatzmöglichkeiten dieser Tumorstoffzellen zu verbessern, könnten DNA-Vektoren, die Gene für weitere TAA kodieren, in die Zellen eingebracht werden. Die potentiell resultierenden Peptidfragmente können über MHC-Moleküle präsentiert und so spezifische T-Lymphozyten aktiviert werden, um eine spezifische Immunantwort gegen Tumorzellen zu induzieren, die diese TAA ebenfalls exprimieren.

## 6 Literatur

- Aamodt, R., K. Jonsdottir, S.N. Andersen, J. Bondi, G. Bukholm, and I.R. Bukholm. 2009. Differences in protein expression and gene amplification of cyclins between colon and rectal adenocarcinomas. *Gastroenterology research and practice*. 2009:285830.
- Abe, J., H. Wakimoto, Y. Yoshida, M. Aoyagi, K. Hirakawa, and H. Hamada. 1995. Antitumor effect induced by granulocyte/macrophage-colony-stimulating factor gene-modified tumor vaccination: comparison of adenovirus- and retrovirus-mediated genetic transduction. *J Cancer Res Clin Oncol*. 121:587-592.
- Alcivar, A., S. Hu, J. Tang, and X. Yang. 2003. DEDD and DEDD2 associate with caspase-8/10 and signal cell death. *Oncogene*. 22:291-297.
- Antonia, S.J., and J.D. Seigne. 2000. B7-1 gene-modified autologous tumor-cell vaccines for renal-cell carcinoma. *World J Urol*. 18:157-163.
- Arellano, M., and S. Lonial. 2008. Clinical uses of GM-CSF, a critical appraisal and update. *Biologics*. 2:13-27.
- Ashburner, M., C.A. Ball, J.A. Blake, D. Botstein, H. Butler, J.M. Cherry, A.P. Davis, K. Dolinski, S.S. Dwight, J.T. Eppig, M.A. Harris, D.P. Hill, L. Issel-Tarver, A. Kasarskis, S. Lewis, J.C. Matese, J.E. Richardson, M. Ringwald, G.M. Rubin, and G. Sherlock. 2000. Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nat Genet*. 25:25-29.
- Ather, M.H., N. Masood, and T. Siddiqui. 2010. Current management of advanced and metastatic renal cell carcinoma. *Urology journal*. 7:1-9.
- Atkins, D., S. Ferrone, G.E. Schmahl, S. Storkel, and B. Seliger. 2004. Down-regulation of HLA class I antigen processing molecules: an immune escape mechanism of renal cell carcinoma? *J Urol*. 171:885-889.
- Atkins, D., R. Lichtenfels, and B. Seliger. 2005. Heat shock proteins in renal cell carcinomas. *Contributions to nephrology*. 148:35-56.
- Banat, G.A., O. Christ, B. Cochlovius, H.B. Pralle, and M. Zoller. 2001. Tumour-induced suppression of immune response and its correction. *Cancer Immunol Immunother*. 49:573-586.
- Beier, U.H., T. Akimova, Y. Liu, L. Wang, and W.W. Hancock. 2011. Histone/protein deacetylases control Foxp3 expression and the heat shock response of T-regulatory cells. *Curr Opin Immunol*. 23:670-678.
- Bennett, S.R., F.R. Carbone, F. Karamalis, R.A. Flavell, J.F. Miller, and W.R. Heath. 1998. Help for cytotoxic-T-cell responses is mediated by CD40 signalling. *Nature*. 393:478-480.
- Bex, A., M. Gore, P. Mulders, and C.N. Sternberg. 2012. Recent advances in the treatment of advanced renal cell carcinoma: towards multidisciplinary personalized care. *BJU international*.
- Bieche, I., S. Vacher, F. Lallemand, S. Tozlu-Kara, H. Bennani, M. Beuzelin, K. Driouch, E. Rouleau, F. Lerebours, H. Ripoche, G. Cizeron-Clairac, F. Spyrtatos, and R. Lidereau. 2011. Expression analysis of mitotic spindle checkpoint genes in breast carcinoma: role of NDC80/HEC1 in

- early breast tumorigenicity, and a two-gene signature for aneuploidy. *Molecular cancer*. 10:23.
- Boes, T. 2007. Auswirkungen der Low-Level-Analyse auf die Ergebnisse von Genexpressionsdaten der Firma Affymetrix. Medizinische Fakultät der Universität Duisburg-Essen. 91.
- Boes, T., and M. Neuhauser. 2005. Normalization for Affymetrix GeneChips. *Methods of information in medicine*. 44:414-417.
- Bolstad, B.M., R.A. Irizarry, M. Astrand, and T.P. Speed. 2003. A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on variance and bias. *Bioinformatics*. 19:185-193.
- Brouwenstijn, N., B. Gaugler, K.M. Kruse, C.W. van der Spek, A. Mulder, S. Osanto, B.J. van den Eynde, and P.I. Schrier. 1996. Renal-cell carcinoma-specific lysis by cytotoxic T-lymphocyte clones isolated from peripheral blood lymphocytes and tumor-infiltrating lymphocytes. *Int J Cancer*. 68:177-182.
- Bryant, S., and D.L. Manning. 1998. Formaldehyde gel electrophoresis of total RNA. *Methods Mol Biol*. 86:69-72.
- Bryceson, Y.T., S.C. Chiang, S. Darmanin, C. Fauriat, H. Schlums, J. Theorell, and S.M. Wood. 2011. Molecular mechanisms of natural killer cell activation. *J Innate Immun*. 3:216-226.
- Bukur, J., V. Rebmann, H. Grosse-Wilde, H. Luboldt, H. Ruebben, I. Drexler, G. Sutter, C. Huber, and B. Seliger. 2003. Functional role of human leukocyte antigen-G up-regulation in renal cell carcinoma. *Cancer Res*. 63:4107-4111.
- Cairns, P. 2010. Renal cell carcinoma. *Cancer Biomark*. 9:461-473.
- Calderwood, S.K. 2010. Heat shock proteins in breast cancer progression--a suitable case for treatment? *International journal of hyperthermia : the official journal of European Society for Hyperthermic Oncology, North American Hyperthermia Group*. 26:681-685.
- Calderwood, S.K., M.A. Stevenson, and A. Murshid. 2012. Heat shock proteins, autoimmunity, and cancer treatment. *Autoimmune diseases*. 2012:486069.
- Caligiuri, M.A. 2008. Human natural killer cells. *Blood*. 112:461-469.
- Calvo, E., A. Ravaud, and J. Bellmunt. 2013. What is the optimal therapy for patients with metastatic renal cell carcinoma who progress on an initial VEGFr-TKI? *Cancer treatment reviews*. 39:366-374.
- Carrasco, Y.R., and F.D. Batista. 2006. B-cell activation by membrane-bound antigens is facilitated by the interaction of VLA-4 with VCAM-1. *Embo J*. 25:889-899.
- Cazzalini, O., A.I. Scovassi, M. Savio, L.A. Stivala, and E. Prosperi. 2010. Multiple roles of the cell cycle inhibitor p21(CDKN1A) in the DNA damage response. *Mutat Res*. 704:12-20.
- Chen, Y., J. Chen, Y. Xiong, Q. Da, Y. Xu, X. Jiang, and H. Tang. 2006. Internalization of CD40 regulates its signal transduction in vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 345:106-117.
- Chiodoni, C., P. Paglia, A. Stoppacciaro, M. Rodolfo, M. Parenza, and M.P. Colombo. 1999. Dendritic cells infiltrating tumors cotransduced with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and CD40 ligand genes take up and present endogenous tumor-associated

- antigens, and prime naive mice for a cytotoxic T lymphocyte response. *J Exp Med*. 190:125-133.
- Corgna, E., M. Betti, G. Gatta, F. Roila, and P.H. De Mulder. 2007. Renal cancer. *Critical reviews in oncology/hematology*. 64:247-262.
- Dalman, M.R., A. Deeter, G. Nimishakavi, and Z.H. Duan. 2012. Fold change and p-value cutoffs significantly alter microarray interpretations. *BMC bioinformatics*. 13 Suppl 2:S11.
- Daniel, S., M.B. Arvelo, V.I. Patel, C.R. Longo, G. Shrikhande, T. Shukri, J. Mahiou, D.W. Sun, C. Mottley, S.T. Grey, and C. Ferran. 2004. A20 protects endothelial cells from TNF-, Fas-, and NK-mediated cell death by inhibiting caspase 8 activation. *Blood*. 104:2376-2384.
- Deshmane, S.L., S. Kremlev, S. Amini, and B.E. Sawaya. 2009. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. *J Interferon Cytokine Res*. 29:313-326.
- Dhedra, K., J.F. Huggett, S.A. Bustin, M.A. Johnson, G. Rook, and A. Zumla. 2004. Validation of housekeeping genes for normalizing RNA expression in real-time PCR. *BioTechniques*. 37:6.
- Dranoff, G., E. Jaffee, A. Lazenby, P. Golumbek, H. Levitsky, K. Brose, V. Jackson, H. Hamada, D. Pardoll, and R.C. Mulligan. 1993. Vaccination with irradiated tumor cells engineered to secrete murine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor stimulates potent, specific, and long-lasting anti-tumor immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 90:3539-3543.
- Dufour, J.H., M. Dziejman, M.T. Liu, J.H. Leung, T.E. Lane, and A.D. Luster. 2002. IFN-gamma-inducible protein 10 (IP-10; CXCL10)-deficient mice reveal a role for IP-10 in effector T cell generation and trafficking. *J Immunol*. 168:3195-3204.
- Eisen, M.B., P.T. Spellman, P.O. Brown, and D. Botstein. 1998. Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 95:14863-14868.
- Elgueta, R., M.J. Benson, V.C. de Vries, A. Wasiuk, Y. Guo, and R.J. Noelle. 2009. Molecular mechanism and function of CD40/CD40L engagement in the immune system. *Immunol Rev*. 229:152-172.
- Elia, G., Y. Ren, P. Lorenzoni, R. Zarnegar, M.M. Burger, and D. Rusciano. 2001. Mechanisms regulating c-met overexpression in liver-metastatic B16-LS9 melanoma cells. *Journal of cellular biochemistry*. 81:477-487.
- Elmore, S. 2007. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*. 35:495-516.
- Evans, R., C. Naber, T. Steffler, T. Checkland, J. Keats, C. Maxwell, T. Perry, H. Chau, A. Belch, L. Pilarski, and T. Reiman. 2008. Aurora A kinase RNAi and small molecule inhibition of Aurora kinases with VE-465 induce apoptotic death in multiple myeloma cells. *Leukemia & lymphoma*. 49:559-569.
- Finke, J.H., P. Rayman, L. Hart, J.P. Alexander, M.G. Edinger, R.R. Tubbs, E. Klein, L. Tuason, and R.M. Bukowski. 1994. Characterization of tumor-infiltrating lymphocyte subsets from human renal cell carcinoma: specific reactivity defined by cytotoxicity, interferon-gamma secretion, and proliferation. *Journal of immunotherapy with emphasis on tumor immunology : official journal of the Society for Biological Therapy*. 15:91-104.
- Finke, S., B. Trojaneck, P. Lefterova, M. Csipai, E. Wagner, R. Kircheis, A. Neubauer, D. Huhn, B. Wittig, and I.G. Schmidt-Wolf. 1998. Increase of proliferation rate and enhancement of antitumor

- cytotoxicity of expanded human CD3<sup>+</sup> CD56<sup>+</sup> immunologic effector cells by receptor-mediated transfection with the interleukin-7 gene. *Gene Ther.* 5:31-39.
- Finke, S., B. Trojaneck, P. Moller, D. Schadendorf, A. Neubauer, D. Huhn, and I.G. Schmidt-Wolf. 1997. Increase of cytotoxic sensitivity of primary human melanoma cells transfected with the interleukin-7 gene to autologous and allogeneic immunologic effector cells. *Cancer gene therapy.* 4:260-268.
- Frankenberger, B., H. Pohla, E. Noessner, G. Willimsky, B. Papier, A. Pezzutto, J. Kopp, R. Oberneder, T. Blankenstein, and D.J. Schendel. 2005. Influence of CD80, interleukin-2, and interleukin-7 expression in human renal cell carcinoma on the expansion, function, and survival of tumor-specific CTLs. *Clin Cancer Res.* 11:1733-1742.
- Fung, T.K., H.T. Ma, and R.Y. Poon. 2007. Specialized roles of the two mitotic cyclins in somatic cells: cyclin A as an activator of M phase-promoting factor. *Mol Biol Cell.* 18:1861-1873.
- Garrido, C., M. Brunet, C. Didelot, Y. Zermati, E. Schmitt, and G. Kroemer. 2006. Heat shock proteins 27 and 70: anti-apoptotic proteins with tumorigenic properties. *Cell Cycle.* 5:2592-2601.
- GeneChip Gene 1.0 ST Array System for Human, Mouse and Rat. I. Affymetrix. Data sheet. 2007
- GeneChip® Expression Analysis Technical Manual. A. Inc. Affymetrix Inc. Manual. 2009
- Gentleman, R.C., V.J. Carey, D.M. Bates, B. Bolstad, M. Dettling, S. Dudoit, B. Ellis, L. Gautier, Y. Ge, J. Gentry, K. Hornik, T. Hothorn, W. Huber, S. Iacus, R. Irizarry, F. Leisch, C. Li, M. Maechler, A.J. Rossini, G. Sawitzki, C. Smith, G. Smyth, L. Tierney, J.Y. Yang, and J. Zhang. 2004. Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biol.* 5:R80.
- NF- $\kappa$ B Target Genes. <http://www.bu.edu/nf-kb/gene-resources/target-genes/>.
- Gimm, T., M. Wiese, B. Teschemacher, A. Deggerich, J. Schodel, K.X. Knaup, T. Hackenbeck, C. Hellerbrand, K. Amann, M.S. Wiesener, S. Honing, K.U. Eckardt, and C. Warnecke. 2010. Hypoxia-inducible protein 2 is a novel lipid droplet protein and a specific target gene of hypoxia-inducible factor-1. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology.* 24:4443-4458.
- Green, J.M. 2000. The B7/CD28/CTLA4 T-cell activation pathway. Implications for inflammatory lung disease. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 22:261-264.
- Griffiths, G.M., A. Tsun, and J.C. Stinchcombe. 2010. The immunological synapse: a focal point for endocytosis and exocytosis. *J Cell Biol.* 189:399-406.
- Grünwald, V., S. Weikert, I.G.H. Schmidt-Wolf, S. Hauser, Weith E., M. Schroff, M. Schmidt, M. Tschaika, and B. Wittig. 2013. Identification of biomarkers for overall survival of patients with metastatic renal cell carcinoma treated with MGN1601. *J Clin. Oncol.* . 31.
- Guide to Performing Relative Quantification of Gene Expression Using Real-Time Quantitative PCR. A. Biosystems. Applied Biosystems Analysis Guide. 2008
- Guide to Probe Logarithmic Intensity Error (PLIER) Estimation. I. Affymetrix. Technical Note. 2001
- Hagner, N., A. Sander, J. Köck, S.A. König-Merediz, B. Wittig, and M. Schmidt. 2004. Covalently-Closed, Dumbbell-Shaped Double-Stem-Loop DNA Constructs (dSLIM) with Specific Immunomodulatory Function. *Molecular Therapy.* 9:S244-S245.

- Han, W., and H.W. Lo. 2012. Landscape of EGFR signaling network in human cancers: biology and therapeutic response in relation to receptor subcellular locations. *Cancer letters*. 318:124-134.
- Heber, S., and B. Sick. 2006. Quality assessment of Affymetrix GeneChip data. *Omics : a journal of integrative biology*. 10:358-368.
- Hieshima, K., T. Imai, G. Opdenakker, J. Van Damme, J. Kusuda, H. Tei, Y. Sakaki, K. Takatsuki, R. Miura, O. Yoshie, and H. Nomiyama. 1997. Molecular cloning of a novel human CC chemokine liver and activation-regulated chemokine (LARC) expressed in liver. Chemotactic activity for lymphocytes and gene localization on chromosome 2. *J Biol Chem*. 272:5846-5853.
- Hirano, T., K. Ishihara, and M. Hibi. 2000. Roles of STAT3 in mediating the cell growth, differentiation and survival signals relayed through the IL-6 family of cytokine receptors. *Oncogene*. 19:2548-2556.
- Hirata, H., Y. Hinoda, K. Nakajima, K. Kawamoto, N. Kikuno, K. Ueno, S. Yamamura, M.S. Zaman, G. Khatri, Y. Chen, S. Saini, S. Majid, G. Deng, N. Ishii, and R. Dahiya. 2011. Wnt antagonist DKK1 acts as a tumor suppressor gene that induces apoptosis and inhibits proliferation in human renal cell carcinoma. *Int J Cancer*. 128:1793-1803.
- Holbro, T., and N.E. Hynes. 2004. ErbB receptors: directing key signaling networks throughout life. *Annual review of pharmacology and toxicology*. 44:195-217.
- Huang da, W., B.T. Sherman, and R.A. Lempicki. 2009a. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nature protocols*. 4:44-57.
- Huang da, W., B.T. Sherman, X. Zheng, J. Yang, T. Imamichi, R. Stephens, and R.A. Lempicki. 2009b. Extracting biological meaning from large gene lists with DAVID. *Current protocols in bioinformatics / editorial board, Andreas D. Baxevanis ... [et al.]*. Chapter 13:Unit 13 11.
- Human Basic Kit FlowCytomix. B.M. GmbH. Product information and manual. 2011
- Hummel, M.B. 2009. Strategien für die Expressionsanalyse infunktionellen Gengruppen. *Dissertation (Humanbiologie)*:171.
- Ibrahim, E.C., N. Guerra, M.J. Lacombe, E. Angevin, S. Chouaib, E.D. Carosella, A. Caignard, and P. Paul. 2001. Tumor-specific up-regulation of the nonclassical class I HLA-G antigen expression in renal carcinoma. *Cancer Res*. 61:6838-6845.
- Igney, F.H., and P.H. Krammer. 2002. Immune escape of tumors: apoptosis resistance and tumor counterattack. *J Leukoc Biol*. 71:907-920.
- Irizarry, R.A., B.M. Bolstad, F. Collin, L.M. Cope, B. Hobbs, and T.P. Speed. 2003a. Summaries of Affymetrix GeneChip probe level data. *Nucleic acids research*. 31:e15.
- Irizarry, R.A., B. Hobbs, F. Collin, Y.D. Beazer-Barclay, K.J. Antonellis, U. Scherf, and T.P. Speed. 2003b. Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics*. 4:249-264.
- Irizarry, R.A., Z. Wu, and H.A. Jaffee. 2006. Comparison of Affymetrix GeneChip expression measures. *Bioinformatics*. 22:789-794.
- Janeway, C.A., P. Travers, M. Walport, and M. Shlomchik. 2002. Immunologie.



- Jauhainen, A., C. Thomsen, L. Strombom, P. Grundevik, C. Andersson, A. Danielsson, M.K. Andersson, O. Nerman, L. Rorkvist, A. Stahlberg, and P. Aman. 2012. Distinct cytoplasmic and nuclear functions of the stress induced protein DDIT3/CHOP/GADD153. *PLoS One*. 7:e33208.
- Jin, Z., and W.S. El-Deiry. 2005. Overview of cell death signaling pathways. *Cancer Biol Ther*. 4:139-163.
- Joki, T., T. Kikuchi, Y. Akasaki, S. Saitoh, T. Abe, and T. Ohno. 1999. Induction of effective antitumor immunity in a mouse brain tumor model using B7-1 (CD80) and intercellular adhesive molecule 1 (ICAM-1; CD54) transfection and recombinant interleukin 12. *Int J Cancer*. 82:714-720.
- Jones, S.A. 2005. Directing transition from innate to acquired immunity: defining a role for IL-6. *J Immunol*. 175:3463-3468.
- Jung, D., C. Hilmes, A. Knuth, E. Jaeger, C. Huber, and B. Seliger. 1999. Gene transfer of the Co-stimulatory molecules B7-1 and B7-2 enhances the immunogenicity of human renal cell carcinoma to a different extent. *Scand J Immunol*. 50:242-249.
- Karess, R. 2005. Rod-Zw10-Zwilch: a key player in the spindle checkpoint. *Trends Cell Biol*. 15:386-392.
- Kim, H., M. Rafiuddin-Shah, H.C. Tu, J.R. Jeffers, G.P. Zambetti, J.J. Hsieh, and E.H. Cheng. 2006a. Hierarchical regulation of mitochondrion-dependent apoptosis by BCL-2 subfamilies. *Nat Cell Biol*. 8:1348-1358.
- Kim, H.E., X. Jiang, F. Du, and X. Wang. 2008. PHAPI, CAS, and Hsp70 promote apoptosome formation by preventing Apaf-1 aggregation and enhancing nucleotide exchange on Apaf-1. *Mol Cell*. 30:239-247.
- Kim, R., M. Emi, and K. Tanabe. 2006b. Role of mitochondria as the gardens of cell death. *Cancer chemotherapy and pharmacology*. 57:545-553.
- Kim, S., G.P. Haas, and G.G. Hillman. 1996. Development of immunotherapy for the treatment of malignancies refractory to conventional therapies. *Cytokines and molecular therapy*. 2:13-19.
- Klünder, K., and M. Kleine. 2008. Expression von Oberflächenproteinen in Säugerzellen - Molekulare Untersuchung zu der Expression von CD80 und CD154. *Bachelorarbeit*:75.
- Knäblein, J., and R.H. Müller. 2005. MIDGE Vectors and dSLIM Immunomodulators: DNA-based Molecules for Gene Therapeutic Strategies. *In Modern Biopharmaceuticals*. Wiley-VCH. 30.
- Kochling, J., J. Prada, M. Bahrami, R. Stripecke, K. Seeger, G. Henze, B. Wittig, and M. Schmidt. 2008. Anti-tumor effect of DNA-based vaccination and dSLIM immunomodulatory molecules in mice with Ph+ acute lymphoblastic leukaemia. *Vaccine*. 26:4669-4675.
- Kodama, T., T. Takehara, H. Hikita, S. Shimizu, M. Shigekawa, W. Li, T. Miyagi, A. Hosui, T. Tatsumi, H. Ishida, T. Kanto, N. Hiramatsu, X.M. Yin, and N. Hayashi. 2011. BH3-only activator proteins Bid and Bim are dispensable for Bak/Bax-dependent thrombocyte apoptosis induced by Bcl-xL deficiency: molecular requisites for the mitochondrial pathway to apoptosis in platelets. *J Biol Chem*. 286:13905-13913.
- Kovats, S., E.K. Main, C. Librach, M. Stubblebine, S.J. Fisher, and R. DeMars. 1990. A class I antigen, HLA-G, expressed in human trophoblasts. *Science*. 248:220-223.

- Kronfeld, K., H. Abken, and B. Seliger. 2005. B7-1 and B7-2 act differentially in the induction of a T cell response: their impact for a HLA-matched and HLA-mismatched anti-tumor immunotherapy. *Int J Cancer*. 117:794-799.
- Krüger, T.H.A. 2007. HLA-Ligandom-, Genexpressions- und T-Zell-Analysen zur Identifizierung tumorassoziierter Peptide des Nierenzellkarzinoms und der Akuten Myeloischen Leukämie 247.
- Kucharczak, J., M.J. Simmons, Y. Fan, and C. Gelinas. 2003. To be, or not to be: NF-kappaB is the answer-role of Rel/NF-kappaB in the regulation of apoptosis. *Oncogene*. 22:8961-8982.
- Lee, J.H., Y.A. Koh, C.K. Cho, S.J. Lee, Y.S. Lee, and S. Bae. 2005. Identification of a novel ionizing radiation-induced nuclease, AEN, and its functional characterization in apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun*. 337:39-47.
- Lee, M.J., S.H. Choi, Y.H. Shim, S.H. Cho, and C.W. Kim. 2001. Tumor removal enhances immunity induced by B7.1. *Pathobiology : journal of immunopathology, molecular and cellular biology*. 69:281-288.
- Lefebvre, S., M. Antoine, S. Uzan, M. McMaster, J. Dausset, E.D. Carosella, and P. Paul. 2002. Specific activation of the non-classical class I histocompatibility HLA-G antigen and expression of the ILT2 inhibitory receptor in human breast cancer. *J Pathol*. 196:266-274.
- Li, B., M.J. VanRoey, and K. Jooss. 2007. Recombinant IL-7 enhances the potency of GM-CSF-secreting tumor cell immunotherapy. *Clin Immunol*. 123:155-165.
- Li, C., and W.H. Wong. 2001. Model-based analysis of oligonucleotide arrays: expression index computation and outlier detection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 98:31-36.
- Liu, S., W.R. Bishop, and M. Liu. 2003. Differential effects of cell cycle regulatory protein p21(WAF1/Cip1) on apoptosis and sensitivity to cancer chemotherapy. *Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy*. 6:183-195.
- Ljungberg, B., S.C. Campbell, H.Y. Choi, D. Jacqmin, J.E. Lee, S. Weikert, and L.A. Kiemeny. 2011. The epidemiology of renal cell carcinoma. *Eur Urol*. 60:615-621.
- Mackall, C.L., T.J. Fry, and R.E. Gress. 2011. Harnessing the biology of IL-7 for therapeutic application. *Nat Rev Immunol*. 11:330-342.
- MACS® Technology Gold standard in cell separation. M.B. GmbH. Miltenyi Biotec Information.
- Martinez-Lostao, L., I. Marzo, A. Anel, and J. Naval. 2012. Targeting the Apo2L/TRAIL system for the therapy of autoimmune diseases and cancer. *Biochem Pharmacol*. 83:1475-1483.
- Mellado, M., A.M. de Ana, M.C. Moreno, C. Martinez, and J.M. Rodriguez-Frade. 2001. A potential immune escape mechanism by melanoma cells through the activation of chemokine-induced T cell death. *Curr Biol*. 11:691-696.
- Mills, J.C., and J.I. Gordon. 2001. A new approach for filtering noise from high-density oligonucleotide microarray datasets. *Nucleic acids research*. 29:E72-72.
- Miltenyi, S., W. Muller, W. Weichel, and A. Radbruch. 1990. High gradient magnetic cell separation with MACS. *Cytometry*. 11:231-238.

- Minner, S., D. Rump, P. Tennstedt, R. Simon, E. Burandt, L. Terracciano, H. Moch, W. Wilczak, C. Bokemeyer, M. Fisch, G. Sauter, and C. Eichelberg. 2012. Epidermal growth factor receptor protein expression and genomic alterations in renal cell carcinoma. *Cancer*. 118:1268-1275.
- Moreau, P., F. Adrian-Cabestre, C. Menier, V. Guiard, L. Gourand, J. Dausset, E.D. Carosella, and P. Paul. 1999. IL-10 selectively induces HLA-G expression in human trophoblasts and monocytes. *Int Immunol*. 11:803-811.
- Moretta, A., C. Bottino, M. Vitale, D. Pende, C. Cantoni, M.C. Mingari, R. Biassoni, and L. Moretta. 2001. Activating receptors and coreceptors involved in human natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Annu Rev Immunol*. 19:197-223.
- Motzer, R.J., N.H. Bander, and D.M. Nanus. 1996. Renal-cell carcinoma. *The New England journal of medicine*. 335:865-875.
- Nedergaard, M.K., C.J. Hedegaard, and H.S. Poulsen. 2012. Targeting the epidermal growth factor receptor in solid tumor malignancies. *BioDrugs : clinical immunotherapeutics, biopharmaceuticals and gene therapy*. 26:83-99.
- Negrier, S., and E. Raymond. 2012. Antiangiogenic treatments and mechanisms of action in renal cell carcinoma. *Investigational new drugs*. 30:1791-1801.
- Neville, L.F., G. Mathiak, and O. Bagasra. 1997. The immunobiology of interferon-gamma inducible protein 10 kD (IP-10): a novel, pleiotropic member of the C-X-C chemokine superfamily. *Cytokine & Growth Factor Reviews*. 8:207-219.
- Nikonova, A.S., I. Astsaturov, I.G. Serebriiskii, R.L. Dunbrack, Jr., and E.A. Golemis. 2012. Aurora A kinase (AURKA) in normal and pathological cell division. *Cell Mol Life Sci*.
- Nolz, J.C., R.B. Medeiros, J.S. Mitchell, P. Zhu, B.D. Freedman, Y. Shimizu, and D.D. Billadeau. 2007. WAVE2 regulates high-affinity integrin binding by recruiting vinculin and talin to the immunological synapse. *Mol Cell Biol*. 27:5986-6000.
- Novellino, L., C. Castelli, and G. Parmiani. 2005. A listing of human tumor antigens recognized by T cells: March 2004 update. *Cancer Immunol Immunother*. 54:187-207.
- Nurieva, R.I., X.M. Mai, K. Forbush, M.J. Bevan, and C. Dong. 2003. B7h is required for T cell activation, differentiation, and effector function. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100:14163-14168.
- Ogata, H., S. Goto, W. Fujibuchi, and M. Kanehisa. 1998. Computation with the KEGG pathway database. *Bio Systems*. 47:119-128.
- Otera, H., and K. Mihara. 2012. Mitochondrial dynamics: functional link with apoptosis. *International journal of cell biology*. 2012:821676.
- Pagano, M., R. Pepperkok, F. Verde, W. Ansorge, and G. Draetta. 1992. Cyclin A is required at two points in the human cell cycle. *Embo J*. 11:961-971.
- Paillard, F. 1998. The search for the "best" cytokine to induce antitumor immunity. *Hum Gene Ther*. 9:2457-2458.
- Patel, C., A. Ahmed, and P. Ellsworth. 2012. Renal cell carcinoma: a reappraisal. *Urologic nursing*. 32:182-190; quiz 191.

- Paul, P., N. Rouas-Freiss, I. Khalil-Daher, P. Moreau, B. Riteau, F.A. Le Gal, M.F. Avril, J. Dausset, J.G. Guillet, and E.D. Carosella. 1998. HLA-G expression in melanoma: a way for tumor cells to escape from immunosurveillance. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95:4510-4515.
- Pfaffenroth, E.C., and W.M. Linehan. 2008. Genetic basis for kidney cancer: opportunity for disease-specific approaches to therapy. *Expert opinion on biological therapy.* 8:779-790.
- Plati, J., O. Bucur, and R. Khosravi-Far. 2011. Apoptotic cell signaling in cancer progression and therapy. *Integrative biology : quantitative biosciences from nano to macro.* 3:279-296.
- Provenzano, M., and S. Mocellin. 2007. Complementary techniques: validation of gene expression data by quantitative real time PCR. *Adv Exp Med Biol.* 593:66-73.
- Purdy, A.K., and K.S. Campbell. 2009. Natural killer cells and cancer: regulation by the killer cell Ig-like receptors (KIR). *Cancer Biol Ther.* 8:2211-2220.
- Qin, L.X., R.P. Beyer, F.N. Hudson, N.J. Linford, D.E. Morris, and K.F. Kerr. 2006. Evaluation of methods for oligonucleotide array data via quantitative real-time PCR. *BMC bioinformatics.* 7:23.
- Rini, B.I., W.M. Stadler, R.T. Spielberger, M.J. Ratain, and N.J. Vogelzang. 1998. Granulocyte-macrophage-colony stimulating factor in metastatic renal cell carcinoma: a phase II trial. *Cancer.* 82:1352-1358.
- Robertson, M.J. 2002. Role of chemokines in the biology of natural killer cells. *J Leukoc Biol.* 71:173-183.
- Roth, W., F. Stenner-Liewen, K. Pawlowski, A. Godzik, and J.C. Reed. 2002. Identification and characterization of DEDD2, a death effector domain-containing protein. *J Biol Chem.* 277:7501-7508.
- Rouas-Freiss, N., R.E. Marchal, M. Kirszenbaum, J. Dausset, and E.D. Carosella. 1997. The alpha1 domain of HLA-G1 and HLA-G2 inhibits cytotoxicity induced by natural killer cells: is HLA-G the public ligand for natural killer cell inhibitory receptors? *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94:5249-5254.
- Russell, S., L.A. Meadows, and R.R. Russell. 2009. *Microarray technology in practice.* Elsevier, Amsterdam u.a. X, 449 S. pp.
- Saeed, A.I., V. Sharov, J. White, J. Li, W. Liang, N. Bhagabati, J. Braisted, M. Klapa, T. Currier, M. Thiagarajan, A. Sturn, M. Snuffin, A. Rezantsev, D. Popov, A. Ryltsov, E. Kostukovich, I. Borisovsky, Z. Liu, A. Vinsavich, V. Trush, and J. Quackenbush. 2003. TM4: a free, open-source system for microarray data management and analysis. *BioTechniques.* 34:374-378.
- Salaun, P., Y. Rannou, and C. Prigent. 2008. Cdk1, Plks, Auroras, and Neks: the mitotic bodyguards. *Adv Exp Med Biol.* 617:41-56.
- Salvi, A., C. Sabelli, S. Moncini, M. Venturin, B. Arici, P. Riva, N. Portolani, S.M. Giulini, G. De Petro, and S. Barlati. 2009. MicroRNA-23b mediates urokinase and c-met downmodulation and a decreased migration of human hepatocellular carcinoma cells. *The FEBS journal.* 276:2966-2982.
- Sanges, R., F. Cordero, and R.A. Calogero. 2007. oneChannelGUI: a graphical interface to Bioconductor tools, designed for life scientists who are not familiar with R language. *Bioinformatics.* 23:3406-3408.
- Sardar, H.S., and S.P. Gilbert. 2012. Microtubule capture by mitotic kinesin centromere protein E (CENP-E). *J Biol Chem.* 287:24894-24904.

- Schadendorf, D., B.M. Czarnetzki, and B. Wittig. 1995. Interleukin-7, interleukin-12, and GM-CSF gene transfer in patients with metastatic melanoma. *J Mol Med (Berl)*. 73:473-477.
- Schag, K., S.M. Schmidt, M.R. Muller, T. Weinschenk, S. Appel, M.M. Weck, F. Grunebach, S. Stevanovic, H.G. Rammensee, and P. Brossart. 2004. Identification of C-met oncogene as a broadly expressed tumor-associated antigen recognized by cytotoxic T-lymphocytes. *Clin Cancer Res*. 10:3658-3666.
- Schakowski, F., M. Gorschluter, C. Junghans, M. Schroff, P. Buttgereit, C. Ziske, B. Schottker, S.A. Konig-Merediz, T. Sauerbruch, B. Wittig, and I.G. Schmidt-Wolf. 2001. A novel minimal-size vector (MIDGE) improves transgene expression in colon carcinoma cells and avoids transfection of undesired DNA. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*. 3:793-800.
- Schmid, H., C.D. Cohen, A. Henger, S. Irrgang, D. Schlondorff, and M. Kretzler. 2003. Validation of endogenous controls for gene expression analysis in microdissected human renal biopsies. *Kidney international*. 64:356-360.
- Schmidt, M., K. Anton, C. Nordhaus, C. Junghans, B. Wittig, and M. Worm. 2006. Cytokine and Ig-production by CG-containing sequences with phosphodiester backbone and dumbbell-shape. *Allergy*. 61:56-63.
- Schmittgen, T.D., and K.J. Livak. 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature protocols*. 3:1101-1108.
- Scholtens, D., and A. Heydebreck. 2005. Analysis of differential gene expression studies. In *Bioinformatics and Computational Biology Solutions using R and Bioconductor*. Springer, New York. 229-248.
- Seliger, B. 2005. Strategies of tumor immune evasion. *BioDrugs : clinical immunotherapeutics, biopharmaceuticals and gene therapy*. 19:347-354.
- Seliger, B., J. Beck, and C. Huber. 2001. Molekularbiologie und Immunologie des Nierenzellkarzinoms. *Der Onkologe*. 7:8.
- Seliger, B., M.J. Maeurer, and S. Ferrone. 2000. Antigen-processing machinery breakdown and tumor growth. *Immunology today*. 21:455-464.
- Seshacharyulu, P., M.P. Ponnusamy, D. Haridas, M. Jain, A.K. Ganti, and S.K. Batra. 2012. Targeting the EGFR signaling pathway in cancer therapy. *Expert opinion on therapeutic targets*. 16:15-31.
- Shen, L., and K.L. Rock. 2006. Priming of T cells by exogenous antigen cross-presented on MHC class I molecules. *Curr Opin Immunol*. 18:85-91.
- Sherman, B.T., W. Huang da, Q. Tan, Y. Guo, S. Bour, D. Liu, R. Stephens, M.W. Baseler, H.C. Lane, and R.A. Lempicki. 2007a. DAVID Knowledgebase: a gene-centered database integrating heterogeneous gene annotation resources to facilitate high-throughput gene functional analysis. *BMC bioinformatics*. 8:426.
- Sherman, M., and G. Multhoff. 2007b. Heat shock proteins in cancer. *Ann N Y Acad Sci*. 1113:192-201.
- Shimabukuro, T., and K. Naito. 2008. Tumor-infiltrating lymphocytes derived from human renal cell carcinoma: clonal analysis of its characteristics. *International journal of urology : official journal of the Japanese Urological Association*. 15:241-244.

- Shiple, J.M., J.H. Grubb, and W.S. Sly. 1993. The role of glycosylation and phosphorylation in the expression of active human beta-glucuronidase. *J Biol Chem.* 268:12193-12198.
- Shomura, H., S. Shichijo, S. Matsueda, T. Kawakami, Y. Sato, S. Todo, and K. Itoh. 2004. Identification of epidermal growth factor receptor-derived peptides immunogenic for HLA-A2(+) cancer patients. *Br J Cancer.* 90:1563-1571.
- Sierra, J.R., and M.S. Tsao. 2011. c-MET as a potential therapeutic target and biomarker in cancer. *Therapeutic advances in medical oncology.* 3:S21-35.
- Singh-Jasuja, H., N.P. Emmerich, and H.G. Rammensee. 2004. The Tübingen approach: identification, selection, and validation of tumor-associated HLA peptides for cancer therapy. *Cancer Immunol Immunother.* 53:187-195.
- Singh, H., N. Emmerich, S. Walter, and T. Weinschenk. 2007. Tumor-associated peptides binding to human leukocyte antigen (HLA) class I or II molecules and related anti- cancer vaccine. I.B.G.T. (DE), editor, DE. 65.
- Singh, H., N. Emmerich, S. Walter, and T. Weinschenk. 2009. Tumor-associated peptides binding to human leukocyte antigen (HLA) class I or II molecules and related anti- cancer vaccine. I.B.G.T. (DE), editor, DE. 60.
- Smyth, G.K. 2004. Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Statistical applications in genetics and molecular biology.* 3:Article3.
- Stacklies, W., H. Redestig, M. Scholz, D. Walther, and J. Selbig. 2007. pcaMethods--a bioconductor package providing PCA methods for incomplete data. *Bioinformatics.* 23:1164-1167.
- Stankiewicz, A.R., G. Lachapelle, C.P. Foo, S.M. Radicioni, and D.D. Mosser. 2005. Hsp70 inhibits heat-induced apoptosis upstream of mitochondria by preventing Bax translocation. *J Biol Chem.* 280:38729-38739.
- Statistical Algorithms Reference Guide. I. Affymetrix. 2007
- Sturn, A., J. Quackenbush, and Z. Trajanoski. 2002. Genesis: cluster analysis of microarray data. *Bioinformatics.* 18:207-208.
- Sundin, L.J., and J.G. Deluca. 2010. Kinetochores: NDC80 toes the line. *Curr Biol.* 20:R1083-1085.
- Sundin, L.J., G.J. Guimaraes, and J.G. Deluca. 2011. The NDC80 complex proteins Nuf2 and Hec1 make distinct contributions to kinetochore-microtubule attachment in mitosis. *Mol Biol Cell.* 22:759-768.
- Takeuchi, K., and T. Fukagawa. 2012. Molecular architecture of vertebrate kinetochores. *Experimental cell research.* 318:1367-1374.
- TANTIGEN: Tumor T cell Antigen Database. <http://cvc.dfci.harvard.edu/tadb/index.html>. 2009
- Tanudji, M., J. Shoemaker, L. L'Italien, L. Russell, G. Chin, and X.M. Schebye. 2004. Gene silencing of CENP-E by small interfering RNA in HeLa cells leads to missegregation of chromosomes after a mitotic delay. *Mol Biol Cell.* 15:3771-3781.
- TaqMan® Array Plates. L. Technologies. Applied Biosystems Quick Referenz Card. 2009
- Taylor, W.R., and G.R. Stark. 2001. Regulation of the G2/M transition by p53. *Oncogene.* 20:1803-1815.

- Teng, L.S., K.T. Jin, N. Han, and J. Cao. 2010. Radiofrequency ablation, heat shock protein 70 and potential anti-tumor immunity in hepatic and pancreatic cancers: a minireview. *Hepatobiliary & pancreatic diseases international : HBPD INT.* 9:361-365.
- Thomasson, M., H. Hedman, B. Ljungberg, and R. Henriksson. 2012. Gene expression pattern of the epidermal growth factor receptor family and LRIG1 in renal cell carcinoma. *BMC research notes.* 5:216.
- Timofeev, O., O. Cizmecioglu, F. Settele, T. Kempf, and I. Hoffmann. 2010. Cdc25 phosphatases are required for timely assembly of CDK1-cyclin B at the G2/M transition. *J Biol Chem.* 285:16978-16990.
- Togashi, A., T. Katagiri, S. Ashida, T. Fujioka, O. Maruyama, Y. Wakumoto, Y. Sakamoto, M. Fujime, Y. Kawachi, T. Shuin, and Y. Nakamura. 2005. Hypoxia-inducible protein 2 (HIG2), a novel diagnostic marker for renal cell carcinoma and potential target for molecular therapy. *Cancer Res.* 65:4817-4826.
- Tun, H.W., L.A. Marlow, C.A. von Roemeling, S.J. Cooper, P. Kreinest, K. Wu, B.A. Luxon, M. Sinha, P.Z. Anastasiadis, and J.A. Copland. 2010. Pathway signature and cellular differentiation in clear cell renal cell carcinoma. *PLoS One.* 5:e10696.
- Tusher, V.G., R. Tibshirani, and G. Chu. 2001. Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98:5116-5121.
- Urošević, M., M.O. Kurrer, J. Kamarashev, B. Mueller, W. Weder, G. Burg, R.A. Stahel, R. Dummer, and A. Trojan. 2001. Human leukocyte antigen G up-regulation in lung cancer associates with high-grade histology, human leukocyte antigen class I loss and interleukin-10 production. *The American journal of pathology.* 159:817-824.
- Valente, V., S.A. Teixeira, L. Neder, O.K. Okamoto, S.M. Oba-Shinjo, S.K. Marie, C.A. Scrideli, M.L. Paco-Larson, and C.G. Carlotti, Jr. 2009. Selection of suitable housekeeping genes for expression analysis in glioblastoma using quantitative RT-PCR. *BMC Mol Biol.* 10:17.
- van Kooten, C., and J. Banchereau. 2000. CD40-CD40 ligand. *J Leukoc Biol.* 67:2-17.
- Van Poppel, H., S. Joniau, and S.W. Van Gool. 2009. Vaccine therapy in patients with renal cell carcinoma. *Eur Urol.* 55:1333-1342.
- Vaseva, A.V., and U.M. Moll. 2009. The mitochondrial p53 pathway. *Biochim Biophys Acta.* 1787:414-420.
- Vastrik, I., P. D'Eustachio, E. Schmidt, G. Gopinath, D. Croft, B. de Bono, M. Gillespie, B. Jassal, S. Lewis, L. Matthews, G. Wu, E. Birney, and L. Stein. 2007. Reactome: a knowledge base of biologic pathways and processes. *Genome Biol.* 8:R39.
- Verdin, E., F. Dequiedt, and H.G. Kasler. 2003. Class II histone deacetylases: versatile regulators. *Trends in genetics : TIG.* 19:286-293.
- Verstrepen, L., I. Carpentier, K. Verhelst, and R. Beyaert. 2009. ABINs: A20 binding inhibitors of NF- $\kappa$ B and apoptosis signaling. *Biochem Pharmacol.* 78:105-114.
- Viola, A., A. Sarukhan, V. Bronte, and B. Molon. 2012. The pros and cons of chemokines in tumor immunology. *Trends Immunol.* 33:496-504.
- Wang, R.E. 2011. Targeting heat shock proteins 70/90 and proteasome for cancer therapy. *Current medicinal chemistry.* 18:4250-4264.

- Wang, Y., C. Barbacioru, F. Hyland, W. Xiao, K.L. Hunkapiller, J. Blake, F. Chan, C. Gonzalez, L. Zhang, and R.R. Samaha. 2006. Large scale real-time PCR validation on gene expression measurements from two commercial long-oligonucleotide microarrays. *BMC genomics*. 7:59.
- Watanabe, M., Y. Hara, K. Tanabe, H. Toma, and R. Abe. 2005. A distinct role for ICOS-mediated co-stimulatory signaling in CD4+ and CD8+ T cell subsets. *Int Immunol*. 17:269-278.
- Waugh, D.J., and C. Wilson. 2008. The interleukin-8 pathway in cancer. *Clin Cancer Res*. 14:6735-6741.
- Willis, S.N., and J.M. Adams. 2005. Life in the balance: how BH3-only proteins induce apoptosis. *Curr Opin Cell Biol*. 17:617-625.
- Wittig, B., A. Marten, T. Dorbic, S. Weineck, H. Min, S. Niemitz, B. Trojaneck, D. Flieger, S. Kruopis, A. Albers, J. Loffel, A. Neubauer, P. Albers, S. Muller, T. Sauerbruch, T. Bieber, D. Huhn, and I.G. Schmidt-Wolf. 2001. Therapeutic vaccination against metastatic carcinoma by expression-modulated and immunomodified autologous tumor cells: a first clinical phase I/II trial. *Hum Gene Ther*. 12:267-278.
- Wong, M.M., and E.N. Fish. 2003. Chemokines: attractive mediators of the immune response. *Semin Immunol*. 15:5-14.
- Wos, E., T. Olencki, L. Tuason, G.T. Budd, D. Peereboom, K. Sandstrom, D. McLain, J. Finke, and R.M. Bukowski. 1996. Phase II trial of subcutaneously administered granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in patients with metastatic renal cell carcinoma. *Cancer*. 77:1149-1153.
- Wyllie, A.H., C.O. Bellamy, V.J. Bubb, A.R. Clarke, S. Corbet, L. Curtis, D.J. Harrison, M.L. Hooper, N. Toft, S. Webb, and C.C. Bird. 1999. Apoptosis and carcinogenesis. *Br J Cancer*. 80 Suppl 1:34-37.
- Yan, D., E. Dong Xda, X. Chen, L. Wang, C. Lu, J. Wang, J. Qu, and L. Tu. 2009a. MicroRNA-1/206 targets c-Met and inhibits rhabdomyosarcoma development. *J Biol Chem*. 284:29596-29604.
- Yan, D., X. Zhou, X. Chen, D.N. Hu, X.D. Dong, J. Wang, F. Lu, L. Tu, and J. Qu. 2009b. MicroRNA-34a inhibits uveal melanoma cell proliferation and migration through downregulation of c-Met. *Investigative ophthalmology & visual science*. 50:1559-1565.
- Yao, S., Y. Zhu, G. Zhu, M. Augustine, L. Zheng, D.J. Goode, M. Broadwater, W. Ruff, S. Flies, H. Xu, D. Flies, L. Luo, S. Wang, and L. Chen. 2011. B7-h2 is a costimulatory ligand for CD28 in human. *Immunity*. 34:729-740.
- Yasmeen, A., W.E. Berdel, H. Serve, and C. Muller-Tidow. 2003. E- and A-type cyclins as markers for cancer diagnosis and prognosis. *Expert review of molecular diagnostics*. 3:617-633.
- Yen, T.J., G. Li, B.T. Schaar, I. Szilak, and D.W. Cleveland. 1992. CENP-E is a putative kinetochore motor that accumulates just before mitosis. *Nature*. 359:536-539.
- Yuen, T., E. Wurmbach, R.L. Pfeffer, B.J. Ebersole, and S.C. Sealfon. 2002. Accuracy and calibration of commercial oligonucleotide and custom cDNA microarrays. *Nucleic acids research*. 30:e48.
- Zhong, H., and J.W. Simons. 1999. Direct comparison of GAPDH, beta-actin, cyclophilin, and 28S rRNA as internal standards for quantifying RNA levels under hypoxia. *Biochem Biophys Res Commun*. 259:523-526



## 7 Anhang

### 7.1 Tabellen

**Tabelle 7.1 Überrepräsentierte funktionelle Gengruppen und Pathways der verstärkt exprimierten Gene (native B25-MOL-Zellen vs. Wirkstoffzellen)**

Gene, die eine mindestens dreifach erhöhte Expression in den Wirkstoffzellen gegenüber den nativen B25-MOL-Zellen aufwiesen, sind mit Hilfe der DAVID Datenbank einer funktionellen Gen-Annotationsanalyse unterzogen worden. Die erste Spalte gibt die Art der überrepräsentierten Kategorie wieder und die zweite Spalte die Bezeichnung der entsprechenden Kategorie. In der dritten Spalte ist die Anzahl der Gene dokumentiert, die in dieser Kategorie hochreguliert sind. Die vierte Spalte bezeichnet den prozentualen Anteil der regulierten Gene in der Gesamtanzahl der Gene in dieser Kategorie. Der modifizierte p-Wert des Fischers T-Test (EASE) wird von DAVID als Maß für die Überrepräsentierung der verschiedenen Kategorien verwendet.

Kategorie	Term	Anzahl Gene	%	p Wert
GOTERM_BP_5	GO:0048534 hemopoietic or lymphoid organ development	15	8,38	8,22E-07
GOTERM_BP_5	GO:0006935 chemotaxis	12	6,70	1,24E-06
GOTERM_BP_5	GO:0030097 hemopoiesis	14	7,82	1,61E-06
GOTERM_BP_5	GO:0050671 positive regulation of lymphocyte proliferation	8	4,47	1,95E-06
GOTERM_BP_5	GO:0032946 positive regulation of mononuclear cell proliferation	8	4,47	2,21E-06
GOTERM_BP_5	GO:0070665 positive regulation of leukocyte proliferation	8	4,47	2,21E-06
GOTERM_BP_5	GO:0042981 regulation of apoptosis	25	13,97	4,80E-06
GOTERM_BP_5	GO:0043067 regulation of programmed cell death	25	13,97	5,69E-06
GOTERM_BP_5	GO:0050864 regulation of B cell activation	7	3,91	1,73E-05
GOTERM_BP_5	GO:0050670 regulation of lymphocyte proliferation	8	4,47	3,11E-05
GOTERM_BP_5	GO:0051249 regulation of lymphocyte activation	10	5,59	3,19E-05
GOTERM_BP_5	GO:0050900 leukocyte migration	7	3,91	3,31E-05
GOTERM_BP_5	GO:0070663 regulation of leukocyte proliferation	8	4,47	3,36E-05
GOTERM_BP_5	GO:0032944 regulation of mononuclear cell proliferation	8	4,47	3,36E-05
GOTERM_BP_5	GO:0051173 positive regulation of nitrogen compound metabolic process	20	11,17	6,21E-05
GOTERM_BP_5	GO:0051174 regulation of phosphorus metabolic process	17	9,50	6,83E-05
GOTERM_BP_5	GO:0019220 regulation of phosphate metabolic process	17	9,50	6,83E-05
GOTERM_BP_5	GO:0002694 regulation of leukocyte activation	10	5,59	7,83E-05
GOTERM_BP_5	GO:0051251 positive regulation of lymphocyte activation	8	4,47	8,48E-05
GOTERM_BP_5	GO:0045637 regulation of myeloid cell differentiation	7	3,91	1,07E-04
GOTERM_BP_5	GO:0031328 positive regulation of cellular biosynthetic process	20	11,17	1,40E-04

Kategorie	Term	Anzahl Gene	%	p Wert
GOTERM_BP_5	GO:0002696 positive regulation of leukocyte activation	8	4,47	1,48E-04
GOTERM_BP_5	GO:0007242 intracellular signaling cascade	29	16,20	1,53E-04
GOTERM_BP_5	GO:0009891 positive regulation of biosynthetic process	20	11,17	1,69E-04
GOTERM_BP_5	GO:0050867 positive regulation of cell activation	8	4,47	1,98E-04
GOTERM_BP_5	GO:0006916 anti-apoptosis	10	5,59	3,97E-04
GOTERM_BP_5	GO:0045935 positive regulation of nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolic process	18	10,06	3,99E-04
GOTERM_BP_5	GO:0045639 positive regulation of myeloid cell differentiation	5	2,79	4,20E-04
GOTERM_BP_5	GO:0050871 positive regulation of B cell activation	5	2,79	4,20E-04
GOTERM_BP_5	GO:0010628 positive regulation of gene expression	17	9,50	5,31E-04
GOTERM_BP_5	GO:0008284 positive regulation of cell proliferation	14	7,82	5,43E-04
GOTERM_BP_5	GO:0002521 leukocyte differentiation	8	4,47	5,44E-04
GOTERM_BP_5	GO:0030595 leukocyte chemotaxis	5	2,79	6,56E-04
GOTERM_BP_5	GO:0051272 positive regulation of cell motion	7	3,91	6,68E-04
GOTERM_BP_5	GO:0010557 positive regulation of macromolecule biosynthetic process	18	10,06	6,79E-04
GOTERM_BP_5	GO:0012502 induction of programmed cell death	12	6,70	7,20E-04
GOTERM_BP_5	GO:0060326 cell chemotaxis	5	2,79	8,03E-04
GOTERM_BP_5	GO:0016477 cell migration	11	6,15	8,25E-04
GOTERM_BP_5	GO:0045597 positive regulation of cell differentiation	10	5,59	8,51E-04
GOTERM_BP_5	GO:0030098 lymphocyte differentiation	7	3,91	8,69E-04
GOTERM_BP_5	GO:0019221 cytokine-mediated signaling pathway	6	3,35	9,48E-04
GOTERM_BP_5	GO:0045941 positive regulation of transcription	16	8,94	1,14E-03
GOTERM_BP_5	GO:0031349 positive regulation of defense response	6	3,35	1,15E-03
GOTERM_BP_5	GO:0031325 positive regulation of cellular metabolic process	21	11,73	1,21E-03
GOTERM_BP_5	GO:0042035 regulation of cytokine biosynthetic process	6	3,35	1,22E-03
GOTERM_BP_5	GO:0050870 positive regulation of T cell activation	6	3,35	1,37E-03
GOTERM_BP_5	GO:0043066 negative regulation of apoptosis	12	6,70	1,59E-03
GOTERM_BP_5	GO:0043069 negative regulation of programmed cell death	12	6,70	1,78E-03
GOTERM_BP_5	GO:0060548 negative regulation of cell death	12	6,70	1,82E-03
GOTERM_BP_5	GO:0008285 negative regulation of cell proliferation	12	6,70	1,86E-03
GOTERM_BP_5	GO:0002237 response to molecule of bacterial origin	6	3,35	2,38E-03
GOTERM_BP_5	GO:0043065 positive regulation of apoptosis	13	7,26	2,42E-03
GOTERM_BP_5	GO:0042110 T cell activation	7	3,91	2,45E-03
GOTERM_BP_5	GO:0043068 positive regulation of programmed cell death	13	7,26	2,56E-03

Kategorie	Term	Anzahl Gene	%	p Wert
GOTERM_BP_5	GO:0010942 positive regulation of cell death	13	7,26	2,66E-03
GOTERM_BP_5	GO:0000079 regulation of cyclin-dependent protein kinase activity	5	2,79	2,73E-03
GOTERM_BP_5	GO:0030335 positive regulation of cell migration	6	3,35	2,76E-03
GOTERM_BP_5	GO:0007584 response to nutrient	7	3,91	4,12E-03
GOTERM_BP_5	GO:0031347 regulation of defense response	7	3,91	4,57E-03
GOTERM_BP_5	GO:0002697 regulation of immune effector process	6	3,35	4,75E-03
GOTERM_BP_5	GO:0045765 regulation of angiogenesis	5	2,79	4,77E-03
GOTERM_BP_5	GO:0045619 regulation of lymphocyte differentiation	5	2,79	4,77E-03
GOTERM_BP_5	GO:0010604 positive regulation of macromolecule metabolic process	19	10,61	5,00E-03
GOTERM_BP_5	GO:0032103 positive regulation of response to external stimulus	5	2,79	5,04E-03
GOTERM_BP_5	GO:0043549 regulation of kinase activity	11	6,15	5,38E-03
GOTERM_BP_5	GO:0045893 positive regulation of transcription, DNA-dependent	13	7,26	5,55E-03
GOTERM_BP_5	GO:0051254 positive regulation of RNA metabolic process	13	7,26	5,92E-03
GOTERM_BP_5	GO:0050863 regulation of T cell activation	6	3,35	8,77E-03
GOTERM_BP_5	GO:0042113 B cell activation	5	2,79	9,22E-03
GOTERM_BP_5	GO:0032496 response to lipopolysaccharide	5	2,79	9,64E-03
GOTERM_BP_5	GO:0030334 regulation of cell migration	7	3,91	1,01E-02
GOTERM_BP_5	GO:0009888 tissue development	15	8,38	1,28E-02
GOTERM_BP_5	GO:0031960 response to corticosteroid stimulus	5	2,79	1,35E-02
GOTERM_BP_5	GO:0007243 protein kinase cascade	10	5,59	1,91E-02
GOTERM_BP_5	GO:0009887 organ morphogenesis	13	7,26	1,92E-02
GOTERM_BP_5	GO:0007596 blood coagulation	5	2,79	2,47E-02
GOTERM_BP_5	GO:0051090 regulation of transcription factor activity	5	2,79	2,55E-02
GOTERM_BP_5	GO:0010647 positive regulation of cell communication	9	5,03	2,65E-02
GOTERM_BP_5	GO:0009967 positive regulation of signal transduction	8	4,47	4,12E-02
GOTERM_BP_5	GO:0031326 regulation of cellular biosynthetic process	42	23,46	4,20E-02
GOTERM_BP_5	GO:0007264 small GTPase mediated signal transduction	8	4,47	4,78E-02
GOTERM_BP_5	GO:0008544 epidermis development	6	3,35	4,95E-02
GOTERM_CC_5	GO:0044459 plasma membrane part	34	18,99	6,22E-03
GOTERM_CC_5	GO:0009897 external side of plasma membrane	6	3,35	2,50E-02
GOTERM_CC_5	GO:0005887 integral to plasma membrane	19	10,61	3,88E-02
GOTERM_CC_5	GO:0031226 intrinsic to plasma membrane	19	10,61	4,66E-02
GOTERM_MF_5	GO:0008009 chemokine activity	8	4,47	4,24E-07
GOTERM_MF_5	GO:0042379 chemokine receptor binding	8	4,47	6,63E-07
GOTERM_MF_5	GO:0032561 guanyl ribonucleotide binding	11	6,15	6,47E-03
KEGG_PATHWAY	hsa04060:Cytokine-cytokine receptor interaction	20	11,17	1,20E-08
KEGG_PATHWAY	hsa04620:Toll-like receptor signaling pathway	11	6,15	3,17E-06

Kategorie	Term	Anzahl Gene	%	p Wert
KEGG_PATHWAY	hsa04115:p53 signaling pathway	8	4,47	8,20E-05
KEGG_PATHWAY	hsa04621:NOD-like receptor signaling pathway	7	3,91	3,83E-04
KEGG_PATHWAY	hsa04062:Chemokine signaling pathway	11	6,15	6,23E-04
KEGG_PATHWAY	hsa04622:RIG-I-like receptor signaling pathway	7	3,91	7,97E-04
KEGG_PATHWAY	hsa04010:MAPK signaling pathway	12	6,70	2,81E-03
KEGG_PATHWAY	hsa05120:Epithelial cell signaling in Helicobacter pylori infection	6	3,35	4,08E-03
KEGG_PATHWAY	hsa04514:Cell adhesion molecules (CAMs)	8	4,47	4,45E-03
KEGG_PATHWAY	hsa04650:Natural killer cell mediated cytotoxicity	8	4,47	4,64E-03
KEGG_PATHWAY	hsa05200:Pathways in cancer	13	7,26	4,78E-03
KEGG_PATHWAY	hsa05416:Viral myocarditis	6	3,35	4,92E-03
KEGG_PATHWAY	hsa04660:T cell receptor signaling pathway	7	3,91	6,72E-03
KEGG_PATHWAY	hsa04672:Intestinal immune network for IgA production	5	2,79	7,04E-03
KEGG_PATHWAY	hsa04623:Cytosolic DNA-sensing pathway	5	2,79	1,06E-02
KEGG_PATHWAY	hsa04662:B cell receptor signaling pathway	5	2,79	2,97E-02
KEGG_PATHWAY	hsa04640:Hematopoietic cell lineage	5	2,79	4,57E-02
KEGG_PATHWAY	hsa04012:ErbB signaling pathway	5	2,79	4,73E-02
KEGG_PATHWAY	hsa04210:Apoptosis	5	2,79	4,73E-02
REACTOME_PATHWAY	REACT_13552:Integrin cell surface interactions	6	3,35	1,43E-03
REACTOME_PATHWAY	REACT_6900:Signaling in Immune system	9	5,03	8,58E-03

**Tabelle 7.2 Überrepräsentierte funktionelle Gengruppen und Pathways, der vermindert exprimierten Gene (native B25-MOL-Zellen vs. Wirkstoffzellen)**

Gene, die eine verminderte Expression um einen Faktor von mindestens 3 aufwiesen, wurden mit Hilfe der DAVID Datenbank einer funktionellen Gen-Annotationsanalyse unterzogen. Die erste Spalte gibt die Art der überrepräsentierten Kategorie wieder und die zweite Spalte die Bezeichnung der entsprechenden Kategorie. In der dritten Spalte ist die Anzahl der Gene dokumentiert, die in dieser Kategorie hochreguliert sind. Die vierte Spalte bezeichnet den prozentualen Anteil der regulierten Gene gegenüber der Gesamtanzahl der Gene in dieser Kategorie. Der modifizierte p-Wert des Fischers T-Test (EASE) wird von DAVID als Maß für die Überrepräsentierung der verschiedenen Kategorien verwendet.

Kategorie	Term	Anzahl Gene	%	p Wert
GOTERM_BP_5	GO:0000279 M phase	51	24,06	1,04E-41
GOTERM_BP_5	GO:0000087 M phase of mitotic cell cycle	43	20,28	9,45E-39
GOTERM_BP_5	GO:0007067 mitosis	42	19,81	1,09E-37
GOTERM_BP_5	GO:0000070 mitotic sister chromatid segregation	11	5,19	1,05E-11
GOTERM_BP_5	GO:0006259 DNA metabolic process	25	11,79	1,00E-08
GOTERM_BP_5	GO:0006260 DNA replication	15	7,08	7,85E-08
GOTERM_BP_5	GO:0007093 mitotic cell cycle checkpoint	8	3,77	7,81E-07
GOTERM_BP_5	GO:0007051 spindle organization	8	3,77	1,08E-06
GOTERM_BP_5	GO:0010564 regulation of cell cycle process	11	5,19	1,25E-06
GOTERM_BP_5	GO:0065004 protein-DNA complex assembly	10	4,72	1,58E-06
GOTERM_BP_5	GO:0000075 cell cycle checkpoint	10	4,72	1,58E-06
GOTERM_BP_5	GO:0007346 regulation of mitotic cell cycle	12	5,66	2,45E-06

Kategorie	Term	Anzahl Gene	%	p Wert
GOTERM_BP_5	GO:0007076 mitotic chromosome condensation	5	2,36	1,40E-05
GOTERM_BP_5	GO:0007052 mitotic spindle organization	5	2,36	2,62E-05
GOTERM_BP_5	GO:0006281 DNA repair	14	6,60	4,41E-05
GOTERM_BP_5	GO:0006334 nucleosome assembly	8	3,77	7,23E-05
GOTERM_BP_5	GO:0030071 regulation of mitotic metaphase/anaphase transition	5	2,36	1,31E-04
GOTERM_BP_5	GO:0034728 nucleosome organization	8	3,77	1,38E-04
GOTERM_BP_5	GO:0007126 meiosis	8	3,77	1,92E-04
GOTERM_BP_5	GO:0051327 M phase of meiotic cell cycle	8	3,77	1,92E-04
GOTERM_BP_5	GO:0010948 negative regulation of cell cycle process	5	2,36	2,21E-04
GOTERM_BP_5	GO:0007088 regulation of mitosis	6	2,83	5,86E-04
GOTERM_BP_5	GO:0051783 regulation of nuclear division	6	2,83	5,86E-04
GOTERM_BP_5	GO:0006333 chromatin assembly or disassembly	8	3,77	9,23E-04
GOTERM_BP_5	GO:0031401 positive regulation of protein modification process	9	4,25	2,07E-03
GOTERM_BP_5	GO:0051438 regulation of ubiquitin-protein ligase activity	6	2,83	2,61E-03
GOTERM_BP_5	GO:0031399 regulation of protein modification process	11	5,19	3,32E-03
GOTERM_BP_5	GO:0032270 positive regulation of cellular protein metabolic process	9	4,25	7,77E-03
GOTERM_BP_5	GO:0051329 interphase of mitotic cell cycle	6	2,83	8,51E-03
GOTERM_BP_5	GO:0043627 response to estrogen stimulus	6	2,83	9,21E-03
GOTERM_BP_5	GO:0006310 DNA recombination	6	2,83	9,21E-03
GOTERM_BP_5	GO:0051325 interphase	6	2,83	9,57E-03
GOTERM_BP_5	GO:0051247 positive regulation of protein metabolic process	9	4,25	9,88E-03
GOTERM_BP_5	GO:0010639 negative regulation of organelle organization	5	2,36	1,79E-02
GOTERM_BP_5	GO:0032268 regulation of cellular protein metabolic process	12	5,66	3,06E-02
GOTERM_BP_5	GO:0051246 regulation of protein metabolic process	13	6,13	3,51E-02
GOTERM_BP_5	GO:0043009 chordate embryonic development	9	4,25	4,99E-02
GOTERM_CC_5	GO:0005819 spindle	25	11,79	1,91E-21
GOTERM_CC_5	GO:0005694 chromosome	36	16,98	1,01E-19
GOTERM_CC_5	GO:0044427 chromosomal part	33	15,57	3,67E-19
GOTERM_CC_5	GO:0005634 nucleus	111	52,36	1,29E-17
GOTERM_CC_5	GO:0000793 condensed chromosome	21	9,91	1,45E-17
GOTERM_CC_5	GO:0015630 microtubule cytoskeleton	35	16,51	1,98E-16
GOTERM_CC_5	GO:0000775 chromosome, centromeric region	18	8,49	3,77E-14
GOTERM_CC_5	GO:0043232 intracellular non-membrane-bounded organelle	70	33,02	2,34E-13
GOTERM_CC_5	GO:0000779 condensed chromosome, centromeric region	14	6,60	3,39E-13
GOTERM_CC_5	GO:0044446 intracellular organelle part	89	41,98	1,95E-11
GOTERM_CC_5	GO:0000777 condensed chromosome kinetochore	12	5,66	3,67E-11
GOTERM_CC_5	GO:0043229 intracellular organelle	139	65,57	8,49E-11

Kategorie	Term	Anzahl Gene	%	p Wert
GOTERM_CC_5	GO:0043231 intracellular membrane-bounded organelle	129	60,85	2,03E-10
GOTERM_CC_5	GO:0044430 cytoskeletal part	36	16,98	3,11E-10
GOTERM_CC_5	GO:0000776 kinetochore	12	5,66	8,98E-10
GOTERM_CC_5	GO:0005815 microtubule organizing center	17	8,02	2,55E-08
GOTERM_CC_5	GO:0005856 cytoskeleton	40	18,87	4,50E-08
GOTERM_CC_5	GO:0044428 nuclear part	47	22,17	6,01E-08
GOTERM_CC_5	GO:0000922 spindle pole	8	3,77	8,24E-08
GOTERM_CC_5	GO:0000796 condensin complex	5	2,36	2,26E-07
GOTERM_CC_5	GO:0005813 centrosome	15	7,08	2,29E-07
GOTERM_CC_5	GO:0005874 microtubule	16	7,55	4,62E-07
GOTERM_CC_5	GO:0005876 spindle microtubule	7	3,30	7,01E-07
GOTERM_CC_5	GO:0031981 nuclear lumen	36	16,98	9,66E-06
GOTERM_CC_5	GO:0005654 nucleoplasm	24	11,32	1,34E-04
GOTERM_CC_5	GO:0070013 intracellular organelle lumen	37	17,45	2,85E-04
GOTERM_CC_5	GO:0000786 nucleosome	6	2,83	6,98E-04
GOTERM_CC_5	GO:0044450 microtubule organizing center part	5	2,36	3,57E-03
GOTERM_CC_5	GO:0005875 microtubule associated complex	6	2,83	5,83E-03
GOTERM_CC_5	GO:0000785 chromatin	8	3,77	7,41E-03
GOTERM_CC_5	GO:0000228 nuclear chromosome	7	3,30	9,95E-03
GOTERM_MF_5	GO:0032559 adenylyl ribonucleotide binding	44	20,75	9,19E-12
GOTERM_MF_5	GO:0016462 pyrophosphatase activity	24	11,32	9,76E-07
GOTERM_MF_5	GO:0004672 protein kinase activity	13	6,13	1,67E-02
KEGG_PATHWAY	hsa04110:Cell cycle	13	6,13	1,58E-09
KEGG_PATHWAY	hsa04114:Oocyte meiosis	8	3,77	8,49E-05
KEGG_PATHWAY	hsa03030:DNA replication	5	2,36	3,87E-04
KEGG_PATHWAY	hsa04914:Progesterone-mediated oocyte maturation	6	2,83	1,43E-03
KEGG_PATHWAY	hsa05322:Systemic lupus erythematosus	6	2,83	2,68E-03
REACTOME_PATHWAY	REACT_152:Cell Cycle, Mitotic	34	16,04	4,87E-21
REACTOME_PATHWAY	REACT_7970:Telomere Maintenance	8	3,77	3,14E-05
REACTOME_PATHWAY	REACT_1538:Cell Cycle Checkpoints	9	4,25	4,65E-04
REACTOME_PATHWAY	REACT_383:DNA Replication	8	3,77	1,02E-03
REACTOME_PATHWAY	REACT_216:DNA Repair	7	3,30	6,63E-03
REACTOME_PATHWAY	REACT_6850:Cdc20:Phospho-APC/C mediated degradation of Cyclin A	5	2,36	2,37E-02

**Tabelle 7.3 Vermindert exprimierte Gene, assoziiert mit dem Zellzyklus und dessen Regulation**

Runterregulierte Gene, die zu überrepräsentierten funktionellen Gruppen gehören, die mit dem Zellzyklus assoziiert sind. Neben dem Gensymbol und der Bezeichnung des Gens sind die Änderung der Expression (*fold change*, FC) und der p-Wert (*moderate t-statistic*) angegeben.

Gensymbol	Name	FC	p-Wert
PLIN2	adipose differentiation-related protein	-3,52	1,39E-05
ANLN	anillin, actin binding protein	-4,36	1,28E-05
MKI67	antigen identified by monoclonal antibody Ki-67	-4,78	9,28E-06
ASF1A	ASF1 anti-silencing function 1 homolog A ( <i>S. cerevisiae</i> )	-3,07	7,07E-05
ASPM	asp (abnormal spindle) homolog, microcephaly associated	-6,35	2,23E-05
ATAD2	ATPase family, AAA domain containing 2	-3,55	2,67E-05

Gensymbol	Name	FC	p-Wert
ATAD5	ATPase family, AAA domain containing 5	-3,35	1,90E-04
AURKA	aurora kinase A; aurora kinase A pseudogene 1	-5,56	1,14E-05
BIVM	basic, immunoglobulin-like variable motif containing	-3,82	1,86E-05
BRCA1	breast cancer 1, early onset	-4,04	2,52E-05
BUB1B	budding uninhibited by benzimidazoles 1 homolog beta (yeast)	-4,02	1,42E-05
CASC5	cancer susceptibility candidate 5	-4,10	3,38E-05
CASP6	caspase 6, apoptosis-related cysteine peptidase	-3,00	3,76E-05
CDK1	cell division cycle 2, G1 to S and G2 to M	-4,26	1,11E-04
CDC20	cell division cycle 20 homolog (S. cerevisiae)	-4,18	4,30E-04
CDC7	cell division cycle 7 homolog (S. cerevisiae)	-3,07	8,77E-05
CDCA2	cell division cycle associated 2	-3,45	4,11E-05
CDCA7	cell division cycle associated 7	-3,84	7,89E-06
CDCA7L	cell division cycle associated 7-like	-3,87	1,14E-05
CDCA8	cell division cycle associated 8	-3,97	1,61E-05
CENPE	centromere protein E, 312kDa	-5,84	2,69E-05
CENPF	centromere protein F, 350/400ka (mitosin)	-4,64	2,10E-05
CENPI	centromere protein I	-9,05	1,56E-05
CEP78	centrosomal protein 78kDa	-3,64	1,16E-05
C12orf48	chromosome 12 open reading frame 48	-3,66	4,91E-05
SKA3	chromosome 13 open reading frame 3	-3,92	5,84E-05
C13orf34	chromosome 13 open reading frame 34	-3,11	1,18E-04
C14orf106	chromosome 14 open reading frame 106	-5,07	9,53E-05
C4orf27	chromosome 4 open reading frame 27	-4,36	2,83E-06
CIT	citron (rho-interacting, serine/threonine kinase 21)	-4,11	1,19E-05
CCDC111	coiled-coil domain containing 111	-4,17	3,50E-05
CCNA2	cyclin A2	-7,99	1,31E-05
CCNB1	cyclin B1	-5,88	1,16E-05
CCNB2	cyclin B2	-3,11	1,55E-04
CDKN3	cyclin-dependent kinase inhibitor 3	-4,58	9,22E-06
CKAP2	cytoskeleton associated protein 2	-5,40	1,67E-05
DEPDC1	DEP domain containing 1	-8,45	5,69E-06
DLGAP5	discs, large (Drosophila) homolog-associated protein 5	-7,63	5,54E-06
DCLRE1A	DNA cross-link repair 1A (PSO2 homolog, S. cerevisiae)	-3,51	2,24E-05
E2F8	E2F transcription factor 8	-4,61	7,74E-06
ERCC5	excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 5	-3,45	4,78E-05
EXO1	exonuclease 1	-3,12	3,74E-05
FANCI	Fanconi anemia, complementation group I	-3,07	2,27E-05
FIGN	Fidgetin	-4,15	1,01E-05
FOXM1	forkhead box M1	-3,86	7,35E-06
GINS1	GINS complex subunit 1 (Psf1 homolog)	-3,31	1,18E-05
GPSM2	G-protein signaling modulator 2 (AGS3-like, C. elegans)	-3,92	1,31E-05
HAUS6	HAUS augmin-like complex, subunit 6	-3,23	1,16E-04
HLTF	helicase-like transcription factor	-3,97	9,80E-06
ANP32A	hepatopoietin PCn127; acidic (leucine-rich) nuclear phosphoprotein 32 family, member A	-3,09	2,29E-05
HIST1H1B	histone cluster 1, H1b	-5,32	1,01E-05
HIST1H2BF	histone cluster 1, H2bi; H2bg; H2be; H2bc	-3,84	5,81E-05
HIST1H2BM	histone cluster 1, H2bm	-4,19	6,27E-06
HIST1H3B	histone cluster 1, H3j; H3i; H3h; H3g; H3f; H3e; H3d; H3c; H3b; H3a; H2ad; histone cluster 2, H3a; H3c; H3d	-3,08	1,90E-05

Gensymbol	Name	FC	p-Wert
HIST1H3I	histone cluster 1, H3j; H3i; H3h; H3g; H3f; H3e; H3d,, H3c; H3b; H3a; H2ad; histone cluster 2, H3a; H3c; H3d	-4,27	7,89E-06
HIST1H4L	histone cluster 1, H4l; H4k; H4h; H4j; H4i; H4d; H4c; H4f; H4e; H4b; H4a; histone cluster 2, H4a; H4b histone cluster 4, H4;	-3,26	2,56E-05
HIST2H2AB	histone cluster 2, H2ab	-3,80	1,13E-05
HJURP	Holliday junction recognition protein	-4,37	2,96E-06
HOXA2	homeobox A2	-3,12	1,68E-05
HOXA9	homeobox A9	-3,45	7,45E-05
KLHDC2	kelch domain containing 2	-3,06	3,65E-05
KIF11	kinesin family member 11	-5,67	1,28E-05
KIF14	kinesin family member 14	-4,88	2,92E-05
KIF15	kinesin family member 15	-3,53	4,43E-05
KIF18A	kinesin family member 18A	-3,03	7,16E-05
KIF20A	kinesin family member 20A	-8,38	1,74E-05
KIF20B	kinesin family member 20B	-5,63	2,75E-05
KIF2C	kinesin family member 2C	-4,10	3,60E-05
KIF4A	kinesin family member 4B; kinesin family member 4A	-3,81	1,90E-05
KIFC1	kinesin family member C1	-3,63	1,61E-05
KIFC1	kinesin family member C1	-3,73	3,12E-05
KNTC1	kinetochore associated 1	-3,28	2,27E-05
LMNB1	lamin B1	-6,75	1,16E-05
LRRCC1	leucine rich repeat and coiled-coil domain containing 1	-3,25	7,31E-05
LIN9	lin-9 homolog (C. elegans)	-3,50	1,04E-04
LIAS	lipoic acid synthetase	-3,45	5,36E-05
MAD2L1	MAD2 mitotic arrest deficient-like 1 (yeast)	-3,18	3,71E-05
MTBP	Mdm2, transformed 3T3 cell double minute 2	-3,30	4,25E-05
MND1	meiotic nuclear divisions 1 homolog (S. cerevisiae)	-3,90	5,90E-05
MCM6	minichromosome maintenance complex component 6	-3,15	1,37E-05
MPHOSPH9	M-phase phosphoprotein 9	-3,22	2,09E-05
MSH2	mutS homolog 2, colon cancer, nonpolyposis type 1 (E. coli)	-3,99	1,42E-05
NDC80	NDC80 homolog, kinetochore complex component (S. cerevisiae)	-4,34	5,61E-05
NEIL3	nei endonuclease VIII-like 3 (E. coli)	-6,68	1,58E-05
NCAPD2	non-SMC condensin I complex, subunit D2	-4,60	3,77E-06
NCAPG	non-SMC condensin I complex, subunit G	-4,93	1,48E-05
NCAPD3	non-SMC condensin II complex, subunit D3	-3,10	1,23E-05
NCAPG2	non-SMC condensin II complex, subunit G2	-3,04	2,46E-05
NFIA	nuclear factor I/A	-3,81	1,16E-05
NUF2	NUF2, NDC80 kinetochore complex component, homolog	-6,09	2,01E-05
PBK	PDZ binding kinase	-4,45	5,06E-05
PDZK1	PDZ domain containing 1	-3,08	2,23E-05
PLEKHA2	pleckstrin homology domain containing, family A member 2	-4,04	6,27E-06
PLK1	polo-like kinase 1 (Drosophila)	-4,34	1,18E-05
PLK4	polo-like kinase 4 (Drosophila)	-3,37	5,52E-05
POLE2	polymerase (DNA directed), epsilon 2 (p59 subunit)	-3,75	3,04E-05
PRIM1	primase, DNA, polypeptide 1 (49kDa)	-4,20	1,61E-05
PRC1	protein regulator of cytokinesis 1	-3,24	2,76E-05
PTPN13	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 13 (APO-1/CD95 (Fas)-associated phosphatase)	-3,34	1,16E-05
RAD54B	RAD54 homolog B (S. cerevisiae)	-5,40	2,27E-05
RFC1	replication factor C (activator 1) 1, 145kDa	-3,23	3,51E-05



Gensymbol	Name	FC	p-Wert
RFC4	replication factor C (activator 1) 4, 37kDa	-3,38	2,16E-05
RBL1	retinoblastoma-like 1 (p107)	-3,06	7,35E-05
RRM2	ribonucleotide reductase M2 polypeptide	-3,85	5,06E-05
RMI1	RMI1, RecQ mediated genome instability 1, homolog	-3,31	1,98E-05
SGOL1	shugoshin-like 1 (S. pombe)	-3,40	4,90E-05
SGOL2	shugoshin-like 2 (S. pombe)	-4,40	4,75E-05
SIM1	single-minded homolog 1 (Drosophila)	-3,10	2,43E-05
SPC25	SPC25, NDC80 kinetochore complex component, homolog	-8,87	1,18E-05
SKP2	S-phase kinase-associated protein 2 (p45)	-4,95	1,20E-05
SASS6	spindle assembly 6 homolog (C. elegans)	-3,74	1,08E-04
SMC2	structural maintenance of chromosomes 2	-3,65	2,98E-05
SMC4	structural maintenance of chromosomes 4	-3,79	2,23E-05
TXNIP	thioredoxin interacting protein	-3,84	4,36E-06
TMPO	Thymopoietin	-4,81	1,68E-05
TOP2A	topoisomerase (DNA) II alpha 170kDa	-8,99	1,89E-06
TPX2	TPX2, microtubule-associated, homolog (Xenopus laevis)	-4,78	2,10E-05
TTK	TTK protein kinase	-6,41	3,22E-05
UBE2T	ubiquitin-conjugating enzyme E2T (putative)	-3,34	3,73E-05
WDHD1	WD repeat and HMG-box DNA binding protein 1	-3,83	8,90E-06
XRCC2	X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 2	-3,71	1,70E-05
ZFHX4	zinc finger homeobox 4	-5,83	2,58E-06
ZNF107	zinc finger protein 248	-4,33	1,76E-05
ZNF138	zinc finger protein 107	-3,89	7,73E-05
ZNF248	zinc finger protein 138	-3,44	9,24E-05
ZNF680	zinc finger protein 680	-5,13	4,84E-05
ZNF724P	zinc finger protein 724 pseudogene	-4,23	4,88E-05
ZNF730	zinc finger protein 730	-4,31	4,62E-05
ZNF738	zinc finger protein 738	-3,07	1,24E-04

Tabelle 7.4 Tumorassoziierte Antigene mit hoher Expressionsstärke ( $S_{int} > 1024$ ) in Wirkstoffzellen

Sonden-Set ID	Gensymbol	Entrez Gene ID	Bezeichnung	Expressionsstärke ( $S_{int}$ )
8008454	ABCC3	8714	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 3	1346,4
8028524	ACTN4	81	actinin, alpha 4	6199,2
8161755	ALDH1A1	216	aldehyde dehydrogenase 1 family, member A1	4597,5
7994737	ALDOA	226	aldolase A, fructose-bisphosphate	1935,0
7989335	ANXA2	302	annexin A2 pseudogene 3; annexin A2; annexin A2 pseudogene 1	3046,7
8072735	APOL1	8542	apolipoprotein L, 1	2654,6
8048120	ATIC	471	5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide formyltransferase/IMP cyclohydrolase	1053,8
8175835	BCAP31	10134	B-cell receptor-associated protein 31	1378,0
8065569	BCL2L1	598	BCL2-like 1	1357,7
8143417	BRAF	673	v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1	2165,9
8032380	BTBD2	55643	BTB (POZ) domain containing 2	1211,4

Sonden-Set ID	Gensymbol	Entrez Gene ID	Bezeichnung	Expressionsstärke (S <sub>int</sub> )
7900382	CAP1	10487	CAP, adenylate cyclase-associated protein 1 (yeast)	2999,6
7942123	CCND1	595	cyclin D1	1919,4
8101212	CCNI	10983	cyclin I	2928,9
7939341	CD44	960	CD44 molecule (Indian blood group)	9300,5
7964522	CDK4	1019	cyclin-dependent kinase 4	1491,4
8119088	CDKN1A	1026	cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21, Cip1)	1625,7
7918825/ 7918813	CSDE1	7812	cold shock domain containing E1, RNA-binding	2537,1
7903786	CSF1	1435	colony stimulating factor 1 (macrophage)	1977,5
8079021	CTNNB1	1499	catenin (cadherin-associated protein), beta 1, 88kDa	2388,1
8051583	CYP1B1	1545	cytochrome P450, family 1, subfamily B, polypeptide 1	1705,9
8032730	EEF2	1938	eukaryotic translation elongation factor 2	5168,7
8016099	EFTUD2	9343	elongation factor Tu GTP binding domain containing 2	1651,0
8132860	EGFR	1956	epidermal growth factor receptor (erythroblastic leukemia viral (v-erb-b) oncogene homolog, avian), ERBB	2161,0
7912706	EPHA2	1969	EPH receptor A2	1872,5
7953981	ETV6	2120	ets variant 6	1031,8
8143663	EZH2	2146	enhancer of zeste homolog 2 (Drosophila)	1294,0
8058765	FN1	2335	fibronectin 1	8218,0
7910124/ 8169740/ 8046515/ 8102860	H3F3A	3020	H3 histone, family 3B (H3.3B)	1711,9
8177725/ 8179034	HLAG	3135	major histocompatibility complex, class I, G	5604,9
8118310/ 8179322	HSPA1A	3303	heat shock 70kDa protein 1A	7034,6
8178086/ 8179324/ 8118314	HSPA1B	3304	heat shock 70kDa protein 1B	3213,7
8124848/ 8179704/ 8178435	IER3	8870	immediate early response 3	4660,7
8131666	ITGB8	3696	integrin, beta 8	2462,9
8015412	JUP	3728	junction plakoglobin	1320,0
8025828	LDLR	3949	low density lipoprotein receptor	2977,4
8018975	LGALS3BP	3959	lectin, galactoside-binding, soluble, 3 binding protein	1279,0
7919751	MCL1	4170	myeloid cell leukemia sequence 1 (BCL2-related)	2557,6
8135601	MET	4233	met proto-oncogene (hepatocyte growth factor receptor)	4100,0
7991234	MFGE8	4240	milk fat globule-EGF factor 8 protein	1341,1
7951217	MMP7	4316	matrix metalloproteinase 7 (matrilysin, uterine)	6874,1
7998222	MRPL28	10573	melanoma antigen p15, mitochondrial ribosomal protein L28	1720,0
8047127	MYO1B	4430	myosin IB	1406,5

Sonden-Set ID	Gensymbol	Entrez Gene ID	Bezeichnung	Expressionsstärke (S <sub>int</sub> )
8168316	OGT	8473	O-linked N-acetylglucosamine (GlcNAc) transferase (UDP-N-acetylglucosamine: polypeptide-N-acetylglucosaminyl transferase)	1502,1
7956593	OS9	10956	osteosarcoma amplified 9, endoplasmic reticulum associated protein	1328,6
7956152	PA2G4	5036	proliferation-associated 2G4, 38kDa; proliferation-associated 2G4 pseudogene 4, ErbB3-binding protein 1	3004,3
8084963	PAK2	5062	p21 protein (Cdc42/Rac)-activated kinase 2	1080,0
8143327	PARP12	64761	poly (ADP-ribose) polymerase family, member 12	1417,3
8168500	PGK1	5230	phosphoglycerate kinase 1	2135,5
8091283	PLOD2	5352	procollagen-lysine, 2-oxoglutarate 5-dioxygenase 2	3140,9
7989619	PPIB	5479	peptidylprolyl isomerase B (cyclophilin B)	4041,5
8129418	PTPRK	5796	protein tyrosine phosphatase, receptor type, K	1121,2
8172154/ 8013348/ 7998655/	RPS2	6187	ribosomal protein S2	6792,9
8070194	RUNX1	861	acute myeloid leukemia 1 protein, runt-related transcription factor 1	1282,2
8138824	SCRN1	9805	secernin 1	1313,4
8146550	SDCBP	6386	syndecan binding protein (syntenin)	4097,8
8049827	SEPT2	4735	septin 2	1932,0
8108558	SLC35A4	113829	solute carrier family 35, member A4	1455,2
8057744	STAT1	6772	signal transducer and activator of transcription 1, 91kDa	2230,9
8125713/ 8180166/ 8178977	TAPBP	6892	TAP binding protein (tapasin)	3455,7
8120880	TPBG	7162	trophoblast glycoprotein	2086,4
7902435	TPI1	7167	TPI1 pseudogene; triosephosphate isomerase 1	2159,6
8026513	TPM4	7171	tropomyosin 4	1454,6
8012304	TRAPPC1	58485	trafficking protein particle complex 1	1208,1
8129099	TSPYL1	7259	TSPY-like 1	1576,9
8169645	UBE2A	7319	ubiquitin-conjugating enzyme E2A (RAD6 homolog)	2313,1
7926368	VIM	7431	Vimentin	7504,8

Tabelle 7.5 Ergebnisse der Taqman® basierten qPCR-Analysen

Gensymbol	Av Ct nativ	Av Ct MGN	ddCt (MGN - nativ)	SD (ddCt)	FC (real)	SD	p Wert (t-Test)
ANGPTL4	25,23	27,38	0,93	0,04	-1,90	0,01	0,0038
APAF1	27,38	27,51	-1,10	0,06	2,14	0,09	0,3915
APOL1	21,97	22,80	-0,40	0,14	1,32	0,13	0,4651
AURKA	26,916	0,3324	2,46	0,24	-5,49	0,92	0,0004
BAG3	27,41	26,50	-2,13	0,14	4,41	0,44	0,0461
BCL2L11	27,94	25,67	-3,49	0,19	11,34	1,52	0,0038

Gensymbol	Av Ct nativ	Av Ct MGN	ddCt (MGN - nativ)	SD (ddCt)	FC (real)	SD	p Wert (t-Test)
BID	30,30	32,24	0,72	0,04	-1,65	0,02	0,2677
BIRC2	25,76	24,71	-2,27	0,05	4,83	0,17	0,0343
BIRC5	26,12	27,69	0,34	0,76	-1,11	0,44	0,0920
CASP2	24,63	26,30	0,44	0,03	-1,36	0,01	0,0043
CASP6	27,78	27,67	-1,34	0,04	2,53	0,06	0,4163
CASP8AP2	28,24	29,48	0,02	0,07	-1,01	0,05	0,0062
CCL2	23,53	25,98	1,22	0,06	-2,33	0,02	-
CCL20	35,67	22,88	-14,01	0,34	16.990,54	3.959,03	-
CCL28	26,26	27,25	-0,24	0,40	1,22	0,33	0,1193
CCL5	31,61	21,99	-10,85	0,30	1.886,08	384,55	0,0004
CCNA2	27,644	0,1504	4,13	0,24	-17,49	2,88	0,0009
CCND1	21,37	22,55	-0,04	0,04	1,03	0,03	0,2203
CCR7	31,28	30,79	-1,71	0,07	3,27	0,16	-
CD40	27,15	23,83	-4,55	0,04	23,49	0,69	0,0001
CD40LG	38,95	15,40	-24,77	0,13	28.671.843,79	2.616.274,56	-
CD44	19,73	20,33	-0,62	0,31	1,58	0,33	0,2715
CD58	29,88	30,29	-0,82	0,15	1,78	0,18	0,2667
CD70	24,30	25,03	-0,49	0,17	1,42	0,16	0,4523
CD80	37,13	16,38	-21,97	0,43	4.294.939,72	1.245.179,40	-
CDH1	25,61	25,67	-1,16	0,29	2,28	0,45	0,4607
CEACAM1	39,08	34,66	-5,64	0,08	50,10	2,62	-
CENPE	35,647	0,5297	1,64	0,99	-3,11	2,30	0,0258
CFLAR	24,31	23,48	-2,05	0,06	4,15	0,17	0,0215
CSF1	24,00	22,16	-3,07	0,04	8,38	0,26	0,0061
CSF2	32,99	15,71	-18,50	0,02	370.724,62	5.134,68	-
CX3CL1	23,58	21,54	-3,27	0,03	9,62	0,21	0,0005
CXCL1	25,84	23,20	-3,86	0,05	14,57	0,50	-
CXCL10	36,73	29,12	-8,83	0,09	457,19	29,81	0,0140
CXCL16	27,32	26,74	-1,80	0,19	3,51	0,46	0,4555
CXCL2	26,50	23,87	-3,85	0,10	14,45	0,99	0,0037
CXCL5	28,26	28,46	-1,02	0,04	2,03	0,06	0,1778
DAPK1	24,47	25,62	-0,07	0,11	1,05	0,08	0,0137
DEDD2	29,72	30,23	-0,71	0,32	1,68	0,36	0,2974
EGFR	26,063	0,3868	-0,91	0,52	1,88	0,40	0,3865
EPHA2	25,12	22,83	-3,52	0,16	11,53	1,28	0,0051
ERBB2	26,12	26,76	-0,59	0,09	1,50	0,10	0,0499
FAS	25,16	25,03	-1,36	0,15	2,57	0,27	0,1021
GADD45A	37,14	33,66	-4,70	0,28	26,56	5,14	0,0267
GINS1	26,338	0,4796	1,20	0,31	-2,29	0,49	0,0135
GUCY1A3	25,45	26,32	-0,35	0,20	1,29	0,18	0,0777
HIG2 (C7orf68)	28,27	30,81	1,32	0,15	-2,48	0,04	0,0018
HLA-A	23,46	21,76	-2,92	0,02	7,59	0,10	-
HLA-B	26,59	23,96	-3,85	0,07	14,46	0,73	-
HLA-C	25,64	24,87	-1,99	0,07	3,98	0,19	0,0467
HLA-E	24,46	23,20	-2,48	0,02	5,57	0,07	0,0034
HLA-F	33,47	34,71	0,02	0,12	-1,01	0,08	0,4697
HLA-G	-	-	-	-	-	-	-
HSPA1A; HSPA1B	24,83	24,23	24,93	0,00	3,66	0,95	0,0381

Gensymbol	Av Ct nativ	Av Ct MGN	ddCt (MGN - nativ)	SD (ddCt)	FC (real)	SD	p Wert (t-Test)
ICAM1	27,27	26,49	-1,82	0,38	4,03	0,42	-
ICOSLG	29,612	0,6376	-2,66	0,16	6,30	0,71	0,0708
IL12A	30,75	28,54	-2,00	0,15	10,94	1,53	0,0036
IL12B	37,53	36,63	-3,44	0,20	4,58	1,43	0,4868
IL6	27,37	22,62	-2,12	0,47	64,66	15,85	0,0014
IL7	29,13	17,63	-5,97	0,36	6.900,31	1.214,41	0,0000
IL8	29,06	20,87	-12,73	0,26	711,17	199,53	-
KITLG	25,46	25,94	-9,41	0,42	1,75	0,50	-
LIF	25,17	24,58	-0,75	0,42	3,59	0,74	0,1657
LIFR	28,15	28,47	-1,81	0,30	1,90	0,31	0,1169
MAGEA1	38,34	0,00	-0,90	0,24	-	-	-
MAGEA3	0,00	0,00	-13,41	0,00	-	-	-
MET	20,57	23,18	24,93	0,00	-2,58	0,07	0,0147
MICB	27,59	25,94	1,39	0,25	7,42	1,22	0,0011
MUC1	28,47	29,12	-2,87	0,24	1,49	0,13	0,0004
NAIP	0,00	36,60	-0,57	0,12	-	-	-
NDC80	27,81	30,12	35,37	0,38	-1,97	0,19	0,0211
NFKB1	25,09	23,30	1,09	0,58	8,15	0,80	0,0007
NFKB2	25,68	23,27	-3,02	0,14	12,49	1,51	-
NFKBIA	25,91	21,97	-3,63	0,18	36,52	6,64	-
NFKBIB	26,65	25,55	-5,17	0,27	5,06	0,66	0,0094
NFKBIE	29,83	27,04	-2,33	0,19	16,46	3,20	0,0009
NRP2	23,70	26,47	-4,01	0,28	-2,88	0,05	0,0920
PLIN2	21,64	22,19	1,54	0,21	1,62	0,23	0,0513
PMAIP1	26,32	21,89	-0,68	0,21	50,60	5,92	0,0003
POLE2	31,897	0,3808	1,96	0,22	-3,88	0,60	0,0027
REL	33,24	31,26	0,80	0,37	9,63	2,78	0,0190
RELA	24,46	23,86	-5,65	0,17	3,57	0,50	0,0548
RELB	28,49	30,52	-1,82	0,20	-1,69	0,15	-
RGS2	26,18	27,42	-3,21	0,43	1,02	0,26	0,4971
RIPK2	24,79	22,56	0,01	0,37	11,40	3,26	0,0071
TAP1	26,07	24,40	-3,45	0,42	7,51	1,10	-
TERT	33,63	35,49	-2,89	0,21	-1,44	0,26	-
TLR2	36,12	33,16	0,64	0,57	18,21	1,35	0,0001
TNF	32,77	28,20	-3,36	0,58	58,29	17,85	-
TNFRSF10A	27,35	28,41	-4,18	0,11	1,18	0,39	0,4955
TNFRSF10B	23,02	21,78	-5,79	0,46	5,65	1,16	0,0123
TNFRSF1A	28,17	28,41	-0,16	0,49	2,16	0,89	0,1829
TNFRSF21	24,14	24,57	-2,47	0,30	1,83	0,59	0,3287
TNFRSF9	26,46	23,73	-0,98	0,63	15,63	2,13	-
TNFSF10	22,42	21,68	-0,79	0,49	3,93	0,40	0,1915
TP53BP2	24,90	24,15	-3,95	0,20	3,98	0,54	0,0629
ULBP3	27,92	26,63	-1,97	0,15	5,77	0,96	-
VCAM1	25,74	24,13	-1,98	0,20	7,61	2,63	-

Tabelle 7.6 Liste regulierter Gene - Elektroporation w/o DNA vs. native B25-MOL-Zellen

Sonden-Set ID	Gensymbol	FC	p-Wert	Wahrscheinlichkeit für Expressionsänderung
8102328	CFI	-4.72	2.40E-05	1.0000
8111271	CDH9	-4.71	2.40E-05	1.0000
7975779	FOS	-4.61	4.84E-03	0.6470
8128618	RNU6	-3.88	3.80E-04	0.9942
8095395	UGT2B7	-3.72	5.93E-04	0.9866
8057578	CALCRL	-3.69	8.25E-04	0.9751
8092682	SST	-3.59	3.91E-04	0.9939
8092523	EHHADH	-3.50	3.18E-04	0.9962
8100758	UGT2B7	-3.48	4.78E-03	0.6542
8124337	SLC17A1	-3.48	7.67E-05	0.9998
8174610	LRCH2	-3.45	6.23E-05	0.9999
7965322	KITLG	-3.41	2.39E-04	0.9980
8060997	SPTLC3	-3.30	7.10E-05	0.9998
8014066	EVI2A	-3.26	2.01E-03	0.8939
8000757	DOC2A	-3.18	1.08E-04	0.9995
8065071	FLRT3	-3.14	1.75E-04	0.9988
8111772	DAB2	-3.09	1.08E-04	0.9995
8094441	SLC34A2	-3.01	1.36E-04	0.9993
8117106	RNF144B	-3.01	1.17E-04	0.9994
7966052	CRY1	3.00	8.74E-05	0.9997
7903358	VCAM1	3.05	8.74E-05	0.9997
8047738	NRP2	3.12	5.72E-04	0.9878
7981020	ASB2	3.14	2.68E-04	0.9976
8093104	TM4SF19	3.16	1.08E-04	0.9995
8012896	PMP22	3.16	6.23E-05	0.9999
8021169	LIPG	3.17	5.83E-05	0.9999
8116952	RNU1	3.30	1.43E-03	0.9359
8037374	PLAUR	3.31	5.37E-05	0.9999
8095744	AREG	3.40	4.58E-04	0.9916
8152617	HAS2	3.40	7.10E-05	0.9998
7899502	RNU11	3.42	1.08E-04	0.9995
8005707	MAP2K3	3.43	5.37E-05	0.9999
7914938	SNORA63	3.43	2.92E-03	0.8175
8014755	SNORA21	3.58	3.18E-04	0.9961
7976425	OTUB2	3.73	1.75E-04	0.9989
8147145	ATP6V0D2	3.95	1.95E-03	0.8980
8135069	SERPINE1	4.29	2.40E-05	1.0000
7899392	SCARNA1	4.35	2.39E-04	0.9980
8150509	PLAT	5.36	2.40E-05	1.0000
8099850	TMEM156	5.39	2.83E-04	0.9973
8041422	RASGRP3	6.02	6.09E-05	0.9999
7938291	SNORA3	6.33	1.73E-04	0.9990
8108627	VTRNA1-1	6.94	7.47E-03	0.4712
8067040	NFATC2	7.58	2.40E-05	1.0000
8021081	SLC14A1	7.91	2.40E-05	1.0000
8026875	SNORA68	8.03	7.10E-05	0.9998

Sonden-Set ID	Gensymbol	FC	p-Wert	Wahrscheinlichkeit für Expressionsänderung
7938329	SNORA23	10.63	3.18E-04	0.9961
8130578	SNORA20	12.86	2.40E-05	1.0000

**Tabelle 7.7 Überrepräsentierte funktionelle Gengruppen und Pathways der verstärkt exprimierten Gene, aus der Gegenüberstellung der Genexpressionslevel elektroporierten (EPO) und vierfach transfizierten (4xTx) B25-MOL-Zellen**

Kategorie	Term	Anzahl Gene	%	p Wert
GOTERM_BP_5	GO:0045637 regulation of myeloid cell differentiation	5	6,41	3,47E-04
GOTERM_BP_5	GO:0051249 regulation of lymphocyte activation	5	6,41	5,50E-03
GOTERM_BP_5	GO:0002694 regulation of leukocyte activation	5	6,41	8,20E-03
KEGG_PATHWAY	hsa04670:Leukocyte transendothelial migration	5	6,41	7,47E-03
GOTERM_BP_5	GO:0006935 chemotaxis	8	10,26	1,07E-05
GOTERM_MF_5	GO:0008009 chemokine activity	7	8,97	4,29E-08
GOTERM_MF_5	GO:0042379 chemokine receptor binding	7	8,97	6,34E-08
KEGG_PATHWAY	hsa04060:Cytokine-cytokine receptor interaction	16	20,51	2,48E-11
KEGG_PATHWAY	hsa04062:Chemokine signaling pathway	9	11,54	2,30E-05
GOTERM_BP_5	GO:0042981 regulation of apoptosis	16	20,51	3,98E-06
GOTERM_BP_5	GO:0043067 regulation of programmed cell death	16	20,51	4,50E-06
GOTERM_BP_5	GO:0043066 negative regulation of apoptosis	8	10,26	1,46E-03
GOTERM_BP_5	GO:0043069 negative regulation of programmed cell death	8	10,26	1,58E-03
GOTERM_BP_5	GO:0060548 negative regulation of cell death	8	10,26	1,60E-03
GOTERM_BP_5	GO:0006916 anti-apoptosis	6	7,69	3,03E-03
GOTERM_BP_5	GO:0051173 positive regulation of nitrogen compound metabolic process	13	16,67	4,47E-05
GOTERM_BP_5	GO:0008285 negative regulation of cell proliferation	10	12,82	5,05E-05
GOTERM_BP_5	GO:0031347 regulation of defense response	7	8,97	6,06E-05
GOTERM_BP_5	GO:0031328 positive regulation of cellular biosynthetic process	13	16,67	8,12E-05
GOTERM_BP_5	GO:0009891 positive regulation of biosynthetic process	13	16,67	9,32E-05
GOTERM_BP_5	GO:0045597 positive regulation of cell differentiation	8	10,26	1,06E-04
GOTERM_BP_5	GO:0002697 regulation of immune effector process	6	7,69	1,19E-04
GOTERM_BP_5	GO:0050900 leukocyte migration	5	6,41	1,56E-04
GOTERM_BP_5	GO:0031325 positive regulation of cellular metabolic process	14	17,95	2,19E-04
GOTERM_BP_5	GO:0032103 positive regulation of response to external stimulus	5	6,41	2,45E-04
GOTERM_BP_5	GO:0031349 positive regulation of defense response	5	6,41	4,07E-04
GOTERM_BP_5	GO:0050727 regulation of inflammatory response	5	6,41	4,75E-04
GOTERM_BP_5	GO:0045935 positive regulation of nucleobase, nucleoside, nucleotide and	10	12,82	2,73E-03

Kategorie	Term	Anzahl Gene	%	p Wert
	nucleic acid metabolic process			
GOTERM_BP_5	GO:0010557 positive regulation of macromolecule biosynthetic process	10	12,82	3,73E-03
GOTERM_BP_5	GO:0032270 positive regulation of cellular protein metabolic process	6	7,69	5,11E-03
GOTERM_BP_5	GO:0030097 hemopoiesis	6	7,69	5,39E-03
GOTERM_BP_5	GO:0051247 positive regulation of protein metabolic process	6	7,69	6,09E-03
GOTERM_BP_5	GO:0010628 positive regulation of gene expression	9	11,54	6,27E-03
GOTERM_BP_5	GO:0010604 positive regulation of macromolecule metabolic process	11	14,10	7,12E-03
GOTERM_BP_5	GO:0048534 hemopoietic or lymphoid organ development	6	7,69	8,05E-03
GOTERM_BP_5	GO:0016477 cell migration	6	7,69	1,03E-02
GOTERM_BP_5	GO:0045941 positive regulation of transcription	8	10,26	1,78E-02
GOTERM_BP_5	GO:0045596 negative regulation of cell differentiation	5	6,41	1,99E-02



---

## **Erklärung**

Hiermit erkläre ich, Kerstin Heinrich, an Eides statt, dass die hier vorliegende Dissertation mit dem Thema „Genexpressionsprofil einer vierfach transient genmodifizierten Nierenkarzinomzelllinie“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe weiterer Personen verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

Datum

Unterschrift

---

## Danksagung

Mein Dank gilt in erster Linie Prof. Burghardt Wittig und Dr. Christiane Kleuss unter deren Anleitung die hier vorliegende Arbeit am Foundation Institute for Molecular Biology and Bioinformatics angefertigt wurde. Die Zusammenarbeit war und ist äußerst lehrreich und konstruktiv und ich bin dankbar für das entgegengebrachte Vertrauen und die stetige Motivation. Ihre Bereitschaft Probleme zu analysieren und Ergebnisse zu diskutieren hat maßgeblich zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen.

Ich möchte mich bei allen Kollegen der Firma Mologen AG herzlich für die entspannte und freundschaftliche Arbeitsatmosphäre bedanken; besonders hervorheben möchte ich hier „Meine Mädels“ Jaqueline, Nadine, Stefanie, Lisa, Melanie und Katharina und mich für ihre moralische und tatkräftige Unterstützung bei der Laborarbeit bedanken. Ihre Freundschaft und Hilfsbereitschaft hat mir die Durchführung dieser Promotion sehr erleichtert.

Herrn Prof. Raffaele Calogero und seiner Arbeitsgruppe an der Universität Turin gilt mein Dank für die Einführung in die Arbeit mit R, dem Bioconductor und OnechannelGUI. Der Kurs an dem ich hier teilnehmen durfte war mir eine große Hilfe und Erleichterung bei der Analyse und Auswertung der Microarray-Daten.

Ein besonderer Dank gebührt meiner Familie, die mich über die langen Jahre meines Studiums bis heute bedingungslos unterstützt und motiviert hat. Ganz besonders möchte ich mich bei meinem Mann Armin bedanken, für seine Liebe und Geduld sowie die Ermutigung immer weiter voranzuschreiten. Ohne seine Unterstützung und die meiner Familie wäre die Durchführung dieser Promotion nicht möglich gewesen. Ein besonderer Dank gilt meinem Bruder Stefan, der mich bei der Optimierung des Layouts und der Eliminierung der letzten Macken tatkräftig zur Seite stand. Außerdem möchte ich meinen Freunden danken, die mich steht's motiviert und unterstützt haben und scheinbar nie an mir zweifeln.