

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
27. Dezember 2007 (27.12.2007)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2007/147601 A2

(51) Internationale Patentklassifikation:

A01N 1/02 (2006.01) G01N 1/42 (2006.01)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2007/005488

(22) Internationales Anmeldedatum:

21. Juni 2007 (21.06.2007)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:

06012752.9 21. Juni 2006 (21.06.2006) EP

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): **SIRION GMBH** [DE/DE]; Am Klopferspitz 19, 82152 Martinsried (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **THIRION, Christian** [DE/DE]; Lipowskystr. 17, 81373 München (DE).
BEHREND, Lars [DE/DE]; Camerloherstr. 125, 80689 München (DE).

(74) Anwalt: **BOHMANN, Armin, K.**; Bohmann & Loosen, Nymphenburger Str. 1, 80335 München (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL,

AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: METHOD FOR FREEZING AND STORING OF CELLS

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUM EINFRIEREN UND LAGERN VON ZELLEN

(57) Abstract: The invention relates to a method for freezing and storing of cells in a vessel comprising the following steps: a) freezing the cells as a cell suspension down to a storage temperature and b) storing at this temperature, the storing of the cells in the vessel taking place under a gas-tight seal or in an inert atmosphere, characterised in that the cells are recombinant cells.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren zum Einfrieren und Lagern von Zellen in einem Gefäß umfassend die Schritte a) Einfrieren der Zellen als Zellsuspension auf eine Lagertemperatur und b) Lagern bei dieser Temperatur, wobei das Lagern der Zellen in dem Gefäß unter gasdichtem Abschluss oder in einer inerten Atmosphäre erfolgt, dadurch gekennzeichnet, dass die Zellen rekombinante Zellen sind.



WO 2007/147601 A2

Verfahren zum Einfrieren und Lagern von Zellen

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zum Einfrieren und Lagern von Zellen in einem Gefäß, durch das Verfahren herstellbare eingefrorene Zellen, Zellbibliotheken umfassend derartige eingefrorene Zellen sowie Verwendungen derartiger eingefrorener Zellen.

Zellen können aus dem Gewebeverband herausgelöst werden und auf Zellkulturgefäßen oder in Suspensionen kultiviert werden. Solche Zellkulturen sind in der Biologie ein wichtiges Untersuchungsobjekt.

Eine wichtige Rolle für die Aufklärung von Funktionen von Genen spielen dabei tierische und menschliche Zellen, bei denen einzelne Gene ausgeschaltet wurden. In solchen Zellen kann die Funktion der betreffenden Gene analysiert werden. Für das Ausschalten von einzelnen Genen sind inzwischen, unter anderem, kurze, doppelsträngige Ribonukleinsäuren (dsRNA) gebräuchlich, die aufgrund ihrer Fähigkeit, die Expression eines gewünschten Gens zu inhibieren, allgemein als small interference RNAs (siRNAs) bezeichnet werden. Wie hierin noch detaillierter beschrieben, lagert sich eine siRNA an eine mRNA mit homologer Sequenzen an und katalysiert deren Abbau, so dass die Bildung des Genproduktes (Proteins) unterdrückt wird. Dieser auch als RNA-Interferenz (RNAi) bezeichnete Prozess ermöglicht es gezielt ein Gen mit einer zu der verwendeten siRNA homologen Sequenz auszuschalten. Nach dem Stand der Technik können mit RNAi mit vielen siRNAs unterschiedlicher Sequenz Gruppen von Genen oder sogar die Gesamtheit der Gene, d.h. das Genom, eines Organismus auf bestimmte Funktionen in zellulären Assays untersucht werden. Eine Vielzahl gegen unterschiedliche Gene gerichteter siRNAs werden siRNA-Bibliotheken genannt.

Derartige zelluläre Assays müssen standardisiert sein. Eine derartige Standardisierung betrifft auch die Zellen selbst, da diese zum einen in Abhängigkeit von der jeweiligen Handhabung einen unterschiedlichen physiologischen Zustand aufweisen können und sich zum anderen auch in Folge von Mutationen im weitesten Sinne die Funktion von Genen verändern kann und insoweit das Ergebnis derartiger Assays gegebenenfalls verändert bzw. verfälscht sein kann. In der Literatur ist eine Vielzahl solcher insbesondere häufig in Zellkultur auftretenden Mutationen beschrieben (Rubin H et al., Proc. Natl Acad. Sci. USA, 87(1):482-486, 1990; Yao A and Rubin H, Proc.

Natl Acad. Sci. USA, 89(16):7486-7490; Saunders et al., Proc. Natl Acad. Sci. USA, 87(1):303-308, 2000; Grigoraova M et al., Cytogenet Genome Res. 104(1-4):333-40, 2004). Dieses gilt ganz besonders für rekombinante Zellen bzw. genetisch veränderte Zellen.

Im Stand der Technik wird versucht, dieser Entwicklung dadurch zu begegnen und eine Standardisierung dadurch zu gewährleisten, dass in zellbasierten Tests oder Testsystemen zu verwendende Zellen ansatzweise hergestellt und dann in flüssigem Stickstoff gelagert werden. Dabei ist es jedoch erforderlich, die solchermaßen eingefrorenen Zellen aufzutauen und in entsprechende, für die zellbasierten Tests geeignete Zellkulturgefäße zu überführen, oder aber die genetisch veränderten Zellen bereits auf geeignete Zellkulturgefäße wie beispielsweise Multititerplatten zu verteilen und diese Platten in flüssigem Stickstoff bis zu ihrer Verwendung zu lagern. Die Lagerung in flüssigem Stickstoff ist jedoch mit einem erheblichen Aufwand an Ressourcen verbunden.

Entsprechend liegt der vorliegenden Erfindung die Aufgabe zu Grunde, ein Verfahren bereitzustellen, welches erlaubt, dass rekombinante Zellen hergestellt werden und diese über mehrere Monate in gleichbleibender Qualität verfügbar sind und insbesondere die genetische Veränderung, die durch den rekombinanten Charakter die zelleigene, gezielt herbeigeführte Veränderung unter Beibehaltung der Vitalität der Zellen über einen langen Zeitraum gewährleistet ist.

Eine weitere Aufgabe besteht darin, entsprechende rekombinante Zellen bereitzustellen, die insbesondere für die Verwendung in einem zellbasierten Test geeignet sind.

Schließlich ist es eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung, ein Verfahren bereitzustellen, das die Produktion von Zellen mit einer heterologen Nukleinsäure auch in für zellbasierte Tests vorgesehenen Zellkulturgefäßen in ausreichender Anzahl möglich macht und durch eine langfristige Vorratshaltung eine Standardisierung der für genetische Untersuchungen verwendeten Zellen erlaubt.

Erfindungsgemäß wird diese Aufgabe gelöst durch den Gegenstand der unabhängigen Ansprüche. Besonders bevorzugte Ausführungsformen ergeben sich aus den Unteransprüchen.

In einem ersten Aspekt wird das Problem erfindungsgemäß gelöst durch ein Verfahren zum Einfrieren und Lagern von Zellen in einem Gefäß umfassend die Schritte

- a) Einfrieren der Zellen als Zellsuspension in einem Medium auf eine Lagertemperatur und
- b) Lagern bei dieser Temperatur,

wobei das Lagern der Zellen in dem Gefäß unter gasdichtem Abschluss oder in einer inerten Atmosphäre erfolgt,

und die Zellen rekombinante Zellen sind.

In einer bevorzugten Ausführungsform sind die Zellen und/oder das diese enthaltende Medium gegenüber einer inerten Atmosphäre exponiert.

In einer Ausführungsform enthalten die rekombinanten Zellen eine heterologe Nukleinsäure.

In einer Ausführungsform ist vorgesehen, dass zumindest ein Teil, bevorzugterweise mindestens 10 %, 20 %, 50 %, 80 % oder 90 % der Zellen eine heterologe Nukleinsäure enthalten.

In einer Ausführungsform ist vorgesehen, dass die Zellen vor dem Einfrieren hypoxischen oder anoxischen Bedingungen ausgesetzt waren.

In einer Ausführungsform ist vorgesehen, dass die heterologe Nukleinsäure die Vitalität und/oder die Proliferation der Zellen verringert.

In einer Ausführungsform ist vorgesehen, dass die Vitalität und/oder Proliferation der Zellen nach dem Auftauen der Zellen durch die heterologe Nukleinsäure verringert wird.

In einer Ausführungsform ist vorgesehen, dass die heterologe Nukleinsäure ein oder mehrere Gene oder die Transkriptionsprodukte oder Translationsprodukte davon beeinflusst, bevorzugt inhibiert oder abbaut, wobei das Gen ausgewählt ist aus der Gruppe die Gene umfasst, die die Apoptose, Nekrose oder Seneszenz betreffen, vermitteln oder steuern; Gene, die die Adhäsionsfähigkeit der Zellen betreffen, vermitteln oder steuern; Gene, die essentielle Gene des Stoffwechsels sind; und Gene, die die Zellstabilität und Zellproliferation betreffen, vermitteln oder steuern. Beispiele für solche Gene sind Enzyme des Zitronensäurezyklus, des Nukleotidstoffwechsels und der Atmungskette einschließlich, aber nicht beschränkt auf Citrat-Isomerase, ATP

Synthase, NADH-Q Oxidoreduktase, Q-Cytochrome *c* Oxidoreduktase, und Cytochrome *c* Oxidase, Gene, deren Derogulation Apoptose, Seneszenz oder Nekrose einer rekombinanten Zelle induzieren können einschließlich, aber nicht beschränkt auf pRb, p53, Lyn Kinase, Checkpoint Kinasen wie beispielsweise Polo-like kinase 1 (Plk1), checkpoint kinase 1 (Chk1), BubR1 Kinase, MAD, Wwe1 kinase, und Gene, die essentiell für die Zellteilung sind wie beispielsweise das Gen für Tubulin.

In einer Ausführungsform ist vorgesehen, dass die heterologe Nukleinsäure vor dem Einfrieren nicht zur Expression gebracht wird.

In einer Ausführungsform ist vorgesehen, dass die heterologe Nukleinsäure nach dem Auftauen der Zellen zur Expression gebracht wird.

In einer Ausführungsform ist vorgesehen, dass die heterologe Nukleinsäure unter der Kontrolle eines induzierbaren Promotors steht.

In einer Ausführungsform ist vorgesehen, dass die heterologe Nukleinsäure so vor dem Einfrieren der Zellen in die Zelle eingebracht wird, dass die heterologe Nukleinsäure vor dem Einfrieren nicht mehr zur Expression gebracht werden kann.

In einer Ausführungsform ist vorgesehen, dass die heterologe Nukleinsäure durch einen viralen Vektor in die Zelle eingebracht wird und bevorzugterweise der virale Vektor vor dem Einfrieren der Zellen in der Zelle nicht transkribiert oder repliziert wird.

In einer Ausführungsform ist vorgesehen, dass der virale Vektor in der Zelle transkribiert oder repliziert wird in einem Umfang, so dass keine durch die heterologe Nukleinsäure bedingte Veränderung der Zellaktivität und/oder Zellproliferation vor dem Einfrieren der Zellen auftritt.

In einer bevorzugten Ausführungsform codiert die heterologe Nukleinsäure für ein heterologes Molekül, wobei das heterologe Molekül bevorzugterweise ausgewählt ist aus der Gruppe, die Antisense-Moleküle, RNAi-vermittelnde Moleküle, Aptamere, Anticaline, Peptid-Aptamere und Antikörper umfasst.

In einer noch bevorzugteren Ausführungsform tritt das heterologe Molekül mit einem oder mehreren zellulären Molekülen in Wechselwirkung.

In einer Ausführungsform bedingt das heterologe Molekül einen Knock-Down eines oder mehrerer zellulärer Moleküle, bevorzugterweise nach Expression der heterologen Nukleinsäure.

In einer Ausführungsform ist das heterologe Molekül ein RNAi-vermittelndes Molekül, wobei bevorzugterweise das RNAi-vermittelnde Molekül ausgewählt ist aus der Gruppe, die shRNAi, siRNAs, esiRNAs und miRNAs umfasst.

In einer Ausführungsform wird die inerte Atmosphäre bedingt oder hergestellt durch Verringerung des Sauerstoffpartialdruckes oder durch Begasung mit einem Schutzgas.

In einer Ausführungsform erfolgt die Verringerung des Sauerstoffpartialdruckes vor dem Einfrieren der Zellen.

In einer Ausführungsform sind die Zellen in einem oder mehreren Gefäßen enthalten.

In einer bevorzugten Ausführungsform ist das Gefäß ausgewählt aus der Gruppe, die Multiwellplatten, Zellkulturschalen und Zellkulturflaschen umfasst.

In einer noch bevorzugteren Ausführungsform ist die Multiwellplatte ausgewählt aus der Gruppe, die 6-Well-Platten, 12-Well-Platten, 24-Well-Platten, 48-Well-Platten, 96-Well-Platten, 384-Well-Platten und 1536-Well-Platten umfasst.

In einer Ausführungsform wird der Sauerstoffpartialdruck in dem Gefäß auf etwa 52,5 mbar bis 0,21 mbar, bevorzugterweise auf etwa 26 mbar bis 0,21 mbar, bevorzugterweise auf etwa 13 mbar bis 0,21 mbar vermindert.

In einer Ausführungsform erfolgt der gasdichte Abschluss durch Einschweißen des Gefäßes in einem gasdichten Folienschlauch oder durch Aufbringen einer gasdichten Klebefolie.

In einer Ausführungsform verbleibt nach gasdichtem Abschluss des Gefäßes ein Restvolumen an Luft in dem Gefäß.

In einer bevorzugten Ausführungsform beträgt das Restvolumen bis zu dem 17,5-fachen, bevorzugterweise bis zu dem 15-fachen, bevorzugtererwise bis zu dem 7-fachen und am bevorzugtesten gleich dem Volumen der Zellsuspension in dem Gefäß.

In einer Ausführungsform ist das Schutzgas ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Stickstoff, Helium, Neon, Argon, Krypton und Xenon.

In einer Ausführungsform sind die Zellen eukaryotische Zellen, bevorzugterweise tierische Zellen und bevorzugtererwise humane Zellen, insbesondere isolierte humane Zellen.

In einer weiteren Ausführungsform sind die Zellen verschieden von menschlichen Stammzellen und/oder menschlichen Embryozellen.

In einer weiteren Ausführungsform sind die Zellen verschieden von Maussperma.

In einer bevorzugten Ausführungsform sind die Zellen ausgewählt aus der Gruppe umfassend Hela S3 (ATCC-Nr.:CCL-2.2); LoVo (ATCC-Nr.: CCL-229); L929 (ATCC-Nr.:CCL-1), HT-29 (ATCC-Nr.: HTB-38); Caco-2 (ATCC-Nr.: HTB-37); Hep G2 (ATCC-Nr.:HTB-8085); IMR-90 (ATCC-Nr.:CCL-184); PANC-1 (ATCC-Nr.:CRL-1469); DLD-1 (ATCC-Nr.:CCL-221); HCT-15 (ATCC-Nr.:CCL-225); Capan-1 (ATCC-Nr.:HTB-79); BxPC-3 (ATCC-Nr.:CRL-1687); MCF7 (ATCC-Nr.:HTB-22); SW480 (ATCC-Nr.:CCL-228); U-138 MG (ATCC-Nr.:HTB-16); HCT116 (ATCC-Nr.: CCL-247); und A549 (ATCC-Nr.: CCL-185).

In einer Ausführungsform ist die heterologe Nukleinsäure durch einen oder mehrere Vektoren in die Zellen eingeführt, wobei die Vektoren bevorzugt aus der Gruppe ausgewählt sind umfassend DNA-basierte Plasmidvektoren, rekombinante Replikations-defiziente Adenoviren, Adeno-assoziierte Viren, Bacculoviren, Sendaiviren, Herpes simplex Typ 1 Viren, Lentiviren und Retroviren.

In einer Ausführungsform erfolgt das Lagern bei einer Temperatur zwischen etwa -105°C und -50°C , bevorzugterweise zwischen -65°C und -95°C und bevorzugtererwise zwischen etwa -75°C und -85°C .

In einer Ausführungsform wird das Einfrieren durch Kontakt wenigstens einer Fläche des Gefäßes mit einem Material mit geeigneter Wärmeleitfähigkeit erreicht, wobei das Material auf eine geeignete Temperatur vorgekühlt ist.

In einer bevorzugten Ausführungsform ist das Material ein Metall.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform beträgt die Temperatur, auf die das Material vorgekühlt ist, etwa zwischen -90°C und -50°C und bevorzugterweise zwischen etwa -85°C und -65°C .

In einer Ausführungsform werden die Zellen ohne Verwendung von flüssigem Stickstoff gelagert.

In einer Ausführungsform sind die rekombinanten Zellen erhältlich durch die folgenden Schritte:

- i) Einführen der heterologen Nukleinsäure und
- ii) Herbeiführen des Knock-Downs.

In einer bevorzugten Ausführungsform umfasst das Verfahren weiter die Schritte:

- iii) Überführen der Zellen in ein Einfriermedium und optional
- iv) Überführen der Zellen in ein Gefäß wie in einer Ausführungsform der verschiedenen Aspekte der vorliegenden Erfindung definiert.

In einer bevorzugten Ausführungsform erfolgt das Einführen der heterologen Nukleinsäure und/oder das Herbeiführen des Knock-Downs in Kulturmedium und die Zellen werden direkt in Kulturmedium eingefroren.

In einer Ausführungsform umfassen die Zellen eine Vielzahl von Zellen und die Zellen unterscheiden sich in der Art der eingeführten heterologen Nukleinsäure.

In einer Ausführungsform umfassen die Zellen eine Vielzahl von Zellen und unterscheiden sich in der Art des Knock-Downs.

In einem zweiten Aspekt wird das Problem erfindungsgemäß gelöst durch eingefrorene Zellen, herstellbar oder erhältlich nach einem Verfahren gemäß dem ersten Aspekt, wobei durch die heterologe Nukleinsäure eine transiente Veränderung der Zellen erfolgt oder erfolgt ist, wobei die transiente Veränderung der Zellen unter Beibehaltung der Zellvitalität stabilisiert ist.

In einer Ausführungsform des zweiten Aspektes sind die eingefrorenen Zellen, herstellbar oder erhältlich nach einem Verfahren gemäß dem ersten Aspekt, wobei durch die heterologe Nukleinsäure eine stabile Veränderung der Zellen erfolgt ist, wobei die stabile Veränderung der Zellen unter Beibehaltung der Zellvitalität erfolgt ist.

In einer Ausführungsform des zweiten Aspektes ist die Zellvitalität für einen längeren Zeitraum, insbesondere bei Lagerung in einem Tiefkühlschrank, gegeben.

In einem dritten Aspekt wird das Problem erfindungsgemäß gelöst durch eine Zellbibliothek umfassend eingefrorene Zellen gemäß dem zweiten Aspekt, wobei die Zellbibliothek aus einer Vielzahl von Zellpopulationen besteht und wobei eine jede Zellpopulationen der Zellbibliothek mit einer Art oder Spezies einer heterologen Nukleinsäure transfiziert, oder mit einem DNA-Vektor, der zumindest eine Art oder Spezies einer heterologen Nukleinsäure exprimiert, transduziert oder infiziert ist, wobei die heterologe Nukleinsäure verschieden ist von einer oder mehreren heterologen Nukleinsäuren, mit denen eine, mehrere, oder alle anderen Zellpopulationen der Zellbibliothek transfiziert, transduziert oder infiziert ist.

In einem vierten Aspekt wird das Problem erfindungsgemäß gelöst durch die Verwendung von eingefrorenen Zellen gemäß dem zweiten Aspekt oder einer Zellbibliothek gemäß dem dritten Aspekt in einem zellbasierten Testsystem, bevorzugterweise in einem Hochdurchsatzscreening (HTS).

In einer Ausführungsform des vierten Aspektes werden die eingefrorenen Zellen gemäß dem zweiten Aspekt oder die Zellbibliothek gemäß dem dritten Aspekt verwendet, wobei die Zellen direkt nach dem Auftauen in Einfriermedium in dem Gefäß ohne Passagieren verwendet werden, insbesondere in einem zellbasierten Testsystem verwendet werden.

Die Begriffe Art einer heterologen Nukleinsäure und Spezies einer heterologen Nukleinsäure werden hierin bevorzugterweise synonym verwendet.

Die vorliegenden Erfinder haben überraschenderweise festgestellt, dass das Verfahren zum Einfrieren und Lagern von Zellen in einem Gefäß umfassend die Schritte

- a) Einfrieren der Zellen als Zellsuspension auf eine Lagertemperatur und
- b) Lagern bei dieser Temperatur,

wobei das Lagern der Zellen unter gasdichtem Abschluss oder in einer inerten Atmosphäre erfolgt, auch auf rekombinante Zellen angewandt werden kann. Grundsätzlich ist ein derartiges Verfahren in der internationalen Patentanmeldung PCT/EP2005/013170 beschrieben, wobei dort allerdings nicht die Anwendbarkeit des Verfahrens auf rekombinante Zellen offenbart wird.

Die vorliegenden Erfinder haben jedoch überraschenderweise festgestellt, dass bei Realisierung des erfindungsgemäßen Verfahrens rekombinante Zellen und insbesondere solche, die eine heterologe Nukleinsäure enthalten, insbesondere in für zellbasierte Tests geeigneten Reaktionsgefäßen eingefroren und nach praktisch unbegrenzter Lagerung wieder aufgetaut und in solchen zellulären Tests verwendet werden können, ohne dass der rekombinante Charakter der Zellen oder die Zellvitalität in einem Umfang beeinflusst werden würde, der die Verwendung der Zellen in derartigen Tests nicht mehr erlauben würde, oder zumindest die Aussagekraft derartiger zellulärer Tests nicht nachhaltig nachteilig beeinflusst. Die vorliegenden Erfinder haben auch gezeigt, dass das erfindungsgemäße Verfahren besonders dazu geeignet ist, Zellen mit gezielter Ausschaltung eines oder mehrerer Gene in ausreichender Menge und gleich bleibender Qualität zu Verfügung zu stellen und langfristig vorzuhalten.

In einem weiteren Aspekt haben die vorliegenden Erfinder überraschenderweise festgestellt, dass das hierin beschriebene Verfahren auch geeignet ist, wirksam rekombinante Zellen bereitzustellen. Dabei ist insbesondere vorgesehen, dass derartige Zellen rekombinante Zellen sind, die typischerweise eine heterologe Nukleinsäure enthalten und diese auch exprimieren, wobei bevorzugterweise die Expression der heterologen Nukleinsäure mit einer Verringerung der Vitalität und/oder der Proliferation(sfähigkeit) der Zellen einhergeht. Typischerweise wird bei der Bereitstellung derartiger rekombinanter Zellen das Problem auftreten, dass diese nach einer vergleichsweise kurzen Zeit an Vitalität und/oder Proliferation(sfähigkeit) verlieren, wenn die heterologe Nukleinsäure mit der Zelle in der Form interagiert, dass diese verringert werden. Typische

Moleküle, die bzw. deren Inhibierung oder Beeinflussung ein derartiges Verhalten bedingen, sind den Fachleuten bekannt und sind insbesondere solche, die die Apoptose betreffen, vermitteln oder steuern, die Adhäsionsfähigkeit der Zellen betreffen, vermitteln oder steuern, essentielle Stoffwechselmoleküle sowie solche, die direkt die Zellvitalität und Zellproliferation betreffen, vermitteln oder steuern. Zwar kann die unmittelbare Wirkung derartiger heterologer Nukleinsäuren dadurch verringert werden, dass die Expression der heterologen Nukleinsäure unter dem Einfluss eines induzierbaren Promotors steht, jedoch ist nicht immer gewährleistet, dass derartige Promotoren ausreichend „dicht“ sind, so dass unter Umständen doch, zumindest eine schleichende, Expression der heterologen Nukleinsäure erfolgt mit der Folge, dass die Vitalität und/oder Proliferation(sfähigkeit) der Zellen verringert wird. Insbesondere dann, wenn Bibliotheken von rekombinanten Zellen in Hochdurchsatzsystemen verwendet werden sollen, die an einer anderen Stelle als dem Ort, wo die rekombinanten Zellen erzeugt werden, durchgeführt werden sollen, kann dies in höchstem Maße problematisch werden und die faktische Durchführung derartiger Tests nicht erlauben. Vor diesem Hintergrund haben die vorliegenden Erfinder nun festgestellt, dass das Einfrieren derartiger Zellen geeignet ist, dieses Problem zu verringern. Dies ist insbesondere dann von Vorteil, wenn die Expression der heterologen Nukleinsäure nicht unter der Kontrolle eines induzierbaren Promotors steht, gleichwohl dies im Rahmen der Erfindung umfasst ist. Dies ist auch dann von Vorteil, wenn Vektoren, insbesondere aber virale Vektoren verwendet werden, um die heterologe Nukleinsäure in die Zellen einzuführen, wie sie hierin im Zusammenhang mit anderen Aspekten und Ausführungsformen der Erfindung beschrieben sind. Dabei wird so vorgegangen, dass die Infektion der Zelle mit dem Vektor, der die heterologe Nukleinsäure oder einen Teil davon bzw. eine Nukleinsäure, die für die Steuerung der Expression der heterologen Nukleinsäure verantwortlich ist, in die Zelle eingebracht wird, jedoch eine Expression der von dem viralen Vektor codierten Nukleinsäure nicht oder nicht mehr erfolgt. Dies wird typischerweise dadurch erreicht, dass der Zeitpunkt zwischen der Infektion und dem Beginn des Einfrierens der Zellen so gewählt wird, dass eine derartige Expression der besagten Nukleinsäure und insbesondere eine Replikation des viralen Vektors nicht mehr möglich ist. Gleichwohl wird nach dem Auftauen eine entsprechende Expression der heterologen Nukleinsäure oder der durch den Virus in die Zelle transfizierten Nukleinsäure erfolgen und dann die Wirkung der besagten Nukleinsäure auf die Zelle untersuchbar sein. Das vorstehend beschriebene Prinzip einer zeitlich nach dem Auftauen der Zellen zu erfolgenden Expression bzw. Wirkung von heterologen Nukleinsäuren ist auf praktisch alle Vektoren, einschließlich, aber nicht beschränkt auf Plasmid-basierte Vektoren, Nukleinsäuren, welche in eine Zelle eingebracht werden, sowie Proteine, welche in eine Zelle eingeschleust werden, anwendbar.

Überraschender Weise haben die Erfinder weiterhin festgestellt, dass die zeitlich nach dem Einfrieren erst nach dem Auftauen der Zellen erfolgende Expression bzw. Wirkung der heterologen Nukleinsäure auch dazu führt, dass die Vitalität solcher Zellen nach dem Auftauen erhöht ist bzw. überhaupt noch vorhanden ist verglichen mit dem Zustand der Zellen bei Expression der heterologen Nukleinsäure vor dem Einfrieren. Insbesondere bei heterologen Nukleinsäuren, die eine Verringerung der Vitalität und/oder der Proliferation(sfähigkeit) der Zellen hervorrufen, führt der Einfrierprozess typischerweise zu einem starken oder völligen Verlust der Vitalität, insbesondere wenn die Expression der heterologen Nukleinsäure vor dem Einfrieren erfolgt. Demnach haben die Erfinder mit der zeitlich erst nach dem Einfrierprozess hervorgerufenen Expression bzw. Wirkung von heterologen Nukleinsäuren ein Verfahren gefunden, das es erlaubt, Zellen mit solchen rekombinanten Nukleinsäuren zu verändern und an einem anderen Ort als dem der Herstellung zu verwenden.

Dieser Aspekt ist auch wichtig, wenn Bibliotheken von rekombinanten Zellen in Hochdurchsatzsystemen verwendet werden sollen. Den Fachleuten sind eine Vielzahl solcher heterologen Nukleinsäuren bekannt, die eine Verringerung der Vitalität und/oder der Proliferation(sfähigkeit) der Zellen hervorrufen. Da eine große Anzahl von rekombinanten Nukleinsäuren häufig oder in der Mehrzahl der Fälle immer auch rekombinante Nukleinsäuren einhält, die zu einer Verringerung der Vitalität und/oder der Proliferation(sfähigkeit) der Zellen führen oder führen können, wird durch das beschriebene Verfahren sicher gestellt, dass Bibliothek von rekombinanten Zellen zur Verfügung gestellt werden können, die an einer anderen Stelle als dem Ort, wo die rekombinanten Zellen erzeugt werden, benutzt werden können.

Der Zeitabstand, der erforderlich ist, um diese Nichtexpression der durch den viralen Vektor in die Zelle eingebrachten Nukleinsäure oder der heterologen Nukleinsäure zu bedingen, wird von der Art des viralen Vektors abhängen und die entsprechenden Zeiträume sind den Fachleuten auf dem Gebiet bekannt bzw. durch einfache Routineexperimente zu bestimmen.

Bevor auf weitere Ausführungsformen und Vorteile der vorliegenden Erfindung eingegangen wird, sollen im Folgenden einige der im Rahmen der vorliegenden Erfindung verwendeten Begriffe erläutert werden, wobei diese neben der spezifisch hierin angegebenen Bedeutung noch jene Bedeutung aufweisen können, wie sie den Fachleuten auf dem Gebiet geläufig und für diese offenkundig sind.

Der Begriff „Zelle“ bezeichnet in einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung eine eukaryotische Zelle, das heißt eine Zelle mit echtem Zellkern und charakteristischer Differenzierung des Zytoplasmas. Eine solche Zelle kann im Rahmen der Erfindung eine tierischen oder menschlichen Ursprungs sein.

Der Begriff „rekombinante Zelle“ bezeichnet in einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung eine eukaryotische Zelle, welche bevorzugterweise durch Einbringen von oder Behandlung mit heterologen Nukleinsäuren, Peptiden, Proteinen, oder verwandten biologisch aktiven Substanzen verändert wurde. Verwandte biologisch aktive Substanzen sind insbesondere solche, die im weiteren Sinne wie hierin definiert zu einer Änderung mindestens einer Eigenschaft der solchermaßen behandelten Zelle verglichen mit der nicht-behandelten Zelle führen.

Der Begriff „Multititerplatte“ bezeichnet in einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung eine Platte mit mehreren „Wells“, die auch als Kavitäten oder Näpfe bezeichnet werden, zur Aufnahme von Zellen mit Kulturmedium verstanden. Eine solche Platte kann vorteilhafterweise 4, 6, 12, 24, 48, 96, 384 oder 1536 solcher Wells aufweisen.

Der Begriff „Zellkulturgefäß“ bezeichnet in einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung eine Multititerplatte in ihrer Gesamtheit oder ein „Well“ einer Multititerplatte. Ebenso bezeichnet in einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung der Begriff Zellkulturgefäß für die Zellkultur übliche Gefäße wie Kulturflaschen oder Kulturschalen in unterschiedlichen Größen.

Der Begriff „dsRNA“ (doppelsträngige RNA) umfasst RNA Moleküle, die durch Basenpaarung komplementärer Bereiche einen oder mehrerer Doppelstränge innerhalb ihrer Struktur aufweisen. Zu dsRNA gehören shRNAs, siRNA, miRNA oder lange doppelsträngige RNAs (LdsRNA).

Der Begriff „shRNA“ bezeichnet eine kurze Ribonukleinsäure (RNA) die zwei miteinander paarende Stränge besitzt (sense- und antisense-Strang), die zu einem Bereich eines Gens homolog sind. Der sense- und antisense-Strang sind durch eine internen Haarnadelstruktur miteinander verbunden.

Der Begriff „siRNA“ beschreibt eine kurz RNA, die zwei miteinander paarende Stränge von etwa 21-23 Nukleotiden Länge besitzt (sense- und antisense-Strang), die zu einem Bereich eines Gens homolog sind und den sequenzspezifischen Abbau einer Ziel-mRNA induzieren. In biologischen Systemen entsteht eine siRNA durch die Spaltung einer shRNA durch den Nukleasekomplex Dicer, so dass die siRNA in den RNA induced silencing complex (RISC) aufgenommen werden kann.

Der Begriff „Transfektion“ bezeichnet in einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung das Einbringen von heterologen Nukleinsäuren, Proteinen, oder anderen Molekülen, welche in der Zelle eine transiente genetische Veränderung hervorrufen können, durch chemische Verfahren, wie z.B. der Kalizium-Phosphat-Präzipitation, Lipofektion, Transfektion unter Verwendung von kationischer Polymer, Transfektion mittels physikalischer Methoden, wie z.B. Elektroporation, Mikroinjektion, Gen/Partikel-Gun, mittels biologischer Verfahren unter Verwendung von Viren oder viralen Vektoren, Konjugaten zur Rezeptor-vermittelten oder Antikörper-vermittelten Transfektion.

Der Begriff „Transduktion“ bezeichnet in einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung das Einbringen von rekombinanter DNA, welche in der Zelle eine transiente genetische Veränderung hervorrufen kann, mittels Viren, welche ihr Wirtsgenom nicht in der Zelle vermehren können. Diese Viren werden als replikations-defiziente Viren, oder auch „Virusbasierte Vektorsysteme“ bezeichnet.

Der Begriff „Infektion“ bezeichnet in einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung das Einbringen von rekombinanter DNA, welche in der Zelle eine transiente genetische Veränderung hervorrufen kann, mittels Viren, welche ihr Wirtsgenom in der Zelle vermehren können. Diese Viren werden als replikations-kompetente Viren bezeichnet.

Der Begriff „DNA-Vektor“ bezeichnet in einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung heterologen Desoxyribonukleinsäuren (DNA), welche für die Transfektion, Transduktion oder Infektion geeignet sind, und welche bevorzugterweise ein Plasmid, eine rekombinante virale DNA, Phagen-DNA, chromosomale DNA, oder andere Formen von DNA sind.

Der Begriff „Lagertemperatur“ bezeichnet in einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung die Temperatur, bei der die Zellen vorzugsweise in einem Tiefkühlschrank gela-

gert werden. Besonders bevorzugte Lagertemperaturen sind dabei bevorzugterweise zwischen etwa - 90°C und - 50°C und bevorzugterweise zwischen etwa - 80°C und - 86°C.

Der Begriff „Wärmekapazität“ bezeichnet nach der allgemein üblichen Definition, das Vermögen eines Körpers, Energie in Form von thermischer Energie zu speichern. Die Wärmekapazität C gibt die Wärmemenge Q (in Joule) an, die zu- oder abgeführt werden muss um die Temperatur T (in Kelvin) eines Körper zu erhöhen oder zu erniedrigen. Die Wärmekapazität eines Körpers ist direkt proportional zu dessen Volumen.

$$C = \frac{\partial Q}{\partial T}$$

Der Begriff „gasdichter Abschluss“ bezeichnet in einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung den Verschluss des Zellkulturgefäßes gegenüber seiner Umgebung, so dass kein Gasaustausch oder im Wesentlichen kein Gasaustausch zwischen Zellkulturgefäß und Umgebung stattfinden kann.

Der Begriff „inerte Gase“ bezeichnet in einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung nicht reagierende bzw. reaktionsarme Gase, einschließlich Edelgase, die nicht für die Energiegewinnung geeignet sind.

Der Begriff „inerte Atmosphäre“ bezeichnet in einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung eine Atmosphäre unter Ausschluss von reaktiven Gasen. Eine inerte Atmosphäre kann beispielsweise durch die Begasung mit inerten Gasen oder durch das Anlegen eines Vakuums erreicht werden. Eine inerte Atmosphäre ist gemäß einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung auch eine Atmosphäre mit verringertem Sauerstoffpartialdruck oder ein partielles Vakuum. In einer bevorzugten Ausführungsform ist eine inerte Atmosphäre eine Atmosphäre, die eine Sauerstoffkonzentration von weniger als 20,8 % aufweist, d. h. geringer ist als die Sauerstoffkonzentration unter normalen atmosphärischen Bedingungen. In einer weiteren Ausführungsform beträgt die Sauerstoffkonzentration 20 %, 19 %, 18 %, 17 %, 16 %, 15 %, 14 %, 13 %, 12 %, 11 %, 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 % oder 0 %.

Der Begriff „genetisches Element“ bezeichnet in einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung eine Ribonukleinsäure oder Desoxyribonukleinsäure mit einer Funktion bei der Regulation von Genen bzw. deren Genprodukte.

Der Begriff „essentielle Gene“ bezeichnet in einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung Gene, für welche der Knock-Down vor dem Einfrierprozess die Zellvitalität nach dem Auftauen unter etwa 90% herabsetzt. Essentielle Gene kodieren daher bevorzugt Genprodukte, die den programmierten Zelltod (Apoptose) begünstigen, Genprodukte, welche für die Regulation und Funktionieren des Zellzyklus benötigt werden, Genprodukte, welche für eine zelluläre Antwort auf Schäden der DNA, oder Membranschäden benötigt werden, Genprodukte, welche essentielle Stoffwechselenzyme kodieren, und Genprodukte, welche das Anhaften adhärenter Zelle auf Zellkulturgefäße nach dem Auftauen beeinträchtigen.

Der Begriff „Hochdurchsatzscreening“ („high through-put screening“, HTS) bezeichnet in einer bevorzugten Ausführungsform das Testen einer Vielzahl von Stoffen, Zellen oder dergleichen in einem relativ kurzen Zeitraum und dabei kann beispielsweise in einem zellbasierten Test die Wirkung von Stoffen, Zellen oder dergleichen auf Zellen in den „Wells“ eines geeigneten Gefäßes, bevorzugterweise einer Multiwellplatte getestet werden. Bevorzugterweise erfolgt das Testen mit einer Vielzahl von Stoffen, Zellen oder dergleichen mit einer hohen Durchsatzrate.

Der Begriff „Medium“ wie hierin verwendet, bezeichnet in einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung eine jegliche Lösung, die geeignet ist, Zellen aufzunehmen. Insbesondere ist ein Medium ein flüssiges Medium, bevorzugterweise ausgewählt aus der Gruppe umfassend physiologisch akzeptable Lösungen, physiologische Kochsalzlösungen, Pufferlösungen, und Zellkulturmedien.

Der Begriff „Einfriermedium“ bezeichnet in einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung Lösungen, die geeignet sind, lebende Zellen während des Einfriervorganges vor Gefrierschaden zu schützen. Derartige Lösungen umfassen bevorzugterweise Kulturmedium und kryoprotektive Substanzen. Ein besonders bevorzugtes Einfriermedium ist ein Kulturmedium, das eine oder mehrere kryoprotektive Substanzen enthält. Bevorzugte Kryo-protektive Substanzen sind Lösungsmittel und bevorzugterweise Dimethylsulfoxid (DMSO) und Glycerin.

Der Begriff „Vitalität“ bezeichnet in einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung den prozentualen Anteil an lebenden Zellen in einem zu testenden Gefäß, wie beispielsweise einer Multiwellplatte, bezogen auf nicht-behandelte eingefrorene oder nicht eingefrorene Zellen in einem Gefäß, bevorzugterweise in dem Gefäß, das als Kontrollgefäß dient. Hierbei kann die Bestimmung des Anteils an lebenden Zellen entweder durch einen Farbausschlusstest, wie beispielsweise beschrieben von Krause AW et al. (Krause A.W. et al., 1984, J. Histochem. Cytochem. 32(10):1084-1090), oder durch einen Test auf metabolische Aktivität wie beispielsweise beschrieben von Maekawa Y (Maekawa Y, et al., Thromb. Res. 109(5-6):307-314, 2003), erfolgen.

Das erfindungsgemäße Verfahren überwindet insbesondere die ansonsten beim Einfrieren von Zellen auftretenden Probleme, die im Wesentlichen durch die Bildung von Eiskristallen hervorgerufen werden. Der Zusatz von kryoprotektiven Substanzen wie beispielsweise Glyzerin oder DMSO, ist zwar grundsätzlich geeignet, diese Effekte zu minimieren, jedoch werden bei derartigen Protokollen besondere Anforderungen an das Gefäß, in dem die Zellen enthalten sind, gestellt. Insbesondere werden suspendierte Zellen nach dem Stand der Technik in Kryoröhrchen langsam mit einer Abkühlrate von ca. 1°C pro Minute bis auf – 80°C eingefroren. Das langsame Abkühlen wird durch eine individuelle Isolierung der Kryoröhrchen, z. B. durch eine Polystyrolbox mit geeigneter Bandstärke, erreicht. Die solchermaßen eingefrorenen Zellen sind jedoch nur für einen kurzen Zeitraum von etwa zwei bis vier Monaten haltbar. Dies wird gemäß dem erfindungsgemäßen Verfahren überwunden.

Das erfindungsgemäße Verfahren überwindet darüber hinaus das bei der Herstellung von rekombinanten Zellen durch heterogene Nukleinsäuren auftretende Problem des zeitlich begrenzten rekombinanten Charakters der Zellen. Auf Grund dieses zeitlich begrenzten rekombinanten Charakters müssen Zellen für funktionelle Versuche immer erneut mit heterogenen oder heterologen Nukleinsäuren transfiziert werden. Abweichungen im Expressionsmuster der heterogenen oder heterologen Nukleinsäure führen zu schwankende Testergebnisse. Das erfindungsgemäße Verfahren überwindet diese Probleme, indem rekombinante Zellen aus einer Charge für Versuche lange gelagert werden können und die Uniformität des rekombinanten Charakters über diesen Zeitraum gewährleistet bleibt.

Zum Einfrieren der Zellen werden diese bevorzugterweise aus einer Zellkultur in exponentieller Wachstumsrate verwendet. Dabei sind bevorzugterweise vor dem Ernten gerade so viele Zellen

in dem Gefäß, dass der Boden des Gefäßes gleichmäßig und bevorzugterweise zu nicht mehr als 90% mit Zellen bedeckt ist.

Nach dem Ernten können die Zellen mit einer Zelldichte von $0,05-10 \times 10^6$, besonders bevorzugt mit einer Zelldichte von $0,1$ bis 4×10^6 pro ml in Einfriermedium resuspendiert eingefroren werden. Das Einfriermedium kann Kulturmedium, sowie ein oder mehrere Kryoprotektiva enthalten. Das Kryoprotektivum kann Glycerin oder Dimethylsulfoxid (DMSO) sein. Die Konzentration des Kryoprotektivum kann 1 bis 20 Vol. %, bevorzugt 2 bis 15 Vol. %, besonders bevorzugt 4 bis 10 Vol. % betragen. Beispiele für geeignete Einfriermedien sind eine Mischung aus 95% DMEM (Dulbecco's Modified Eagles Medium) Komplettmedium und 5 % DMSO, sowie aus 95% DMEM Komplettmedium und 5% Glycerin, wobei DMEM Komplettmedium aus DMEM, 4 mM L-Glutamin, 2 mM Natriumpyruvat und 10% fötalem Kälberserum (FCS) bestehen kann. Weitere Einfriermedien sind in der Literatur bekannt (Sasaki M. et al., *Biotechnol. Appl. Biochem.* 42(Pt 2):183-188, 2005; Sasnoor L.M. et al., *Transfusion* 45(4):622-633, 2005; Birkeland S.M. *Cryobiology* 13(4):442-447, 1976; Loretz L.J. et al., *Xenobiotica* 19(5):489-498, 1989; Merten O.W. et al., *Biologicals* 23(2):185-9, 1995. Stachecki J.J. et al., *Cryobiology* 37(4):346-54, 1998).

Das im Einfriermedium verwendete Kulturmedium kann auch ein anderes in der Zellkultur verwendete Medium als DMEM sein. Weitere Beispiele hierfür sind RPMI oder McCoy's Medium. Anstelle eines Kulturmediums kann in dem Einfriermedium auch eine Salzlösung eingesetzt werden, wie beispielsweise HBSS (Hanks Buffered Saline Solution) oder andere übliche Salzlösungen.

Die in dem Einfriermedium resuspendierten Zellen werden bevorzugterweise höchstens etwa 60 Minuten, bevorzugterweise etwa 30 Minuten, bevorzugterweise höchstens etwa 30 Minuten nach dem Resuspendieren eingefroren.

Die Zellsuspension kann in einem Volumen von 5 bis 250µl, bevorzugt in einem Volumen von 10 bis 50µl eingefroren werden. Bei Zellkulturgefäßen mit einer Kulturfläche von $> 1,1 \text{ cm}^2$ kann die Zellsuspension in mehreren Tropfen am Rand des Zellkulturgefäßes eingefroren werden.

In einer bevorzugten Ausführungsform werden die Zellen mit einer Abkühlrate auf die Lagertemperatur eingefroren, die mindestens etwa 20,5°C pro Minute, bevorzugt mindestens etwa 45°C pro Minute, besonders bevorzugt etwa 80,5°C pro Minute beträgt. Die Abkühlrate erlaubt ein im Vergleich zu den Verfahren nach dem Stand der Technik schnelles Abkühlen der in den Zellkulturgefäßen befindlichen Zellsuspension auf die Lagertemperatur. Da ein schnelles Abkühlen eines Körpers durch eine niedrige Wärmekapazität herbeigeführt wird, wird die bevorzugten Ausführungsform dadurch erreicht, dass die Zellsuspension in einem niedrigen Volumen, bevorzugt kleiner als 50 µl, eingefroren wird. In Verbindung mit dem im Medium befindlichen Kryoprotektivum gelingt es in bevorzugten Ausführungsformen, die Eiskristallbildung im System, d.h. der Zellsuspension bzw. dem Zellkulturmedium zu unterdrücken und die Lösung im glasartigem Zustand zu halten, der für die zerstörungsfreie Tieftemperaturlagerung von Zellen notwendig ist. Eine besonders bevorzugte Abkühlrate ist 64,5°C pro Minute.

Das Einfrieren wird in einer Ausführungsform durch den Kontakt wenigstens einer Fläche des Zellkulturgefäßes mit einem Material geeigneter (hoher) Wärmeleitfähigkeit erreicht werden, das auf eine geeignete Temperatur vorgekühlt wurde. Das Material mit geeigneter Wärmeleitfähigkeit kann dabei ein Metall sein. Die geeignete Temperatur des Materials beträgt dabei bevorzugterweise zwischen etwa - 90°C und - 50°C und bevorzugterweise zwischen etwa - 80°C und - 86°C.

Erfindungsgemäß kann das Lagern der Zellen ohne die Verwendung von flüssigem Stickstoff erfolgen. Vorzugsweise kann das Lagern in einem Tiefkühlschrank erfolgen. Die Lagerung der Zellen erfolgt bevorzugterweise bei einer Lagertemperatur zwischen etwa - 60,5 und - 86°C, besonders bevorzugt zwischen - 80,5 und - 86°C. Erfindungsgemäß kann die Lagerung in einem Tiefkühlschrank aufrechterhalten werden, bevorzugterweise bei einer Temperatur von etwa - 80°C bis - 86°C.

Bevorzugterweise erfolgt die Lagerung der Zellen in einem Kulturgefäß, bevorzugterweise in einem Zellkulturgefäß.

Das Zellkulturgefäß ist in einer Ausführungsform, ist aber nicht darauf beschränkt, eine Multititerplatte, eine Zellkulturschale oder eine Zellkulturflasche sein. Die Multititerplatte kann ausgewählt sein aus der Gruppe bestehend aus 4-well, 6-well, 12-well, 24-well, 48-well, 96-well, 384-well, 1536-well Platte.

Die Lagerung erfolgt erfindungsgemäß unter gasdichtem Abschluss oder in einer inerten Atmosphäre. Die Verwendung einer inerten Atmosphäre bedeutet insbesondere, dass die Atmosphäre über den Zellen bzw. der diesen enthaltenen flüssigen oder festen Phase aus nicht reagierenden bzw. reaktionsarmen Gasen besteht.

Eine inerte Atmosphäre kann im Rahmen der vorliegenden Erfindung durch verminderten Atmosphärendruck und/ oder durch die Verwendung eines inerten Gases oder Schutzgases hergestellt werden. Dabei ist bevorzugt, dass die Herstellung einer inerten Atmosphäre in dem Zellkulturgefäß durch Verringerung des Atmosphärendruck auf zwischen etwa 0,65 und 0,05 bar, bevorzugterweise zwischen etwa 0,4 und 0,1 mbar erreicht wird. Die Herstellung der inerten Atmosphäre im Zellkulturgefäß erfolgt vorzugsweise vor dem Einfrieren der Zellen in dem Zellkulturgefäß.

Die Lagerung der Zellen kann alternativ oder ergänzend zur inerten Atmosphäre unter einem gasdichten Abschluss erfolgen. Der gasdichte Abschluss erlaubt, dass selbst für den Fall, dass eine Reaktion der Gasphase mit der Flüssig- bzw. Festphase, in der sich die Zellen befinden, erfolgt, nach dem Abreagieren der in Gasphase enthaltenen reaktiven Molekülspezies diese keine weiteren, nachteiligen Wirkungen auf die Zellen mehr haben könne, da die in der Gasphase enthaltenen reaktiven Molekülspezies nicht erneuert oder regeneriert werden können. Dabei ist es besonders bevorzugt, wenn die Gasatmosphäre oberhalb der Flüssig- bzw. Festphase möglichst gering ausgebildet ist, wodurch die Gesamtmenge an in der Gasphase verfügbaren reaktiven Molekülspezies insgesamt verringert wird. Eine derartige Verringerung an reaktiven Molekülspezies kann beispielsweise weiter dadurch erreicht werden, dass in der Gas-, Flüssig- und/oder Festphase Verbindungen enthalten sind, die die Wirkung der reaktiven Molekülspezies verringern bzw. beseitigen. Beispielhaft sei hier die Verwendung von chemischen Reduktionsmitteln oder Quenchern wie Ascorbinsäure, α -Tocopherolacetat, N-Acetylcystein, Metallothionein, Pantothersäure, Pyridoxol oder Riboflavin oder enzymatischen Quencher wie Katalase, Mangan Superoxid Dismutase oder Kupfer/Zink Superoxid Dismutase erwähnt.

Der gasdichte Abschluss kann jedoch auch bevorzugterweise dazu führen, dass die inerte Atmosphäre als solche aufrechterhalten und durch Umgebungseinflüsse hinsichtlich ihrer Wirkung nicht verändert wird.

Der gasdichte Abschluss des Gefäßes und insbesondere des Zellkulturgefäßes kann bevorzugterweise durch Einschweißen in einen gasdichten Folienschlauch oder Folienbeutel oder durch Verwendung einer gasdichten Klebefolie erfolgen. Dabei wird in einer bevorzugten Ausführungsform ein geeignetes Zellkulturgefäß mit einem Deckel verschlossen und in einem Folienschlauch oder Folienbeutel vakuumverschweißt. Dazu wird typischerweise das Zellkulturgefäß in den Folienschlauch gegeben, der vorher optional bereits auf einer Seite verschlossen sein kann. Mit einem handelsüblichen Vakuumiergerät kann die verbleibende Luft aus der Folienverpackung weitestgehend abgesogen werden.

Erfindungsgemäß können die Zellen nach dem Einfrieren bei 37°C aufgetaut werden und in dem Zellkulturgefäß ohne Passagieren, Mediumwechsel oder Waschen für einen zellbasierten Assay verwendet werden. Das Auftauen erfolgt dabei vorzugsweise in einem auf 37°C temperierten Zellinkubator mit einer für die Zellkultur geeigneten Atmosphäre mit geeignetem CO₂-Partialdruck und geeigneter Luftfeuchtigkeit. Bevorzugterweise 15 Minuten bis 1 Stunde nach dem Auftauen wird in das Zellkulturgefäß ein geeignetes Kulturmedium zugegeben. Die Verdünnung des Kulturmediums mit dem Einfriermedium in Wells von Multititerplatten kann etwa 1:1, bevorzugterweise etwa 1:2, bevorzugterweise etwa 1:3 betragen. Bei Zellkulturschalen oder Zellkulturflaschen kann die Verdünnung des Einfriermediums mit dem Kulturmedium auch bis zu etwa 1:50 betragen. Nach Zugabe des Kulturmediums können die Zellen direkt für einen zellbasierter Test verwendet werden oder es kann ein Mediumwechsel vor der Durchführung des zellbasierten Tests erfolgen. Bevorzugterweise ist das im Rahmen des Medienwechsels eingeführte Medium ein Kulturmedium oder ein für einen zellbasierten Test geeignetes Medium, das den Fachleuten auf dem Gebiet bekannt ist. Ein möglicher Einfluß des im Einfriermedium befindlichen Kryoprotektivums auf den zellbasierten Test kann dadurch gemessen werden, das das Ergebnis des zellbasierten Tests nach vorangegangenen Mediumwechsel mit den Ergebnissen des zellbasierten Tests ohne vorangegangenen Mediumwechsel miteinander verglichen werden.

Die eingefrorenen Zellen können bei einer Lagertemperatur von weniger als oder gleich - 65°C für mindestens einen Monat, bevorzugterweise für mehr als 2 Monate, bevorzugterweise mehr als 4 Monate, bevorzugterweise mehr als 12 Monate eine Vitalität von über 70%, bevorzugterweise über 80%, bevorzugterweise von über 95% der Vitalität von Zellen eines nicht eingefrorenen Kontrollgefäßes aufweisen. Zur Messung der Vitalität kann ein im Stand der Technik bekannter Farbausschlusstest verwendet werden. Dabei werden nicht-membranpermeable Farbstoffe verwendet, die nur Zellen mit einer defekten Membran, nicht aber Zellen mit einer intak-

ten Membran färben. Ein dafür geeigneter und im Stand der Technik beschriebener Farbstoff ist Erythrosin B (Krause A.W. et al., 1984, J. Histochem. Cytochem. 32(10):1084-1090). In kleinen Gefäßen, aus denen Zellen nicht zuverlässig entnommen werden können, kann die Vitalität indirekt über die metabolische Aktivität der Zellen bestimmt werden. Dabei wird im Rahmen eines so genannten Reduktionstests ein Substrat von metabolisch aktiven Zellen reduziert und dadurch in eine durch ein verändertes Absorptions- oder Fluoreszenzspektrum nachweisbare Substanz überführt. Ein im Stand der Technik bekannter Reduktionstest ist beispielsweise der WST-8 Reduktionstest (Maekawa Y, et al., Thromb. Res. 109(5-6):307-314, 2003). Durch die Reduktion des Tetrazoliums Salzes WST-8 [Na^+ ·2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium] in Gegenwart eines intermediären Elektronenakzeptors wie z.B. 1-Methoxyphenazinmethosulfat zu einem bei der Absorptionswellenlänge von 450 nm nachweisbaren Formazan kann die metabolische Aktivität der Zellen gemessen werden. Durch einen Vergleich der metabolischen Aktivität von Zellen, die nach dem erfindungsgemäßen Verfahren eingefroren wurden, mit nicht eingefrorenen Zellen in Kontrollgefäßen (Vitalität 100%) kann die Zellvitalität bestimmt werden. Für Zytotoxizitäts-Tests, die zur Bestimmung der Toxizität einer Verbindung verwendet werden, kann beispielsweise die Stoffwechselaktivität von Zellen als Indikator für die Schädigung durch toxische Substanzen herangezogen werden. Dafür kann ebenfalls ein Reduktionstest wie der WST-8 Reduktionstest verwendet werden. Dabei wird die Zytotoxizität anhand des verringerten Substratumsatzes von Zellen, die mit einer toxischen Substanz behandelt wurden, im Vergleich zu nicht-behandelten Kontrollzellen (Vitalität 100%) bestimmt.

Die eingefrorenen Zellen, bei denen ein Gen, eine Gruppe von Genen oder die Gesamtheit der Gene (Genom) ausgeschaltet ist und wie sie hierin detaillierter beschrieben sind, können bei einer Lagertemperatur von wenigstens oder gleich etwa - 65°C für mindestens 1 Monat, bevorzugterweise mehr als 2 Monate, bevorzugterweise mehr als 6 Monate, bevorzugterweise mehr als 12 Monate eine um 70% niedrigere, bevorzugterweise eine um 80% niedriger, bevorzugterweise eine über 95% verringerte Hemmung des entsprechenden Genes zeigen. Entsprechende Lager- oder Kulturgefäße wie z. B. Platten, die typischerweise eine erfindungsgemäße Zellbibliothek umfassen, können somit auf Trockeneis zum Anwender transportiert werden und für zellbasierte Tests in Hochdurchsatzverfahren verwendet werden. Eine Liste der 5362 wichtigsten humanen Gene, welche für die Herstellung einer RNAi-Bibliothek in Frage kommen, werden hierin mit der folgenden Tabelle 1 offenbart.

Wie hierin verwendet bezeichnet der Begriff „Gene Symbol“ die in der Technik verwendete Abkürzung des Gens und der Begriff „Entrez Gene ID“ die Datenbankidentifizierungsnummer insbesondere von PubMed von NCBI.

Gene Symbol	Entrez GeneID	Gene Symbol	Entrez GeneID	Gene Symbol	Entrez GeneID	Gene Sym- bol	Entrez GeneID
DNM1	1759	KRAS2	3845	SRI	6717	ProSAPiP2	9755
BCAT2	587	PTK7	5754	ELA2	1991	SEP15	9403
NEDD4	4734	TCFL5	10732	FKBP1A	2280	MAP3K7	6885
SELP	6403	SFRS7	6432	RPS9	6203	ZFYVE20	64145
FAS	355	PAICS	10606	CYP24A1	1591	UBE2L3	7332
CX3CL1	6376	FOSL2	2355	RRM2	6241	CABP5	56344
EPOR	2057	C1QB	713	RODH-4	8608	GYS2	2998
DUSP11	8446	PXN	5829	CCPG1	9236	RFC2	5982
CXCL2	2920	CD83	9308	POLA	5422	MGC54289	128338
TP53AP1	11257	CCR2	1231	AKR1A1	10327	MST1	4485
PARP1	142	SACM2L		C4BPA	722	LOC374969	374969
TGFB2	7042	MAPK11	5600	ERCC8	1161	PRKAB1	5564
TCL6	27004	CCL14	6358	CD79B	974	ADRB2	154
LAMA4	3910	BDNF	627	CX3CR1	1524	EIF2S1	1965
CHIT1	1118	PAPOLG	64895	PSEN2	5664	TYRP1	7306
DKFZp686L20145		FLJ13848	79829	PAX6	5080	CDKN2D	1032
SSFA2	6744	Spir-1		GTF2H4	2968	CCNA1	8900
CLNS1A	1207	GMEB2	26205	MMP1	4312	FCGR2B	2213
PCMT1	5110	ASXL1	171023	GHRH	2691	ARF3	377
ARSB	411	Rab11-FIP2		KIAA1423	57583	POSTN	10631
RHO	6010	ILF1		PSG9	5678	NKG7	4818
NPY1R	4886	MAP4	4134	NUDT12	83594	CDC42	998
AMD1	262	IMPG1	3617	PSMD11	5717	HNRPK	3190
NDFIP2	54602	KPNA2	3838	FLJ11046	55773	BTF3	689
FLT4	2324	RABIF	5877	AP2A2	161	SPI1	6688
CYP3A7	1551	KIAA1720	80851	STK4	6789	HBEGF	1839
PWP2H	5822	CYP3A5	1577	SLC4A5	57835	BST1	683
BTRC	8945	CENPE	1062	LRP6	4040	CCR1	1230
VDAC2	7417	LOC51619	51619	FLJ20202		C1S	716
HEAB	10978	HABP4	22927	RNP	55599	IKBKB	3551
SLC4A4	8671	KIAA0913	23053	CTSC	1075	IL15	3600
LEPROTL1	23484	SQLE	6713	GSS	2937	PIAS1	8554
IHPK2	51447	OPA1	4976	BPGM	669	MMP7	4316
TM4SF8	10099	PDHA1	5160	EFS	10278	MGC35555	340419
AFTIPHILIN	54812	STXBP5	134957	HIST1H1C	3006	KIAA1277	27147
CASP1	834	SRI	6717	FLJ20668		KCNE3	10008
HSD17B12	51144	VEZATIN	55591	MCM6	4175	MUTYH	4595
ACTN2	88	RAE1	8480	PDLIM2	64236	FLJ14007	79752
MORF4L2	9643	DTX1	1840	ANKH	56172	IMMP2L	83943
STXBP3	6814	NEDD4	4734	FBN1	2200	TRIM4	89122
TIRP		AFP	174	CD14	929	RAB10	10890
DKFZp434C0328	54762	CCK	885	CLSTN1	22883	PTGFR	5737
HS3ST2	9956	SPTBN2	6712	HLA-C	3107	PPOX	5498
MICAL2	9645	OCIAD2	132299	ZMPSTE24	10269	POU2AF1	5450
SEPT7	989	SSRP1	6749	GPR85	54329	P29	25949
VDR	7421	UBE2G2	7327	ATP5L	10632	HMP19	51617
RBM13	84549	SAP18	10284	RERG	85004	TIGD3	220359
PLAC1	10761	PABPN1	8106	STAF65(gamma)	9913	TAF11	6882

Gene Symbol	Entrez GeneID	Gene Symbol	Entrez GeneID	Gene Symbol	Entrez GeneID	Gene Symbol	Entrez GeneID
DKFZP434D193		SLC6A2	6530	RPS18	6222	PAK1	5058
ARL6IP	23204	KIAA0962	23341	KRT13	3860	AURKB	9212
PLIN	5346	SP7	121340	SPOP	8405	KIAA1456	57604
C14orf101	54916	C14orf145	145508	RNF141	50862	ANTXR1	84168
HP1-BP74	50809	PRKCN		SNAP29	9342	MPP1	4354
LOC144233	144233	OSBPL10	114884	GPR133	283383	MYC	4609
DKFZP761D0211		DKFZP566M114	84068	FLJ10996	54520	TRAF6	7189
EPHA4	2043	VCIP135	80124	ZNF552	79818	ACTR2	10097
C9orf60	10444	KRT7	3855	PAQR3	152559	CDK9	1025
C10orf39	282973	SLC30A7	148867	RNF6	6049	FEZ1	9638
TMOD3	29766	FLJ20507	55654	RAI16	64760	IK	3550
ZNF261	9203	CNNM4	26504	POLR3F	10621	TRAF4	9618
TRIO	7204	GCK	2645	DICER1	23405	S100A8	6279
MEF2C	4208	TPM1	7168	SLC17A5	26503	CD3Z	919
PSARL	55486	HOXC11	3227	TTC1	7265	IRF7	3665
MTCH1	23787	PRKARIA	5573	SLC23A2	9962	PRG4	10216
FLJ12649	79649	RGS4	5999	VPS4B	9525	ACTA2	59
TENS1	64759	IRF2BP1	26145	DNM1L	10059	IKBKG	8517
LOXL2	4017	ALDOB	229	PAN3	255967	KRT1	3848
HLCS	3141	NPD014	57035	GGH	8836	DKFZp761H039	55530
HAPLN3	145864	GCGR	2642	APOC4	346	TXNRD2	10587
ANKMY2	57037	ABCG1	9619	ITGA6	3655	DSG3	1830
GUCY2C	2984	MGC50896		RNF11	26994	ZNF497	162968
CD24	934	GORASP1	64689	ENTPD6	955	FLJ10803	55744
RORC	6097	MKRN1	23608	DGCR8	54487	FLJ16030	
DKFZp451M2119	285023	CSTF2T	23283	NGX6		ZSWIM6	57688
C11orf23	55291	pp9099	80301	FLJ10871	55756	LOC134218	134218
KRT6B	3854	TOMM70A	9868	MANBA	4126	RBL1	5933
KIAA0476	9909	GCLM	2730	MGC3222	79188	LOC283537	283537
CDH5	1003	SEPT1	1731	IDI1	3422	TLR3	7098
IER2	9592	SLC22A8	9376	PDLIM3	27295	DKFZp58611420	222161
SGK	6446	MAP7	9053	HSF2	3298	SPTLC1	10558
COX7A1	1346	ARL2	402	RAP2A	5911	C14orf104	55172
FZD9	8326	C20orf31	55741	CRIP2	1397	PEA15	8682
ADSS	159	PTPRZ1	5803	DEDD	9191	MARK3	4140
C4A	720	CD200R1	131450	NFE2L1	4779	MBL2	4153
TIMP3	7078	INSR	3643	BAP1	8314	R3HDM	23518
CARD4	10392	CBLB	868	KIAA0644	9865	TNRC15	26058
CCL11	6356	HPX	3263	RCN2	5955	EPB41L4B	54566
MAF	4094	SERPIND1	3053	VIP32		AIG1	51390
PIK3R3	8503	BMPRIA	657	STIM2	57620	DO	420
MMP9	4318	CD2	914	SEC31L1	22872	KIAA0903	
ITGB8	3696	FYB	2533	RBM6	10180	GLYAT	10249
MOAP1	64112	DECRI	1666	RALGPS1	9649	TDG	6996
ZAK	51776	TRAM1	23471	HIRA	7290	RIMS2	9699
NRP2	8828	DBI	1622	KIAA1712	80817	VAPA	9218
NUDT8	254552	IL8	3576	RPS20	6224	GSN	2934
FSHPRH1	2491	PECAM1	5175	SYT7	9066	PGRMC1	10857
TTC12	54970	DUSP7	1849	RAB14	51552	KIAA0841	23354

Gene Symbol	Entrez GeneID	Gene Symbol	Entrez GeneID	Gene Sym- bol	Entrez GeneID	Gene Symbol	Entrez GeneID
PRICKLE2	166336	ZNF541	84215	CCRL1	51554	SYT1	6857
LOC57228	57228	C17	54360	PDCD7	10081	NEU1	4758
SSB	6741	ZDHC16	84287	PKHD1	5314	HLA-DRA	3122
RBBP8	5932	CUL4A	8451	C9orf10	23196	ANKRD11	29123
CDH13	1012	GAGED3	9502	FLJ20147		TYRO3	7301
SP1	6667	BRD1	23774	LOC317671	317671	KIAA0527	26032
C9orf58	83543	MGC17301	196410	NDFIP1	80762	PHKB	5257
CHD7	55636	PDE4DIP	9659	RAB5B	5869	MGC12458	84288
RABL4	11020	RCL1	10171	ETV5	2119	SEC15L2	23233
PLK2	10769	SAMHD1	25939	SULT4A1	25830	KIAA1196	57473
ARID1B	57492	DKFZP547N043	83932	PSMD5	5711	ELP4	26610
NUDT15	55270	TRIP10	9322	LAD1	3898	DAF	1604
UGCGL1	56886	AKR1B1	231	HLA-A	3105	SCD4	79966
H1FO	3005	FLJ22002		IRF3	3661	PORIMIN	114908
HSF2	3298	GRAF		AASDHPPT	60496	FLJ13576	64418
F5	2153	EHD3	30845	COMMD5	28991	PROS1	5627
C17orf25	51031	KIAA0100	9703	FLJ14503	256714	NEDD9	4739
PCAF	8850	SMARCA1	56916	RAB37	326624	FAT2	2196
IGSF1	3547	ARF4L	379	FSTL1	11167	PIM2	11040
CCNI	10983	CBWD1	55871	SCG3	29106	NS3TP1	54529
GSTA4	2941	OBSCN	84033	MYT1L	23040	GRINL1A	81488
UROS	7390	GLRX	2745	MASK		TEF	7008
GJA5	2702	GLI3	2737	ATP10D	57205	MAP3K13	
PIK3C2G	5288	C1RL	51279	FRZB	2487	ZNF278	23598
CCT8	10694	MS4A6A	64231	PERP	64065	BTRC	8945
PTPRJ	5795	ARHE	390	KCNH2	3757	BCL6B	255877
IL12A	3592	SLCO4A1	28231	ITGB2	3689	AGPS	8540
IL16	3603	C1orf48	25936	MAPRE2	10982	CHL1	10752
DUSP9	1852	KRT17	3872	FCMD	2218	KIAA0551	
CLIC1	1192	CDC37	11140	GALNT9	50614	DUSP6	1848
PDCD8	9131	COL6A1	1291	SEC6L1	11336	ALG1	56052
NEDD8	4738	PLAUR	5329	PEN2	55851	C16orf34	90861
PRKAG1	5571	MYF6	4618	FLJ10378	55132	MRPS11	64963
BOMB	80014	PPM1D	8493	ITGA2B	3674	WASPIP	7456
FLJ10737		PBX3	5090	EEF1A1	1915	C6orf61	54844
SPATA13	221178	RGS4	5999	KIAA0922	23240	CDK2	1017
UBN1	29855	THPO	7066	SERPINF2	5345	BOLL	66037
GOLPH3	64083	CD5	921	ACAD8	27034	SHMT2	6472
SLC26A9	115019	PDGFB	5155	TFAM	7019	PIN1	5300
ZNF323	64288	RHOC	389	FLJ10980	56204	RPS6KC1	26750
FLJ12178		PDE9A	5152	DLG3	1741	SERPING1	710
Sep 10		MSH5	4439	FEN1	2237	C16orf5	29965
KLRD1	3824	SBNO1	55206	RET	5979	DDN	23109
SEC24A	10802	KRT5	3852	TWIST1	7291	NKX6-2	84504
UBE2D2	7322	PGF	5228	INPPL1	3636	ARHGEF5	7984
BIRC1	4671	SRRM2	23524	NFE2	4778	LOC151963	151963
PNN	5411	IRX4	50805	GTF2H3	2967	CD53	963
GART	2618	SLC2A4RG	56731	ANPEP	290	CTBP2	1488
SFRS7	6432	BCAT1	586	BNIP3	664	TOP2B	7155
IQGA1	8826	HOXA3	3200	DUSP6	1848	C22orf13	83606

Gene Symbol	Entrez GeneID	Gene Symbol	Entrez GeneID	Gene Symbol	Entrez GeneID	Gene Symbol	Entrez GeneID
OSBPL3	26031	CIAPIN1	57019	GAP43	2596	C10orf75	90271
POLR2G	5436	KPNA4	3840	SON	6651	ETV3	2117
PDCD6IP	10015	CHD5	26038	XRCC5	7520	USP28	57646
LAMC1	3915	CPNE4	131034	BAT2	7916	ZFP64	55734
PPID	5481	C16orf40	113000	XTP2	23215	FKBP7	51661
RRAGB	10325	PTTG1IP	754	C14orf120	25983	BSPRY	54836
MITF	4286	PINX1	54984	CDK6	1021	ESRRG	2104
GFAP	2670	PLD1	5337	GALNT14	79623	SNAPC3	6619
PDGFB	5155	RIPX	22902	DBC1	1620	TRIP15	
CUL2	8453	MARK1	4139	UBE2R2	54926	DSG3	1830
SRRM2	23524	NAT1	9	KIAA0931	23035	PARD6G	84552
MYBL2	4605	APBA2	321	C20orf100	84969	DOCK3	1795
PVR	5817	RBBP9	10741	SCAMP5	192683	C10orf42	90550
JUN	3725	Pfs2	51659	ANKRD6	22881	FLJ25070	
TGFB1	7040	ACSL4	2182	OSBPL11	114885	RER1	11079
CIDEA	1149	HLA-DQA1	3117	ARL6IP6	151188	SRGAP1	57522
EP300	2033	DACH1	1602	CAPN6	827	C1orf37	92703
IGFBP4	3487	PRKAR2B	5577	RNP24	10959	SCG2	7857
BMP7	655	PON2	5445	RFX4	5992	HBLD2	81689
KIAA0998	23093	PRCC	5546	SEMA6A	57556	FLJ10904	
GALNTL1	57452	MSN	4478	NME4	4833	N4BP2	55728
KIAA1441	57592	RAF1	5894	C6orf119	83640	KIAA1026	23254
C6orf118	168090	GABBR1	2550	PPFIA4	8497	FLJ10895	
COQ6	51004	EPHB6	2051	DBI	1622	HRMT1L1	3275
SLC7A8	23428	CYFIP2	26999	EEA1	8411	PTPRK	5796
FLJ10378	55132	NDP52	10241	FLJ44796	401209	SYNCRIP	10492
GALNAC4S-6ST	51363	OSTF1	26578	BACH2	60468	LOC63929	63929
C19orf13	26065	RXRA	6256	POLD1	5424	PKIB	5570
KIAA1618	57714	IL2RG	3561	HBP1	26959	SLC13A3	64849
MLL3	58508	STAT5B	6777	MARVELD1	83742	MGST2	4258
NR3C2	4306	TCF3	6929	SERPINB2	5055	KCNS1	3787
BMPR2	659	IL8RB	3579	CAV1	857	HEPH	9843
C6orf78	221301	HSPA1A	3303	CDC16	8881	TBCD	6904
RPL4	6124	PTMA	5757	ECM2	1842	GNGT2	2793
EPO	2056	EPHB2	2048	TCF20	6942	DLK1	8788
SRPK2	6733	FLJ32642	137492	MAP2K5	5607	ALDH1B1	219
FLJ10094	55068	C20orf70	140683	SREBF2	6721	GJA4	2701
C14orf114	55218	FLJ11155	55314	NP	4860	LOC200205	200205
ANGPTL2	23452	FLJ90586	135932	MRE11A	4361	CD164	8763
FLJ43842		FZD3	7976	CCL13	6357	C9orf76	80010
PLXND1	23129	FLJ36874	219988	ELF2	1998	EPHA1	2041
HSRTSBETA	55556	FAIM2	23017	STAT5B	6777	MFNG	4242
HM74		CABLES2	81928	ICAM3	3385	LAMA3	3909
ZW10	9183	LOC253017	253017	CCR6	1235	STAM	8027
PACE4		BZW1	9689	PTPRK	5796	CALD1	800
CTBP2	1488	MGC12458	84288	GPX2	2877	TUBB4,	10382,
GPR17	2840	DAPK1	1612	ARSB	411	TUBB3	10381
AKAP10	11216	DNAJB9	4189	C20orf65	149699	HPR	3250
IFNGR1	3459	TNFRSF5		C2orf6		HLA-DMA	3108
						ELN	2006

Gene Symbol	Entrez Gene ID	Gene Symbol	Entrez Gene ID	Gene Symbol	Entrez Gene ID	Gene Symbol	Entrez Gene ID
C6	729	DNCL1	8655	ZNF540	163255	MGC71805	
SERPINB9	5272	PFN2	5217	SP3	6670	CASP6	839
RARA	5914	GSTM2	2946	TMP21	10972	TCPI	6950
FOS	2353	RGL2	5863	FSCN1	6624	NQO2	4835
RAPGEF1	2889	YWHAB	7529	TTN	7273	ANXA4	307
PBX2	5089	SF1	7536	EPHB4	2050	COASY	80347
TIF1	8805	SQLE	6713	E2F4	1874	GATA1	2623
CYorf15B	84663	THY1	7070	MXD4	10608	XRCC3	7517
CLCN5	1184	CASP10	843	MAD	4084	IRF5	3663
SULT2B1	6820	MAP3K11	4296	VEGF	7422	TPBG	7162
MLL5	55904	ITPR3	3710	KIAA0355	9710	LAMP1	3916
ANKRD29	147463	IL3RA	3563	GATA2	2624	FCGR2A	2212
SLC30A8	169026	TRAF5	7188	ITPR1	3708	CHUK	1147
MDS028	55846	OSGEPL1	64172	IRF4	3662	DOCK2	1794
FBL	2091	TDRD6	221400	USP4	7375	DOM3Z	1797
LOC57117	57117	PARD3	56288	AMOTL2	51421	ABCF1	23
SYPL	6856	FNBP4	23360	C6orf167	253714	E2F3	1871
FLJ22662	79887	C21orf107		XTP2	23215	PTCH	5727
MEF2D	4209	CDCP1	64866	NUP50	10762	CEGF3	
LAPTM5	7805	N4BP1	9683	NYD-SP21	84689	NPHS2	7827
LRPPRC	10128	FLJ10404	54540	HSPA5	3309	PCTK3	5129
SNX19	399979	SSPN	8082	TRIM33	51592	FLJ10159	55084
MOBKL2B	79817	TH1L	51497	CTNNAL1	8727	KIAA2018	205717
PPP2R3A	5523	NRD1	4898	KRT4	3851	CNOT4	4850
SPATA2	9825	SE57-1	80323	H2AFY	9555	RNF8	9025
DKFZP434H132	56905	NCOA6	23054	KIAA0146	23514	TRAM1	23471
ACYPI	97	COL14A1	7373	TERF1	7013	KLF4	9314
HSPC121	51495	APC	324	FLJ10460		INA	9118
FLJ23322	80020	N4BP1	9683	DOCK2	1794	PLXNA3	55558
ARL2BP	23568	DERP6	23587	FLJ12892	64770	BLMH	642
SLC13A3	64849	CDC6	990	FLJ22609		Spir-2	
FLJ20232	54471	ECM1	1893	FLJ90798		KIAA0368	23392
TARS	6897	C14orf93	60686	MGC42530		KIAA1524	57650
FLJ36766	348487	PKD2	5164	TIP120A	55832	ZFP95	23660
BAALC	79870	DKFZp547J036		LRRN1	57633	NPM1	4869
SNX3	8724	EFG2		CORO1C	23603	PHCA	55331
ZNF131	7690	C17orf35	8834	PDCD8	9131	GBE1	2632
PCCB	5096	FLJ38991	285521	CGI-141	51026	ALDH6A1	4329
POT1	25913	C8FW		GOLPH2	51280	ABHD5	51099
LOC339344	339344	STX3A	6809	C6orf55	51534	DNAJB6	10049
EDN3	1908	RRM2B	50484	CHRM3	1131	FAM11A	84548
HLA-DMA	3108	SYNGR3	9143	CAPNS1	826	FLJ13855	65264
ACHE	43	THBS3	7059	S100A4	6275	FLJ39485	
GCC2	9648	PCP4	5121	IMPA3	54928	BPAG1	
ARG1	383	ITGAV	3685	RPP30	10556	SLC25A5	292
SUMO1	7341	DARS	1615	DKFZP434C212	26130	OPCML	4978
FLRT3	23767	DEGS1	8560	WHSC1	7468	MGC2705	
POLR2K	5440	PAX5	5079	PCDH20	64881	RAB2	5862
ANGPT1	284	FLJ14054	79614	FLJ35775	138009	TLL1	7092
GADD45A	1647	LOC253012	253012	HSPD1	3329	MPP5	64398

Gene Sym- bol	Entrez Gene ID	Gene Sym- bol	Entrez Gene ID	Gene Sym- bol	Entrez Gene ID	Gene Symbol	Entrez Gene ID
CA2	760	FLJ14297	79963	RAP1GDS1	5910	PRKDI	5587
SALL3	27164	ZNF-kaiso		HSPB2	3316	SELE	6401
ARHGAP23	57636	TIMM23	10431	OACT2	129642	MICB	4277
A2BP1	54715	KCTD3	51133	JMJD1C	221037	ZNF239	8187
CREM	1390	FLOT2	2319	DDEF2	8853	XPA	7507
SLC7A7	9056	FLJ12895	65982	PHC2	1912	LRP8	7804
TM4SF1	4071	TBC1D19	55296	SMOC1	64093	CRK	1398
ZAK	51776	PC4	10923	RANBP17	64901	MGC5356	79025
ARMET	7873	TSPYL1	7259	ZNF135	7694	BCAN	63827
KIF3A	11127	GSTK1	373156	ZNF264	9422	MOBP	4336
HNRPR	10236	DUSP22	56940	XTP2	23215	MYO5C	55930
NUMB	8650	KLRB1	3820	AGTR1	185	RODH-4	8608
CCNA2	890	PDZK11	51248	PRKCSH	5589	LEREPO4	55854
DNCH1	1778	VAMP3	9341	SIN3B	23309	DKFZp313G1735	153642
ZBTB9	221504	DNPEP	23549	GPC1	2817	SEL1L	6400
LAMB2	3913	HSPC117	51493	PICALM	8301	VPS13A	23230
FOXE1	2304	WNT5A	7474	STIM1	6786	ACCN1	40
ZNF161	7716	C18orf10	25941	KCTD1	284252	NT5E	4907
HRH1	3269	CRADD	8738	ZNF263	10127	KIAA1279	26128
HLF	3131	FRZB	2487	FLJ10511		DNAJB5	25822
MAPK13	5603	GPC3	2719	KIAA0960	23249	PABPC4	8761
TOB1	10140	SEC10L1	10640	EPHA4	2043	DPYSL5	56896
FYB	2533	PER3	8863	HIVEP2	3097	DONSON	29980
SCAP1	8631	SNRK	54861	LEMD3	23592	DIO3OS	64150
DUSP4	1846	DARS	1615	UAP1	6675	ABCA1	19
BIK	638	ACTN3	89	NPTX1	4884	ASB9	140462
KLRC1	3821	CCT5	22948	DCTN1	1639	SCOC	60592
TIMP4	7079	COPS5	10987	PLEKHB1	58473	LOC150946	150946
PCNP	57092	MME	4311	YES1	7525	GBA	2629
C20orf177	63939	IF	3426	DONSON	29980	LOC93622	93622
GPR48		SLC25A3	5250	SDHD	6392	PAFAH1B1	5048
IMPG1	3617	C6orf10	10665	UNR	7812	HIRA	7290
GNPNAT1	64841	DDAH1	23576	SEPX1	51734	FLJ35036	253461
GTF2E2	2961	CD37	951	UBE1	7317	NACA	4666
LY6G6C	80740	RAD54L	8438	POP7	10248	RASL12	51285
JARID1A	5927	KIAA1796		PRKCZ	5590	RCOR3	55758
PRKRA	8575	SLC4A7	9497	ABHD6	57406	FLJ10420	55707
RORC	6097	NAALADL2	254827	APOBEC3B	9582	ARFRP1	10139
FLJ21963	79611	RNF14	9604	ITGB2	3689	KRT15	3866
KIAA0935		C20orf17	128553	NFKBIA	4792	TAP2	6891
GALNT2	2590	TDRD5	163589	CXCL9	4283	BTBD1	53339
HFL1		PADI2	11240	RAB33A	9363	CCL8	6355
FLRT1	23769	IVL	3713	IER3	8870	EPOR	2057
SNCAIP	9627	MGC13040	85016	PML	5371	FBXW2	26190
HSPA1L	3305	SLC26A8	116369	TM7SF2	7108	ARID2	196528
NR2C2	7182	FLJ25477	219287	SEMA3C	10512	PRKAB2	5565
TU3A	11170	LOC375748	375748	SMAD1	4086	TPMT	7172
NCOA4	8031	TRGV9	6983	NT5E	4907	UBE2A	7319
ZRANB1	54764	AXOT	64844	PPP3CB	5532	MX2	4600
LOC152217	152217	FLJ31657		CD28	940	OCLN	4950

Gene Symbol	Entrez Gene ID	Gene Symbol	Entrez Gene ID	Gene Symbol	Entrez Gene ID	Gene Symbol	Entrez Gene ID
ALKBH	8846	RAB6A	5870	TRIM41	90933	LUM	4060
CDH19	28513	RBPSUH	3516	MECP2	4204	ZNF30	90075
FGF11	2256	ABI2	10152	ENTPD7	57089	LIPT1	51601
LY64	4064	FBXO33	254170	LOC151963	151963	BLZF1	8548
COX6B1	1340	SMOC2	64094	ANKRD6	22881	C6orf65	221336
CCL13	6357	SMAP1	60682	ANKFY1	51479	UBE2L6	9246
FOXO1A	2308	CDH18	1016	TNKS2	80351	LSR7	
FOSB	2354	SS18	6760	ALPP	250	RAB34	83871
PIP5K2B	8396	PLEKHG1	57480	C14orf43	91748	FLJ11151	55313
IL18	3606	COL4A4	1286	ITGA3	3675	CACNG3	10368
TRA@	6955	C4BPB	725	KIAA1045	23349	POP5	51367
CCNG1	900	PLAU	5328	WEE1	7465	CTSL	1514
PSMB8	5696	VIL2	7430	BRCA2	675	B4GALT6	9331
BRCA2	675	VASP	7408	ZNF37A	7587	PTPRN	5798
FLJ20047		NQO1	1728	C1orf22	80267	EIF3S6IP	51386
ASMTL	8623	BYSL	705	CDC23	8697	KIAA0542	
AR	367	RAD51L3	5892	LOC51234	51234	OSBPL9	114883
SEC61A2	55176	DCT	1638	ADCY1	107	GFPT1	2673
PDCD1	5133	NR0B2	8431	VEGFB	7423	IL13RA2	3598
POU2F2	5452	HRMT1L1	3275	GRB2	2885	KIAA0319	9856
KIAA1972	89970	ETF1	2107	KPNA5	3841	ECHDC1	55862
FAM8A1	51439	LAMP2	3920	STK17B	9262	STS	412
PEX11G	92960	MAPK1	5594	NAT2	10	FLJ20364	54908
C14orf131	55778	PIK4CA	5297	DUSP8	1850	SMARCA3	6596
		HLA-DQB1	3119	GRSF1	2926	FADS2	9415
IL1R1	3554	IL10RB	3588	RPL32	6161	GRIN2A	2903
SGPP1	81537	GNL1	2794	EBI3	10148	TMSB4X	7114
SIAH2	6478	SHC1	6464	STAT4	6775	T1560	387335
PER2	8864	HMMR	3161	ENPP1	5167	LPIN3	64900
HMGN1	3150	PSME4	23198	SH2D1A	4068	CCBP2	1238
PSMD12	5718	P2RX1	5023	IL1RL1	9173	FLJ20758	55037
SCAP	22937	ZNF302	55900	PPP1R1A	5502	MTMR3	8897
CDK4	1019	BDNF	627	EPHB3	2049	CLEC1	51267
KIAA0895	23366	C20orf35	55861	LEPR	3953	CPN1	1369
MGC48332		MGC35043	255119	HRK	8739	SLC29A1	2030
MS4A7	58475	CDCA7	83879	MGC10744	84314	ODAG	57798
INSIG2	51141	PLGL	5342	IXL	55588	PLXNA2	5362
BECN1	8678	CGN	57530	PEPP2		MGC45871	359845
CDH5	1003	HRB	3267	LIN7C	55327	TMEM2	23670
CLMN	79789	GRB7	2886	LOC283439	283439	NME2	4831
PFKFB4	5210	POLG2	11232	KLHL4	56062	CRYM	1428
SEN54L	283989	PKP1	5317	RW1	23505	TMSB10	9168
MYT1L	23040	PRKCD	5580	LRP2	4036	BIRC2	329
OXCT		TMLHE	55217	TMSB4Y	9087	UBE1L	7318
LOC90668	90668	FLJ14566	84892	NCOA6IP	96764	SCMH1	22955
DYRK1A	1859	CD74	972	SEC5L1	55770	ZNF22	7570
C4orf8	8603	DLD	1738	RAB21	23011	FUT4	2526
ZNF354A	6940	ING5	84289	C19orf2	8725	MDM4	4194
TXNDC	81542	SPRR1A	6698	PPA2	27068	MXI1	4601
TATDN2	9797	FLJ20203	54856	GNAI3	2773	DUSP5	1847
USP21	27005						

Gene Symbol	Entrez Gene ID	Gene Symbol	Entrez Gene ID	Gene Symbol	Entrez Gene ID	Gene Symbol	Entrez Gene ID
CAV1	857	METTL4	64863	CYLD	1540	IGF1	3479
PMP22	5376	C8A	731	SH2BP1	9646	EFO1	
EPHA2	1969	ARGBP2	8470	SLC35C1	55343	RAP2C	57826
ZNF550	162972	THBD	7056	DNCH1	1778	TRIM16	10626
MRTF-B		CSNK2A2	1459	KIAA0652	9776	BNC1	646
ODAG	57798	EVL	51466	NAGPA	51172	FLJ33008	145748
BIRC4	331	FLJ10546	55167	BMSC-UbP	84993	DSIP1	1831
DPF2	5977	RFC3	5983	PIGC	5279	RAB40B	10966
C6orf155	79940	RAB6A	5870	GPR125	166647	RANBP10	57610
BCMO1	53630	MFAP3	4238	SLA	6503	ERP70	9601
RRN3	54700	KIF2	3796	CDK2	1017	FAM3A	60343
SLC25A27	9481	PNPLA4	8228	MYD88	4615	PCNA	5111
CTSO	1519	PSME1	5720	ANGPTL3	27329	LL5beta	
APIG1	164	CHI3L2	1117	ERCC1	2067	HNMT	3176
SCAMP1	9522	KRTCAP2	200185	ARV1	64801	FLJ90586	135932
FLJ10769	55739	TNF	7124	CCL15		FLJ30213	
ATP10D	57205	CRKL	1399	GJC1	125111	MGC12904	
KIAA1715	80856	TNFSF10	8743	WDR9	54014	MGC45386	374659
AP3S1	1176	CD74	972	ARR3	407	ACTG1	71
FUSIP1	10772	NRG1	3084	ZNF75	7626	NAV3	89795
MGC24180		TRD@	6964	SPP1	6696	DP1	
ACINUS		VARS2	7407	BMP6	654	GAPD	2597
WARS	7453	ACVRL1	94	KIF11	3832	LOC115294	115294
SCARB2	950	APC	324	LCK	3932	L3MBTL2	83746
SPP2	6694	ZNF451	26036	VBP1	7411	MYOM1	8736
SFXN1	94081	CBLL1	79872	MXI1	4601	HSPA9B	3313
CSMD1	64478	CISH	1154	HMG2	3151	PPP2R2C	5522
RHEB	6009	ZNF198	7750	CHD1	1105	GIMAP4	55303
CNIH	10175	FLJ14050	79927	GSTM1	2944	MPZ	4359
DDB2	1643	SPHAR	10638	TOSO	9214	CCBE1	147372
TRIM66	9866	CA8	767	TDG	6996	GPC5	2262
XPOT	11260	KIAA0962	23341	IER3	8870	ITGB3	3690
ACTB	60	MYCT1	80177	THY1	7070	RALB	5899
CCNG1	900	MATR3	9782	PTPN3	5774	PKMYT1	9088
BIG1		RNF135	84282	LTB	4050	COPS5	10987
RPL15	6138	KIAA0515	84726	TANK	10010	BRCA1	672
HPCA	3208	NDUFB6	4712	GZMB	3002	PIK3CG	5294
EIF2S2	8894	TPST1	8460	IL11RA	3590	FY	2532
GDA	9615	SCARB2	950	TRADD	8717	PSAP	5660
FLJ11036		AKAP12	9590	SC4MOL	6307	MAP3K3	4215
HTR7	3363	STAR	6770	LOC220929	220929	ITK	3702
DDEF1	50807	KIAA1952		MGC41945	138724	MUC1	4582
RUNX1T1	862	TM4SF6	7105	LOC90799	90799	RIPK2	8767
USP22	23326	EXT1	2131	C10orf48	283078	RNASE4	6038
MYL9	10398	SENP8	123228	MAN1C1	57134	CCL17	6361
WASF3	10810	TNFAIP1	7126	SH3MD2	57630	BIRC3	330
C20orf59	63910	KIAA0195	9772	SLC6A11	6538	AMMECR1	9949
WDR8	49856	MYNN	55892	MUC13	56667	FLJ90579	283310
STK4	6789	KLF12	11278	COPI		FLJ14721	84915
FOXA1	3169	YARS	8565	MGC39350		MIB	

Gene Symbol	Entrez Gene ID	Gene Symbol	Entrez Gene ID	Gene Symbol	Entrez Gene ID	Gene Symbol	Entrez Gene ID
C19orf21	126353	P53AIP1	63970	MAPK3	5595	RGNEF	64283
DJ971N18.2	56255	PRDM2	7799	MYCN	4613	RAB27A	5873
RAD21	5885	H63	113201	SMAD4	4089	ARHGAP25	9938
CLN2		RAPH1	65059	PIP5K1B	8395	IMP-3	10643
RAD51L3	5892	CCL20	6364	PPP1R11	6992	AZGP1	563
psiTPTE22	387590	KIAA1061		IFNG	3458	SOD1	6647
DKFZp761C169	65056	SNX1	6642	TNFSF7	970	TTID	9499
REST	5978	SPCX, CXorf52		MAPK9	5601	ANAPC1	64682
FBS1	64319	DKFZp761D221	84251	PLA2G5	5322	NR1D1	9572
GC20	10289	SCN4B	6330	CYP7B1	9420	TJP1	7082
SSTR1	6751	CRSP3	9439	EFHA2	286097	SPR	6697
ZBTB5	9925	VILL	50853	PTHR2	5746	SRD5A1	6715
C2orf10	91752	CDYL2	124359	NEDD9	4739	CXCL11	6373
EMP2	2013	LMNA	4000	VIPR2	7434	HDGF	3068
GPRASP2	114928	PFAAP5	10443	RNF138	51444	RHOD	29984
						IGHG3,	3502,
B4GALT5	9334	GOLGA1	2800	BPNT1	10380	IGHD	3495
SMC1L1	8243	SSBP1	6742	FLJ13611	80006	IRF1	3659
LAMC3	10319	TNFRSF10D	8793	FLJ21657	64417	GNB1	2782
DJ1042K10.2		HNRPU	3192	MNDA	4332	MST1R	4486
PEX12	5193	CGI-127		SOM		INPP1	3628
ATIC	471	CD3G	917	FLJ10902		TCRIM	50852
KCNK3	3777	CANX	821	LIP8	116840	HLA-DMB	3109
FLJ20489	55652	SYNPO	11346	ELF4	2000	CDKN2A	1029
C9orf61	9413	ATPAF2	91647	FLJ12700	79970	HLA-F	3134
ARHGAP20	57569	CGI-72		SLC12A5	57468	XCL1	6375
MRPL38	64978	TAF6	6878	PITRM1	10531	HOXB7	3217
CP110	9738	NFE2L2	4780	EIF2B3	8891	ASPCR1	79058
HLA-DRB1	3123	USP7	7874	ASTN	460	SLC16A8	23539
SUCLG1	8802	CSTF1	1477	LOC169611		PH-4	54681
ZNF313	55905	HPCAL1	3241	DEFA1	1667	PRLR	5618
TCF2	6928	MARK3	4140	EPHX2	2053	KIRREL2	84063
LGALS8	3964	KIAA1018	22909	MGC2452		MSP	84000
KIAA0478	9923	ZFR	51663	PRKWINK4		HAO1	54363
FKBP5	2289	SRRM1	10250	GLE1L	2733	SFXN5	94097
EFNB1	1947	GABARAPL1	23710	FLJ20507	55654	RSN	6249
HIPK1	204851	DGKZ	8525	DKFZP434P211	29774	ZNFN1A4	64375
MTRF1L	54516	EPHA3	2042	PANK1	53354	TCF21	6943
CSDA	8531	C3AR1	719	ARG2	384	RAP1A	5906
CYP2D6	1565	AFG3L1	172	ADCK4	79934	FOSL1	8061
KIF5B	3799	ZCCHC8	55596	EFCBP2	54550	FDFT1	2222
LAMB1	3912	DGAT2	84649	GOT1	2805	KIAA0089	
CDX2	1045	ACVR1	90	SPATA7	55812	CECR6	27439
DCLRE1A	9937	PCNA	5111	NAPA	8775	ARHGAP21	57584
CHGB	1114	IL1R2	7850	SFRS5	6430	LANCL2	55915
ENO1	2023	TXNRD1	7296	OR4C6	219432	FLJ21128	80153
KIT	3815	CETN3	1070	DIXDC1	85458	PTK2	5747
CD34	947	PRKD3	23683	ZNF532	55205	FAM53C	51307
AXL	558	RAB7	7879	LRFN5	145581	SRF	6722
EPB41	2035	AIM2	9447	RAB31	11031	FNDC5	252995
STAT5A	6776	YWHAZ	7534	KCNJ4	3761	MAEA	10296

Gene Symbol	Entrez Gene ID	Gene Symbol	Entrez Gene ID	Gene Symbol	Entrez Gene ID	Gene Symbol	Entrez Gene ID
GABRE	2564	PLK4	10733	FLJ12287		MSI2	124540
UBE2D2	7322	FBN1	2200	CRG-L2		FLJ33069	137835
SRCAP	10847	CTDSPL	10217	BACH1	571	MGC33867	90231
PPEF1	5475	TXNL		FLJ20272	55622	C9orf39	54875
SR-A1	58506	ZNF200	7752	SOX9	6662	C14orf138	79609
ARF4L	379	CDC42BPA	8476	GPD2	2820	FLJ20054	54530
SLC35F1	222553	STARD7	56910	KIAA1724		RARRES1	5918
EGR1	1958	KIAA2018	205717	LOC254531	254531	PCDHB13	56123
KCTD10	83892	SDBCAG84	51614	CCNT1	904	RSU1	6251
GC	2638	DKFZP566G1424		MLLT10	8028	CDC40	51362
CDH1	999	GPR158	57512	SUCLG2	8801	HRPT2	79577
SIAT10	10402	NLN	57486	NPHP4	261734	SEMA7A	8482
FLJ20758	55037	RGN	9104	SOX11	6664	MARCKS	4082
PEX11A	8800	FLJ35630	166379	PNOC	5368	SLC35C2	51006
UBP1	7342	JMJD2C	23081	SYT4	6860	ISL1	3670
GLE1L	2733	FLJ10521	55160	UBE3A	7337	PCDH11X	27328
C7	730	ABCB8	11194	DKFZp761B107	91050	ENPP2	5168
C10orf11	83938	DKFZP564D166	26115	SYK	6850	PKP2	5318
KAB	9859	NRXN1	9378	CRHR1	1394	SV2A	9900
KIAA1644	85352	LMO2	4005	SPP1	6696	NFASC	23114
GTF2H1	2965	DKFZp564J157	54458	RPS7	6201	MT1F	4494
TBP	6908	MYOD1	4654	HRMT1L6	55170	NDUFB5	4711
KIF17	57576	FLJ32731	138050	COQ7	10229	MGC19595	
CXCR6	10663	PSMC2	5701	NFATC1	4772	KIAA0494	9813
ZFP161	7541	F2R	2149	NCALD	83988	BCL2L13	23786
KIFC1	3833	LOC55831	55831	SLC7A2	6542	EIF2C1	26523
GSTM4	2948	GABPB2	2553	KIAA1363	57552	KCNV1	27012
LYN	4067	DNAJB1	3337	KIAA0543	23145	KIAA0266	
RXRB	6257	ITGA8	8516	ZNF20	7568	TBC1D5	9779
YES1	7525	ZNF146	7705	GDF10	2662	C3	718
EPB41L2	2037	HMGA1	3159	HSD17B8	7923	ADNP	23394
DNMT1	1786	HLX1	3142	FLJ11021	65117	CLDN5	7122
PTPN11	5781	P2RY5	10161	EDNRB	1910	RFFL	117584
BBC3	27113	TCF4	6925	SERPINH1	871	IRS1	3667
EVPL	2125	K-ALPHA-1	10376	ARPC5	10092	CLDN11	5010
ANXA11	311	PASK	23178	CD86	942	PKD2	5311
DOCK8	81704	PCTK3	5129	GNB5	10681	TDRD7	23424
AFM	173	CD69	969	SILV	6490	COL9A2	1298
GCA	25801	TRPC6	7225	PGF	5228	FAM32A	26017
PKD1L2	114780	HSD17B8	7923	PDCD10	11235	LOC284701	284701
EPHA5	2044	MRPS18B	28973	PDE2A	5138	POU4F1	5457
C20orf174	128611	IFNW1	3467	CXCR3	2833	PLEK2	26499
SOX30	11063	TP73L	8626	ARHGAP1	392	ATF4	468
SH3YL1	26751	DSC1	1823	FURIN	5045	TAL1	6886
FLJ34922	91607	KCNMB2	10242	CDKN1A	1026	GABPB2	2553
ARS2	51593	TMEM7	83597	EBI2	1880	C2orf3	6936
HLA-DOB	3112	CDC26	246184	ADORA3	140	MMP10	4319
FLJ14871		EIF2C3	192669	TFCP2L2	29841	DDX11	1663
ARID3B	10620	CAPNS2	84290	KIAA1039		KLF10	7071
RAP2A	5911	RAB39B	116442	SOX2	6657	TFAP2A	7020
RUNX3	864	CAMSAP1	157922	FLJ32670		DNASE2	1777

Gene Symbol	Entrez Gene ID	Gene Symbol	Entrez Gene ID	Gene Symbol	Entrez Gene ID	Gene Symbol	Entrez Gene ID
GPR17	2840	CDC25A	993	DKFZp547I048	127254	BAZ1B	9031
PDIR	10954	CAPZA2	830	SCRN3	79634	CAP2	10486
CD68	968	EN2	2020	MAN1A2	10905	PLS1	5357
PLCG1	5335	SHMT1	6470	HPS4	89781	CSNK1D	1453
CD1C	911	ATP5J	522	MEGF10	84466	TCF12	6938
UBD	10537	CNN2	1265	XK	7504	COPS8	10920
TAP2	6891	PIK3R1	5295	FLJ42986	389012	APG7L	10533
AGC1	176	FBLN2	2199	FLJ20160	54842	FLJ10276	55108
FLJ30707	220108	BRAF	673	C10orf38	221061	BBS4	585
FLJ33215		RBL2	5934	IMPDH1	3614	HSPC196	51524
ZNF473	25888	LMNB1	4001	PCF11	51585	THOP1	7064
KIAA1212	55704	IL6ST	3572	MYEF2	50804	SCARB1	949
NPL	80896	SMAD6	4091	TUSC5	286753	KIAA1052	
EEF1B2	1933	CXCL6	6372	DKFZp434C184	399474	LTA4H	4048
ENTPD1	953	CCRL2	9034	AOC2	314	LPAL2	80350
		HLA-DPA1	3113	MAPK14	1432	PCDH21	92211
FAM13A1	10144	CSNK1D	1453	SLC14A1	6563	PPFIA3	8541
DNCI2	1781	KIAA0592	253725	UBAP2L	9898	SNAP91	9892
LMCD1	29995	ZNF289	84364	MRPL36	64979	GABRA5	2558
RHOBTB2	23221	NEIL1	79661	SULT1A1	6817	KIAA0553	23131
LAMA2	3908	SMG1	23049	SPARC	6678	SBP2	
STXBP1	6812	Rab11-FIP2		TGFBR3	7049	OCIA	
MYO5B	4645	C9orf97	158427	E2F6	1876	HTGN29	
CS	1431	SETMAR	6419	CCNK	8812	LAMC3	10319
POLG	5428	OR52K3P	390035	GNA14	9630	SLC1A3	6507
CYP3A7	1551	CRNKL1	51340	ATF3	467	FLJ23834	222256
IFRD1	3475	C9orf5	23731	ACOX1	51	AF1Q	10962
CCL3	6348	FLJ20014	54785	KHSRP	8570	MTMR6	9107
DLG3	1741	NCB5OR	51167	TGFBR2	7048	ATP4A	495
LMAN1L	79748	ZAK	51776	DAD1	1603	JUP	3728
CHD4	1108	SELL	6402	DGKA	1606	STX1B2	112755
SLC9A8	23315	BCLAF1	9774	IFNAR1	3454	TNKS1BP1	85456
KPNA1	3836	ARCN1	372	ATM	472	M-RIP	23164
SORCS1	114815	TGFBR3	7049	TP53	7157	NARG1	80155
LOC83690	83690	TFF3	7033	NOL3	8996	SOX5	6660
TCBA1	154215	EGFL6	25975	PRKAB1	5564	DDX58	23586
FNTA	2339	WAC	51322	NYD-SP21	84689	CNTN1	1272
IRA1		MGC33302	256471	AGPAT3	56894	BBS1	582
DHX36	170506	ZNF513	130557	FLJ36980	286032	TCP10L	140290
RNF111	54778	MCM6	4175	C14orf172	115708	VAMP1	6843
N4BP3	23138	TTLL3	26140			FGF7	2252
SCG3	29106	SPTLC2	9517	DKFZp434E1822, FLJ20574		TP53BP2	7159
PSMD2	5708	MTVR1	23625	SIL1	64374	TPST2	8459
KPNB1	3837	PPEF1	5475	DERP6	23587	PDGFA	5154
PLDN	26258	KIAA1102	22998	SRPUL		PRIM1	5557
CERK	64781	PCCB	5096	TCF3	6929	GBP2	2634
NFIA	4774	PFDN1	5201	VRK1	7443	CCL14	6358
TOPBP1	11073	PTD004	29789	SLC26A2	1836	LAMA4	3910
TF	7018	MN1	4330	POSTN	10631	RARB	5915
FLJ20719	55672	TK2	7084	GIT2	9815	CD1A	909
HEL308	113510						

Gene Symbol	Entrez Gene ID	Gene Symbol	Entrez Gene ID	Gene Symbol	Entrez Gene ID	Gene Symbol	Entrez Gene ID
CAPN2	824	IGFBP6	3489	TULP4	56995	PBXIP1	57326
CXCL1	2919	NEDD4	4734	CDC42BPB	9578	DFFA	1676
NRP1	8829	APEX1	328	NAG	51594	KIAA1747	57795
DFFB	1677	SIAH1	6477	EIF2S2	8894	C6orf205	394263
MICA	4276	PLEK	5341	FLJ12700	79970	RAP2A	5911
TRIB2	28951	SITPEC	51295	BMP2	650	KIAA1171	57465
ZBTB10	65986	RBBP5	5929	NRL	4901	ERCC5	2073
JMJD2B	23030	ZBTB17	7709	ACCN1	40	PTPRF	5792
UBE2A	7319	ITGB5	3693	IL16	3603	COL2A1	1280
BAIAP1	9223	TNFSF4	7292	SPTAN1	6709	EPAS1	2034
RPL34	6164	BAT1	7919	RAB27B	5874	SNAPC1	6617
GPR24	2847	ACVR2B	93	CYR61	3491	BMX	660
		UMP-					
ANKRD11	29123	CMPK	51727	DNAJC10	54431	PPP2R5A	5525
L3MBTL	26013	KIAA1069		KLHL9	55958	IL13	3596
IBTK	25998	FLJ20522		CABIN1	23523	TLR5	7100
CRK7	51755	GIF	2694	MAPKAPK5	8550	PMS1	5378
RAB21	23011	TRIM33	51592	PIP5K1C	23396	GNB2L1	10399
TWSG1	57045	FLJ20445		PAEP	5047	CAPN5	726
IDE	3416	LOC133957	133957	NFKBIE	4794	HSPA1L	3305
ACVR1B	91	CARD10	29775	HLA-DOB	3112	C3AR1	719
FBXL2	25827	PEG10	23089	MAP2K2	5605	IL5RA	3568
TTC17	55761	RRAGA	10670	STK17A	9263	GSTO1	9446
VIPR1	7433	CDKN1B	1027	ADAT1	23536	AGER	177
FUK	197258	ASNS	440	EIF2S3	1968	MKNK1	8569
AHSG	197	ANAPC5	51433	FLJ20097	55610	DKFZP434K0427	
ZNF297B	23099	RNF3		CIR	9541	HYPM	
C2orf22	130814	COL12A1	1303	HSXIAPAF1	54739	RNF14	9604
SST	6750	FLJ38991	285521	NDFIP2	54602	ITCH	83737
CYB5-M	80777	TRAP240		DNASE1L1	1774	MBNL1	4154
RWDD2	112611	RAB11-FIP4		FLJ14281	79982	GRWD1	83743
VSNL1	7447	ARFRP1	10139	TBX3	6926	MGC16202	
NOS3	4846	TMP21	10972	ARPC2	10109	STARD9	57519
MFNG	4242	BAIAP3	8938	RNF139	11236	C1orf25	81627
COL5A2	1290	SMYD2	56950	NEK2	4751	PEPP2	
MT1J	4498	FEN1	2237	FLJ32549	144577	LOC90410	90410
NIN	51199	CIT	11113	PDZK3	23037	FBXO22	26263
HOXC6	3223	FLJ11323		TRIM11	81559	PDIR	10954
LECT2	3950	FLJ12517	65094	C9orf81	84131	C1D	10438
C9orf123	90871	EIF3S6	3646	ZNF336	64412	MGC13186	84284
ALS2CR12	130540	SLC19A2	10560	SART3	9733	FLJ23221	79630
DAXX	1616	FACL6		PLEKHA1	59338	TFDP2	7029
GRWD1	83743	ADCY7	113	PCDHA5		SEPP1	6414
ORC3L	23595	GPR23	2846	CCNK	8812	CENTD1	116984
SLAMF7	57823	CCND2	894	GAF1		SFMBT1	51460
TIMP2	7077	PPP1R16B	26051	ARL10C	55207	FBXW11	23291
CXCL12	6387	TAL1	6886	GRIP2	80852	C20orf104	
HRAS	3265	EHHADH	1962	GSTM5	2949	KIAA1354	
MT3	4504	HMGA2	8091	MGC11061	84272	FLJ14146	79762
FCER2	2208	COL15A1	1306	CA10	56934	GLO1	2739
BHMT	635	SLC22A3	6581	FBXO21	23014	FACL4	

Gene Symbol	Entrez Gene ID	Gene Symbol	Entrez Gene ID	Gene Symbol	Entrez Gene ID	Gene Symbol	Entrez Gene ID
SLC30A9	10463	NETO2	81831	GRAP2	9402	USP33	23032
VAMP4	8674	VMP	140767	PLK2	10769	PPM1H	57460
PLXNA1	5361	C6orf33	85315	MASA	58478	TFDP1	7027
UBE2G2	7327	LOC152185	152185	MOBKL1A	92597	TAGLN	6876
COL4A6	1288	C9orf10	23196	ATP11C	286410	RAD51L1	5890
MR-1	25953	FLJ20637		FLJ32731	138050	F2	2147
PP35	11062	ERAL1	26284	ZNF10	7556	TA-LRRP	23507
LOC90113	90113	GSDML	55876	CLCNKA	1187	ACTA1	58
CYP2C9	1559	FLJ10349	54707	FLJ21865	64772	AOAH	313
TLK2	11011	RAD18	56852	C21orf107		STAT4	6775
E2F1	1869	YWHAQ	10971	SLIC1	124460	CEACAM1	634
HIST2H2BE	8349	NAPIL1	4673	KLF12	11278	NINJ1	4814
PPP2R1B	5519	MLLT2	4299	PITX2	5308	CASP1	834
BHMT2	23743	FEZ1	9638	IL28RA	163702	PIK4CB	5298
PNRC1	10957	CPE	1363	PLEC1	5339	PAX9	5083
RRAD	6236	SREBF2	6721	EVA1	10205	BMP4	652
ECE1	1889	NDUFB10	4716	CCL18	6362	TRAF3	7187
LAIR1	3903	OCA2	4948	KIAA1853	84530	NUDT6	11162
SEPT6	23157	ADCY8	114	FTO	79068	VRK2	7444
RAG1	5896	SNAPC3	6619	C14orf100	51528	DIRC1	116093
AK3	205	CLIPR-59	25999	SURF4	6836	GBP5	115362
CCT7	10574	C14orf125	25938	LSM3	27258	PRKAA1	5562
IL2RB	3560	PAM	5066	HSPC111	51491	LOC115749	115749
PIP5K1A	8394	SF3B2	10992	GPATC4	54865	BOMB	80014
ARID4A	5926	FLJ21439	80208	MRPS26	64949	FLJ20626	55663
SAFB	6294	SCG3	29106	C21orf106	23181	MUC15	143662
ACVR1B	91	PHLDA2	7262	OSTM1	28962	BACH1	571
LSAMP	4045	NEFH	4744	C1orf8	9528	SUPT5H	6829
HOXC8	3224	FLJ14154	79903	RAP1B	5908	C21orf107	
CCRK	23552	ATBF1	463	FBXL6	26233	SVIL	6840
GPR105		PCNT2	5116	GABRB3	2562	PPP3CB	5532
HLXB9	3110	PKNOX1	5316	WASF1	8936	C13orf1	57213
METTL4	64863	GTF2B	2959	DKFZP547E1010	26097	OAT	4942
ANUBL1	93550	PTGS1	5742	YWHAE	7531	FLJ21977	
STAU	6780	UGT2B7	7364	SOAT1	6646	PRKWINK1	
FLJ23514	60494	NEFL	4747	MAGEA10	4109	ZNF297	9278
ZFX	7543	ZNF174	7727	SEC24D	9871	ADHFE1	137872
FXYS5	53827	ZNF200	7752	FLJ20152	54463	RPC62	
FLJ20203	54856	KAI1	3732	EFNB3	1949	SCARF1	8578
PLAC2	257000	KIAA0033	440026	HEY1	23462	SC4MOL	6307
FLJ14166	79616	SP140	11262	MOCS2	4338	KATNB1	10300
TRIM10	10107	LTBP1	4052	TIMM22	29928	AQP4	361
CSL4		XRCC5	7520	SOD3	6649	NEFL	4747
LOC153222	153222	AKT1	207	TRPV1	7442	FLJ21195	
LOC137392	137392	DUSP3	1845	RPL7	6129	MGC23937	139596
HRB2	11103	PPP3R1	5534	PIPOX	51268	FLJ31978	144423
KPNA3	3839	BAK1	578	GDPD2	54857	MFTC	81034
CAPG	822	RAVER1	125950	RBBP6	5930	DJ473B4	
MSRA	4482	IL9R	3581	SOX6	55553	PPFIA1	8500
GSTT2	2953	SP100	6672	GTF3C3	9330	ARVCF	421

Gene Symbol	Entrez Gene ID	Gene Symbol	Entrez Gene ID	Gene Symbol	Entrez Gene ID	Gene Symbol	Entrez Gene ID
ICA1	3382	RNPC4		PGM2L1	283209	DGCR8	54487
PTPRZ1	5803	PPP2R2B	5521	DNM1L	10059	GATA2	2624
BRRN1	23397	TOM1L2	146691	C11orf1	64776	MUC15	143662
WNT7A	7476	KIF21A	55605	GCN5L2	2648	LOC168850	168850
SHMT1	6470	DDR2	4921	SPTAN1	6709	LNPEP	4012
TERF2	7014	PPP1R13B	23368	BTG2	7832	BPHL	670
TGFB3	7043	GGPS1	9453	KIAA1337	57540	GNG10	2790
TP53BP2	7159	SYNGR2	9144	ARMC7	79637	LOC133619	133619
RHO	6010	TBC1D1	23216	RTN4	57142	KCNK1	3775
RAB2	5862	UPP1	7378	TFB2M	64216	NUP214	8021
QSCN6	5768	PQBP1	10084	RASGEF1A	221002	GNG2	54331
KAL1	3730	CT120	79850	FGD3	89846	C10orf26	54838
BMPR2	659	DHRS4	10901	HP1-BP74	50809	SIAT9	8869
IRF3	3661	SENP6	26054	ADORA3	140	WINS1	55180
CTPS	1503	JMJD2A	9682	MEN1	4221	DDX18	8886
RPS16	6217	CASC2	255082	RPS11	6205	PP	5464
BSG	682	KLRA1	10748	UGT2B4	7363	F8	2157
AGTR1	185	IGSF1	3547	AP2B1	163	UGCGL2	55757
IL1RAP	3556	COX7A2	1347	MGC71993	440400	TNFRSF7	939
DUSP1	1843	CECR1	51816	POLR3F	10621	CGI-01	
NOS2A	4843	C5orf13	9315	MuLK	55750	PXR1	
GADD45B	4616	CDK2AP1	8099	SLC13A5	284111	FLJ37953	129450
BLM	641	DDX11	1663	HOXA9	3205	ACP1	52
PKN2	5586	UNG	7374	EGFR	1956	HT021	
PHKB	5257	ODC1	4953	HPRT1	3251	EDG2	1902
MI-ER1	57708	RAD21	5885	PSG4	5672	SLC7A1	6541
FLJ25770	339965	KIAA0265	23008	SAS	6302	BAZ1B	9031
FLJ11752	92344	LILRA3	11026	MYOM1	8736	BHLHB3	79365
HARC		SFRP1	6422	KTNI	3895	FBXO7	25793
FAM11B	79134	IL18R1	8809	EIF2B1	1967	LCP2	3937
LIG4	3981	INPP5D	3635	SH3BP2	6452	EFCBP1	64168
SUHW2	140883	DOCK1	1793	MGLL	11343	NLGN2	57555
KIF21A	55605	PRF1	5551	STK4	6789	CCL20	6364
HCAP-G	64151	HLA-DPB1	3115	TITF1	7080	WSB1	26118
CGI-141	51026	INHBA	3624	MGC3040	66000	UBE2V1	7335
DNC11	1780	HLA-DQA1	3117	MGST1	4257	SLC4A4	8671
STC1	6781	PIK3R2	5296	E2F5	1875	LOC257106	257106
COX7A2L	9167	HSMPP8	54737	CFHL1	3078	TBC1D15	64786
ANXA7	310	LIFR	3977	CAPN1	823	LMO4	8543
MTIF2	4528	PASD1	139135	PPP1R10	5514	BLMH	642
BACE		FLJ10408	55138	TIMP1	7076	C3F	10162
C6orf72	116254	SPOCK	6695	FLOT1	10211	RUNX1	861
PSARL	55486	ROBO1	6091	STK39	27347	NR2C1	7181
LEAP-2	116842	MGC4701		KIAA1648	284900	PRPF4B	8899
SEC13L		BRDG1	26228	GGCX	2677	LAMB3	3914
PPM1E	22843	ATP8B4	79895	NR3C1	2908	ATIC	471
RWDD1	51389	KIAA1336		FLJ20331	55631	CD79A	973
SEC61A1	29927	MAP3K1	4214	ATF7	11016	CYP1A1	1543
TIMM50	92609	SPOCK	6695	EVA1	10205	SLAMF1	6504
KIAA0720	57449	MAPK10	5602	KIAA0962	23341	CD1D	912

Gene Symbol	Entrez Gene ID	Gene Symbol	Entrez Gene ID	Gene Symbol	Entrez Gene ID	Gene Symbol	Entrez Gene ID
SMAD7	4092	ORMDL2	29095	NBS1	4683	SOX11	6664
CCL16	6360	CTNNA2	1496	RGS4	5999	HINT2	84681
HSPB1	3315	SPFH1	10613	KIAA0523	23302	TBK1	29110
ACE	1636	PTDSR	23210	STK16	8576	KCNC1	3746
C8G	733	COL11A2	1302	AKIP	54998	KIAA1737	85457
MAP4K3	8491	PFDN5	5204	COPG	22820	TBL1X	6907
SE57-1	80323	BTF3	689	THAP10	56906	HXMA	348158
TAS2R14	50840	AHR	196	SRD5A2	6716	CDH16	1014
FLJ21369	79860	RECQL	5965	NT5C2	22978	BIRC3	330
MCM10	55388	AKR1B10	57016	PLG	5340	C20orf77	58490
DKFZp547E052	84236	SKIIP	22938	CP	1356	COPS6	10980
GDEP	118425	CCL22	6367	GAP43	2596	GRIK1	2897
SASH1	23328	THBD	7056	BARD1	580	HCNGP	29115
DACH2	117154	SHB	6461	RAB8A	4218	GCLM	2730
ABCD3	5825	LY64	4064	ZNFN1A1	10320	FUBP1	8880
TIAM2	26230	NTRK2	4915	SELP	6403	TSN	7247
TM6SF1	53346	PTPN1	5770	TFAP2C	7022	RAD51C	5889
AHI1	54806	CD6	923	FRS3	10817	BENE	7851
HOXC6	3223	CASP8	841	ITGAL	3683	RPL5	6125
ZNF10	7556	ZNF148	7707	TNFSF11	8600	CD24	934
PRO0149	29035	SNX10	29887	PAK2	5062	NRAS	4893
VCL	7414	FLJ33860	284756	CNOT8	9337	PIP	5304
LOC112476	112476	TIPARP	25976	CD96	10225	PTPRM	5797
LOC90806	90806	PHF20L1	51105	BAT2	7916	CD40	958
B3GALT3	8706	BCKDHA	593	BAI1	575	RBBP7	5931
DKFZp761B1514	84248	RDH-E2		CTSD	1509	CTGF	1490
CGI-41	51093	ATP5O	539	FLJ36878	284114	CEACAM8	1088
THRAP2	23389	PPFIBP1	8496	MI-ER1	57708	ITGA7	3679
PPP2CA	5515	OSBPL3	26031	DKFZP547N043	83932	PFTK1	5218
DLG2	1740	FLJ22494	79873	PTRF	284119	EIF4G1	1981
CPLX2	10814	MAP3K10	4294	LRIG1	26018	LOC153222	153222
RBM4	5936	CYP2J2	1573	MGC24039	160518	KCNA4	3739
KCNF1	3754	LOC128344	128344	FLJ21820	60526	SLCO5A1	81796
C22orf4		ATPAF1	64756	HIBADH	11112	FLJ39821	
PTN	5764	G2	25758	XTP1		SLC35F1	222553
ZNF140	7699	HAT1	8520	AP3B2	8120	FLJ13057	
LOC202451		FBLN5	10516	GEM	2669	GLCE	26035
PTPRO	5800	QKI	9444	RPS6KA5	9252	LOC51066	51066
LOC162427	162427	MGC21416	286451	SUPT6H	6830	KIAA0460	23248
ZNF216		SASH1	23328	RAI16	64760	KIFAP3	22920
PCGF3	10336	HERPUD1	9709	RARS	5917	BCLP	113452
WBSCR17	64409	NFE2L3	9603	ARK5	9891	ZNF117	7670
C10orf84	63877	SNTA1	6640	NOPE	57722	CD58	965
FN3KRP	79672	SIAHBP1	22827	DKFZp434L142	51313	ZNF180	7733
BSCL2	26580	DKFZp761G0122		PTPRE	5791	NDUFC1	4717
INSL3	3640	SH3MD3		SNX1	6642	ARL3	403
PPP1R3F	89801	FLJ20071		CROT	54677	KIAA0052	23517
LONP	83752	HSU79275	27105	NR4A2	4929	PTPRE	5791
PDLIM5	10611	GATA3	2625	CXorf50	203429	M6PR	4074
FABP1	2168	GULP1	51454	CORO1C	23603	SLC1A2	6506

Gene Sym- bol	Entrez Gene ID	Gene Symbol	Entrez Gene ID	Gene Symbol	Entrez Gene ID	Gene Symbol	Entrez Gene ID
TRB2		KIAA1324	57535	GSTA3	2940	ETV5	2119
LIG1	3978	GPR34	2857	COL4A4	1286	CYP26A1	1592
HSPC155		LOC284462		ACY1	95	SLC9A6	10479
SYNGR1	9145	TULP4	56995	SPAM1	6677	ARPC4	10093
APG7L	10533	NARG1	80155	EDG1	1901	DKFZP566A1524	
DC12	56941	PPM1A	5494	TEC	7006	ATP6V1A	523
NAPB	63908	FLJ31614		GP1BA	2811	COIL	8161
EP400	57634	GLCCI1	113263	TFRC	7037	FLJ31438	130162
BRPF1	7862	SBLF		IL12RB2	3595	STIM2	57620
PEX3	8504	PITPN		SF3B1	23451	VPS37C	55048
SLITRK3	22865	DKFZP434H132	56905	CSNK1G3	1456	SLC12A5	57468
ERG	2078	FCGR3A	2214	GALNAC4S-6ST	51363	KDR	3791
HSPB2	3316	HSPA9B	3313	HLA-E	3133	DIRAS2	54769
GDI1	2664	LBR	3930	TNFRSF9	3604	C6orf134	79969
CNDP1	84735	KIAA0650	23347	BAT3	7917	BUB3	9184
CPVL	54504	PLAUR	5329	GRB10	2887	RIN2	54453
DAO	1610	HTGN29		DAB2	1601	IGFBP3	3486
DBT	1629	CDC25A	993	DFFA	1676	HAX1	10456
HADH2	3028	ILF3	3609	FLJ12681	64788	2'-PDE	
HSPCB	3326	KIAA1991	254225	CPT1A	1374	MGC39827	160777
FLJ20758	55037	CAMK2B	816	VGLL1	51442	TRPS1	7227
GTPBP4	23560	ARHB		FLJ14009		ESRRBL1	55081
DCN	1634	ANKRD17	26057	C12orf2	11228	KIAA1727	85462
MAP4K5	11183	JMJD2B	23030	LOC284058	284058	NYREN18	51667
EFNA4	1945	GCC1	79571	CD86	942	SMARCA3	6596
RALA	5898	RAB28	9364	DBC-1		FJX1	24147
GPR4	2828	B3GALT3	8706	TA-LRRP	23507	MI-ER1	57708
PSTPIP1	9051	TPST1	8460	UBXD4	165324	MBIP	51562
SOCS2	8835	PSMA1	5682	C21orf91	54149	LOC92912	92912
CP	1356	ANK3	288	TRIM23	373	SEMA6A	57556
SELPLG	6404	SMYD4	114826	SCAMP1	9522	SERPINF1	5176
CAV2	858	RAD23B	5887	DKFZP434L0117	64793	PLK4	10733
SYNCOILIN	81493	L3MBTL3	84456	DEF6	50619	IFIT5	24138
ATP9A	10079	ALOX5	240	UBA2	10054	CYP2C9	1559
NOS3	4846	AFAP	60312	ARHGAP10	79658	CD48	962
SLPI	6590	SULT1E1	6783	SMARCE1	6605	YWHAH	7533
BAT8	10919	PLA2G1B	5319	LOC114659	114659	C9	735
GFRA3	2676	RPS15A	6210	DOCK10	55619	CSF2RA	1438
GTSE1	51512	POLB	5423	PPARBP	5469	TIAM1	7074
CASK	8573	MRPL9	65005	CGI-07	51068	TRAP1	10131
PLAC2	257000	SHCBP1	79801	ZNF16	7564	ICAM1	3383
FLJ12735	79915	FGF2	2247	SLIT1	6585	PTN	5764

Gene Symbol	Entrez Gene ID	Gene Symbol	Entrez Gene ID	Gene Symbol	Entrez Gene ID	Gene Symbol	Entrez Gene ID
MAP4K4	9448	DKFZp761P1010		MGC45491	221416	ZAP70	7535
P2RY2	5029	FPRL1	2358	ZNF473	25888	AREG	374
NR1D2	9975	PTPN21	11099	PLUNC	51297	BF	629
TNFSF4	7292	C14orf11	55837	FLJ10252		BRD2	6046
ZNF398	57541	SALL2	6297	ANKRD12	23253	EPHA3	2042
DHX29	54505	NCOR2	9612	RAB22A	57403	DYRK3	8444
FLJ39441	144108	TTC3	7267	CD2AP	23607	C18B11	
DKFZp586G0123		CD8B1	926	ALOX5AP	241	SLC30A5	64924
MGC33214	153396	CRIL	1379	COX4I1	1327	SEC5L1	55770
MGC39518	285172	HECA	51696	ZNF482	10773	KIAA1233	
ZNF148	7707	FGL1	2267	M96	22823	KCNK2	3776
SAMD6	203286	TBP	6908	DNCI2	1781	KLHL3	26249
ANK3	288	SUPT16H	11198	KIAA0830	23052	MAOA	4128
BCL3	602	VDRIP		NELL2	4753	GNG12	55970
KIAA0582	23177	FLJ13110		ECE2	9718	TTC7L1	
ATP6V1C1	528	PPPIA	5499	SET	6418	CPLX1	10815
C21orf25	25966	GDAP1L1	78997	ZNF406	57623	KRT23	25984
PDXK	8566	SYT1	6857	EIF2B3	8891	TPM1	7168
C20orf177	63939	DICER1	23405	KEAP1	9817	TTC7	
ZNF511	118472	SCN2B	6327	OAZIN	51582	KCTD14	65987
COMMD10	51397	PGM2L1	283209	SEC31L2	25956	FLJ36748	134265
RFX5	5993	PITRM1	10531	SP2	6668	FAM16AX	
NAP1L3	4675	FBLN1	2192	GTF3C4	9329	ETEA	23197
STK38	11329	CKAP2	26586	AIP1	9863	FURIN	5045
RAB5A	5868	SLC35A2	7355	C16orf34	90861	COX6C	1345
FLJ21908	79657	NFE2L1	4779	PTPRT	11122	FLJ10006	55677
CNAP1	9918	HLA-DPA1	3113	COMMD7	149951	IFNAR2	3455
UBCE7IP5		NUP37	79023	KIAA1582		SPRED2	200734
ZNF174	7727	PPARA	5465	NY-REN-41	91057	MGC26885	124044
FLJ34588		EGR2	1959	NCKAP1	10787	GPM6A	2823
MST4	51765	LOC474170	474170	LMO3	55885	C9orf45	81571
LOC134147	134147	C9orf80	58493	CR11	23741	PM5	
USP15	9958	ADAMTS6	11174	MAP3K6	9064	C20orf3	57136
LOC403313	403313	GNRH1	2796	PPP3CA	5530	SCG3	29106
HRB	3267	ROM1	6094	NSEP1	4904	LOC55971	55971
CHST3	9469	MMP3	4314	GGTL3	2686	RAB40C	57799
IL1B	3553	DLL1	28514	HECW1	23072	RDH14	57665
CDC20	991	PKP2	5318	CYP2B6	1555	PCDHA6	56142
SCD	6319	TXNL1	9352	ATM	472	BID	637
ARL3	403	CCL11	6356	ARID4B	51742	TEBP	10728
HRMT1L2	3276	GTF3C2	2976	GTF2B	2959	RAPGEF2	9693
RBM5	10181	PRPS1	5631	NIT1	4817	PCOLN3	5119
AKAP1	8165	POU3F1	5453	VTN	7448	GFAP	2670
HUS1	3364	UCK2	7371	SRPK1	6732	ZNF207	7756
HLA-C	3107	CD44	960	C6orf136	221545	FLJ13614	84142
IGFBP1	3484	WT1	7490	CACYBP	27101	ADAM9	8754
CSNK2A1	1457	C7	730	KCNB1	3745	AICDA	57379
STAT2	6773	CXCR4	7852	ARHGDIB	397	SLC31A2	1318
DKFZp451J0118	200081	PTPN2	5771	FSTL1	11167	HDCMA18P	51574

Gene Symbol	Entrez Gene ID	Gene Symbol	Entrez Gene ID	Gene Symbol	Entrez Gene ID	Gene Symbol	Entrez Gene ID
CALM1	801	RAB1A	5861	ATP1B3	483	LPPR4	9890
CTNNB1	1499	CDA	978	SYNPO	11346	AARS	16
BTK	695	GPR39	2863	MAST3	23031	LOC130074	130074
IKBKE	9641	WNT2B	7482	FLN29	10906	PAPPA	5069
DRB1	129831	IRF3	3661	SLC12A5	57468	KLF13	51621
TBX18	9096	RALGDS	5900	CLSTN3	9746	DLGAP2	9228
BRP44L	51660	IL6	3569	PODXL	5420	ZNF37A	7587
RPL18A	6142	TNFRSF1B	7133	THOC2	57187	TRIP13	9319
RASGEF2		PIK3C3	5289	RBP3	5949	CD22	933
KIFC1	3833	B3GALT4	8705	KRT10	3858	RPS6KA6	27330
YBX2	51087	HCG9	10255	ST13	6767	WFDC1	58189
DKFZP586A0522	25840	CCL5	6352	CLGN	1047	GNB2	2783
KIAA0970		C6orf67		EGF	1950	LPIN2	9663
TUBB6	84617	LOC146206		ZIC3	7547	PREX1	57580
ADAM2	2515	TNKS2	80351	DDR2	4921	MBL2	4153
ZNF193	7746	LOC200008		PIK3C2B	5287	FLT1	2321
CNK2		ITM1	3703	PPP3CB	5532	HSPB3	8988
CD59	966	NAP1L2	4674	MAP3K14	9020	COL4A5	1287
CCNA1	8900	FLJ37306		TCF19	6941	ERCC2	2068
AIP	9049	NR2E1	7101	GNPDA2	132789	NFKBIL1	4795
NPL	80896	PDPR	55066	MANEA	79694	DYRK1A	1859
FLJ22679	84187	PRKCG	5582	FLJ31166	120939	REA	11331
ABCF1	23	HSMPP8	54737	CRTAM	56253	CALM2	805
HDAC4	9759	DKFZP434G1415	83448	SGPP2	130367	FGFR3	2261
KIAA1128	54462	CLDN2	9075	KPNA3	3839	CCL3	6348
ITM2B	9445	HIP-55		C10orf24	219736	IL7	3574
FLJ13263		PLEKHF2	79666	WDFY1	57590	REN	5972
SRGAP2	23380	SELL	6402	KIAA1363	57552	MAPKAPK3	7867
DKFZP434K046	57017	PRL	5617	PROCR	10544	HSPA2	3306
C18orf11	64762	CAMTA1	23261	CTCF	10664	ERBB3	2065
BMP2K	55589	RAN	5901	DNMT1	1786	SERPINE1	5054
SFRS4	6429	PIASY		GNG4	2786	MAP3K4	4216
FLJ10094	55068	HGF	3082	OLFM1	10439	TCL6	27004
APC2	10297	SPTA1	6708	CAMK2G	818	SYT7	9066
ARNT2	9915	ARRB2	409	FLJ20551	54977	CACNG2	10369
VAMP2	6844	USP8	9101	CSTB	1476	HSFY	
PDE1B	5153	CHCHD3	54927	SGPL1	8879	FLJ32830	256957
ABCA7	10347	LRRN3	54674	ELF4	2000	LOC90806	90806
C14orf133	63894	UCHL1	7345	CGI-111	51015	RANBP6	26953
PLD2	5338	EI24	9538	FLJ14154	79903	PLCD3	113026
COL9A1	1297	RNPS1	10921	CTSH	1512	P5	
POLR3B	55703	DNALI1	7802	FANCG	2189	FLJ14431	
VAV3	10451	PRDM10	56980	MYH9	4627	BCL2	596
CSK	1445	LOC338797	338797	PPM1G	5496	FXYD3	5349
LOC221711	221711	RNF8	9025	CRKL	1399	MMP19	4327
MMP12	4321	ATRX	546	TCEA2	6919	FLJ23323	79707
ADH1B	125	UBXD2	23190	PI4K2B	55300	DKFZP564O243	25864
TTC11	51024	RRM1	6240	TIM14	131118	MGC4172	79154
TNXB	7148	LOC51123	51123	PGM2L1	283209	CACNA11	8911
MST1	4485	OSBPL10	114884	HS6ST3	266722	CSRP2BP	57325

Gene Sym- bol	Entrez Gene ID	Gene Symbol	Entrez Gene ID	Gene Sym- bol	Entrez Gene ID	Gene Sym- bol	Entrez Gene ID
KIAA1889	114786	MGC33382		PTPN22	26191	XPO1	7514
DDIT4L	115265	EPAC		BCL2	596	PLOD2	5352
UNQ8193		UBE2V1	7335	ATF2	1386	DHODH	1723
ZNF252		CYP19A1	1588	RPRM	56475	FCGR1A	2209
HTR3A	3359	VEGFC	7424	DOCK3	1795	ITGB1	3688
RAB10	10890	STAR	6770	PARVG	64098	ETV4	2118
PAG	55824	INSL4	3641	MERTK	10461	PFDN4	5203
TNKS2	80351	MYH10	4628	UGDH	7358	DAF	1604
NLN	57486	MASK		NANOS1	340719	CDC14A	8556
PFKL	5211	NINJ1	4814	FLJ45645	375287	MAP3K2	10746
LARS2	23395	NUP133	55746	DustyPK		CIZ1	25792
LOC223082		GFRA2	2675	GRINL1A	81488	PCDH1	5097
HIST1H2BK	85236	ZNF462	58499	FALZ	2186	MCM5	4174
IGBP1	3476	RAB1A	5861	ChGn	55790	PTK2B	2185
C20orf23	55614	RGS5	8490	SLAMF9	89886	SHOC2	8036
NUP88	4927	POLDIP3	84271	MGC10854	84260	13CDNA73	10129
FXYD6	53826	GART	2618	C21orf63	59271	ALAD	210
FLJ41603	389337	C19orf13	26065	LIPC	3990	TIF1	8805
NEK4	6787	DCTN2	10540	DNTTIP1	116092	LOC167127	167127
TNFRSF25	8718	KIAA0763		COX8A	1351	CLPX	10845
ADAM17	6868	ECEL1	9427	CTBP2	1488	FLJ20967	
HDGF	3068	PECAM1	5175	LOC57168	57168	CNOT8	9337
p49/STRAP	153443	FACL4		HMGCS1	3157	LOC255743	255743
ZNF545	284406	SCOTIN	51246	C6orf56		C21orf55	54943
HBG2	3048	BCL9L	283149	MGC12760	84809	Rab11-FIP2	
LOC146443	146443	BLCAP	10904	AGA	175	FLJ25778	254048
CDKN1A	1026	MGC70863	284942	ACP5	54	LOC137886	137886
KIAA0329	9895	PPIA	5478	G2AN		FLJ11175	
PRKCB1	5579	SCARB1	949	ARHGEF11	9826	KIAA0352	9880
ACTG1	71	FLJ21415	79794	LAMC1	3915		
TNFAIP3	7128	GUCA1B	2979	SIAT8E	29906	DNCI1	1780
ELK1	2002	BRCA1	672	FLJ33817	124997	MCAM	4162
SQLE	6713	hSyn	55188	KIAA0241	23080	RAB14	51552
CCND1	595	FRAP1	2475	CSPG3	1463	GGA2	23062
PCDHB10	56126	BMP2K	55589	ALG2	85365	C1orf16	9887
SMAD2	4087	MUC15	143662	MGC10067	134510	DJ167A19.1	54432
CD59	966	ZCCHC3	85364	HSPC056		SLC12A7	10723
CDW52	1043	PELO	53918	HDHD2	84064	UPA	
CORO2B	10391	MMP13	4322	GSTA4	2941	NAP1L5	266812
RDBP	7936	SLC17A5	26503	MAP1B	4131	IDI2	91734
MDC1	9656	FLJ10287	54482	MTPN	136319	LATS2	26524
IL8RA	3577	TESK1	7016	MAP1A	4130	PRTFDC1	56952
KIAA1163		CNN3	1266	NUP205	23165	PRO1914	
ADM2	79924	BGLAP	632	DPH2L2	1802	KIAA1737	85457
LOC126248	126248	NT5E	4907	KIAA0286	23306	PRKAG2	51422
NDN	4692	PNRC1	10957	RFC5	5985	C12orf8	10961
UNQ2430	375248	ZNF46	7597	FBXO8	26269	SLC30A2	7780
FLJ90119	144110	IQGAP1	8826	TRIAD3	54476	FLJ11220	
CRB1	23418	LIFR	3977	EPHA7	2045	MGC3101	79007
CRBN	51185	CDK10	8558	SFRP2	6423	LY6E	4061

Gene Sym- bol	Entrez Gene ID	Gene Symbol	Entrez Gene ID	Gene Sym- bol	Entrez Gene ID	Gene Symbol	Entrez Gene ID
STRAP	11171	FLJ23441	79731	MLL3	58508	CRK	1398
ZNF425	155054	SEC24A	10802	FLJ14431		CD14	929
ZNF358	140467	SLC7A6		APRT	353	IGFBP7	3490
DMPK	1760	SLC2A14	144195	CPT1A	1374	PTGES	9536
TXNDC10	54495	LOC157567	157567	APIG1	164	STK19	8859
RB1	5925	LGI2	55203	RFX5	5993	GAK	2580
RAB2B	84932	LYK5	92335	MAP1LC3B	81631	FLJ12650	79570
DDC	1644	OPTN	10133	DKFZp434D1428		KIAA1726	85463
CPT1B		FLJ31810	158038	CAPN2	824	VIPR2	7434
SP110	3431	REV1L	51455	TAF7	6879	DEFB106	245909
				HCMOGT-1	92521	NNAT	4826
MDM1	56890	SDK1	221935	NDUFAB1	4706	FLJ40432	151195
CDK5R1	8851	FLJ30596	133686	CDA08	81533	PLEKHG1	57480
PHKG2	5261	KIAA0663	9877	RNF4	6047	SAMSN1	64092
SMARCA1	6594	PAK3	5063	ASB1	51665	KIAA2026	158358
CBFB	865	PPP4R1	9989	C18orf1	753	MAF	4094
SDCBP	6386	ARPP-19	10776	KIAA1701		ELK4	2005
P2RY14	9934	TDRD7	23424	FGF13	2258	CGI-51	25813
EIF4E	1977	KCTD8	386617	PIGQ	9091	MCL1	4170
UVRAG	7405	TGOLN2	10618	MORF4L1	10933	CACNA2D2	9254
PRDM1	639	TAF1	6872	FLJ20125	54826	RPS8	6202
GAPD	2597	C20orf35	55861	HRMT1L1	3275	BCAS3	54828
NR4A3	8013	DKFZp686I15217	401232	CNTN4	152330	LOC138046	138046
PPP1R8	5511	IVNS1ABP	10625	KIAA2022	340533	MTRR	4552
ITGB1	3688	LACTB2	51110	C12orf4	57102	MBTPS1	8720
PTPN7	5778	AKR7A2	8574	EIF3S2	8668	CCT4	10575
TDE2	57515	C8orf13	83648	FLJ20531	55657	C12orf4	57102
PERP	64065	PLK1	5347	BM-002		DDO	8528
TNFRSF11B	4982	AGXT	189	ACY1L2	135293	TM6SF1	53346
CASP2	835	ZCSL2	285381	PGBD1	84547	ZNF239	8187
FLJ12178		SEMA3F	6405	CNTN2	6900	PDYN	5173
STK38	11329	MSX2	4488	MGC4655	84752	MAP2	4133
ACADL	33	GCM1	8521	TUBG1	7283	DKFZp761N1114	148808
ZNF-U69274		ITGB7	3695	NRP1	8829	TARDBP	23435
D2LIC	51626	FUBP3	8939	RNF34	80196	LHFP	10186
AHCY	191	INS	3630	BGN	633	CNOT7	29883
FLJ39609	284598	EIF3S9	8662	TIMM9	26520	SMOC2	64094
TCL6	27004	ATF3	467	PPEF2	5470	PIWIL2	55124
MPHOSPH1	9585	NUCB1	4924	RPS6KB1	6198	FGB	2244
Eu-HMTase1		TNFRSF21	27242	GSK3A	2931	USH2A	7399
FAM3C	10447	PRKACG	5568	ACTG2	72	FGL2	10875
KIAA0635	9662	MMP2	4313	RHEB	6009	NCE2	140739
KEL	3792	CNTFR	1271	TAPBP	6892	PRPSAP1	5635
MGC5178	79008	CLECSF2	9976	GNA15	2769	XRCC4	7518
LMO3	55885	KIAA1946	165215	LTBR	4055	PTGER3	5733
GDA	9615	PLAU	5328	PZP	5858	GDF8	2660
C3orf1	51300	PERQ1	64599	PKD1	5310	TNFRSF10B	8795
FLJ33708	285780	AK7	122481	APAF1	317	GLG1	2734
KIAA0779		FLJ11082		NR2F6	2063	COL5A2	1290
CHURC1	91612	MGC34646	157807	DUSP2	1844	DAF	1604
LOC92017	92017	OMG	4974				

Gene Symbol	Entrez Gene ID	Gene Symbol	Entrez Gene ID	Gene Symbol	Entrez Gene ID	Gene Symbol	Entrez Gene ID
CKS2	1164	RIP	84268	TAF1	6872	FLJ20160	54842
CDK3	1018	GARP	2615	LCP1	3936	KIAA0971	22868
CYP2A7	1549	MLANA	2315	ASGR2	433	PRO1905	
SPIB	6689	PARG	8505	TMED6	146456	STX16	8675
CGRRF1	10668	SMARCA4	6597	CLK1	1195	PPGB	5476
CD81	975	IKBKAP	8518	NRL	4901	M17S2	4077
NFATC4	4776	PTK9	5756	GTF2F1	2962	SIAT10	10402
CAST	831	CDK2AP1	8099	PSG4	5672	NRIP3	56675
ILIR1	3554	P2RX1	5023	MST1R	4486	DPF2	5977
SERPINB5	5268	PTD008	51398	ABR	29	ACYP2	98
STK23	26576	SEPT5	5413	EST (20)		DKFZp434O0527	255101
HOMER1	9456	ANXA13	312	PTK2	5747	NRXN2	9379
KELCHL	84861	LEFTY2	7044	COL6A1	1291	MEP1A	4224
INPP4B	8821	LOC200008		MYD88	4615	IL16	3603
CA13	377677	CASK	8573	PTPRC	5788	COL6A3	1293
RBJ	51277	BRS3	680	BCR	613	C6orf33	85315
S100A2	6273	KIAA0831	22863	IFNAR2	3455	NOC4	10328
I3CDNA73	10129	SRD5A2	6716	AIF1	199	POLS	11044
DKFZP564D172	83989	RBPMS2	348093	SPN	6693	FGG	2266
FLJ14775	84923	RECK	8434	DYRK2	8445	PSCD2	9266
NOD9	79671	CREBBP	1387	TRIP11	9321	ANXA8	244
MRPL15	29088	KIAA1530	57654	KIAA1922	114819	CHL1	10752
PAIP2	51247	AEBP1	165	FLJ12303		SPIB	6689
REPRIMO		C21orf66	94104	DKFZp762O076	55529	C1R	715
FLJ20010	54494	ARF4	378	ZNRF4	148066	IGF2R	3482
FLJ20097	55610	CXCL2	2920	PIGR	5284	POU2F1	5451
NLGN4		UBE1C	9039	CKLFSF4	146223	C5	727
PCDHA5		TM4SF4	7104	AF3P21		DDIT3	1649
MGC2803	79002	METAP2	10988	FLJ35107	348825	MDM2	4193
PRSS15	9361	SATB2	23314	ING3	54556	CASP5	838
CHDC1		GNAS	2778	GTF2A2	2958	TRAF2	7186
DPP4	1803	IPO11	51194	SLC27A4	10999	STK3	6788
DDHD1	80821	C5orf3	10827	KBTBD7	84078	SLC1A3	6507
CCNJ	54619	FLJ10415	55139	C10orf118	55088	LUM	4060
ZNF507	22847	GPR17	2840	TAF12	6883	EPLIN	51474
FALZ	2186	FLOT2	2319	ANXA5	308	OGT	8473
WDR22	8816	PFN2	5217	AGPAT1	10554	RIC3	79608
LILRB2	10288	DHX9	1660	SSB1	80176	GAGEC1	9506
SIAT7F	30815	ENC1	8507	KIAA2018	205717	NCOA7	135112
MGC8407	79012	LOC134145	134145	PAPOLA	10914	SDC1	6382
CDK10	8558	LRP4	4038	RAB24	53917	TRIM2	23321
NUP214	8021	B3GAT3	26229	QKI	9444	AP4M1	9179
ITSN1	6453	NRXN1	9378	DKFZp586C1924	84233	JM5	
FLI1	2313	FLJ13855	65264	RBJ	51277	PSMC6	5706
LARGE	9215	SPON1	10418	CARD4	10392	EML1	2009
ACTN4	81	KIAA1333	55632	MGC29463	202052	FLJ14001	79730
ADH6	130	KLF8	11279	LOC51161		H2AV	
ZCCHC3	85364	RGS19IP1	10755	NDUFS1	4719	RNF38	152006
KIAA0174	9798	TPPP	11076	PTD004	29789	WNT2	7472
T1560	387335	CENPF	1063	PELI1	57162	HCMOGT-1	92521

Gene Sym- bol	Entrez Gene ID	Gene Sym- bol	Entrez Gene ID	Gene Sym- bol	Entrez Gene ID	Gene Sym- bol	Entrez Gene ID
SLC1A1	6505	PTK2B	2185	SLC12A2	6558	SLAC2-B	23086
RNF144	9781	RGS4	5999	MGC2827		FLJ39237	375607
SIN3A	25942	DMD	1756	PTGS2	5743	IL18RAP	8807
HERC3	8916	CALM2	805	SDC2	6383	PVRL3	25945
ADCY2	108	TOCA1		FLJ14803	84928	NUDT11	55190
ROBO2	6092	CREM	1390	CORO2A	7464	NAKAP95	
MGC15730	84966	ARL6IP6	151188	C20orf39	79953	RBBP6	5930
PORIMIN	114908	DPM3	54344	LOC54499	54499	SLA2	84174
NEDD4L	23327	RNF110		SYT9	143425	ACP33	
KLF7	8609	RAC1	5879	C6orf55	51534	MTM1	4534
COX6B1	1340	FLJ12688	79613	SUPT4H1	6827	MYST2	11143
HYOU1	10525	GPM6A	2823	SNCA	6622	DEC1	50514
FLJ20244	55621	ECHS1	1892	ITSN2	50618	DNCL12	1783
MYCBP2	23077	SNN	8303	YTHDC2	64848	MGC13096	84306
SOCS7	30837	PTPN13	5783	ZCCHC9	84240	BRD9	65980
ATP1B2	482	ATRNL1	8455	CCNL2	81669	B4GALT4	8702
GLTP	51228	APLP1	333	SERPINA1	5265	RGS6	9628
NEK3	4752	NALP2	55655	ABCE1	6059	FLJ23018	
KIN	22944	APOD	347	EPM2A	7957	KIAA0376	23384
TCF7L2	6934	XTP2	23215	PUM2	23369	ADRBK2	157
GTF2H2	2966	FLJ20580	54987	KIAA1229	57489	FLJ21174	
TXN	7295	SEMA5A	9037	RBM5	10181	PIP5K1B	8395
ERCC1	2067	LOC283755	283755	RNF157	114804	NS3TP2	65983
PROM1	8842	GJB1	2705	PDE4D	5144	MRPS35	60488
PPP6C	5537	RNASE1	6035	FLJ10241	55101	PCNT1	79902
TERT	7015	C13orf10	64062	GRCA	27239	PRDM4	11108
CCL25	6370	ANXA3	306	FLJ23790	157769	CREB3	10488
TXNDC7	10130	ELOVL2	54898	PSG9	5678	C6orf69	222658
E2F4	1874	LNK	10019	HOXB5	3215	AKAP6	9472
DAPK1	1612	ATRXL	546	EGLN2	112398	RB1CC1	9821
PDE4D	5144	ELF1	1997	PTPRR	5801	COCH	1690
RGS2	5997	CYP11B1	1584	POU6F1	5463	JPHL1	
THBD	7056	SMN2	6607	RBP1	5947	SURF6	6838
LIAS	11019	PPP2R5B	5526	NCOA3	8202	HT014	57095
BID	637	ADRBK2	157	LOC151194	151194	ELAVL2	1993
KIAA0669	9819	IMPACT	55364	SND1	27044	LOC401152	401152
ORC5L	5001	HGF	3082	AADAT	51166	ZNF187	7741
RRAS2	22800	CCL14	6358	C6orf33	85315	MCM2	4171
FLJ38736	256764	CASP4	837	SERPINA4	5267	GPR146	115330
KCNK13	56659	GFRA2	2675	RAD1	5810	AFM	173
LOC113444	113444	CD151	977	MAN2A1	4124	MRPL3	11222
F2RL1	2150	GRK6	2870	RANBP2	5903	USP16	10600
BCAR3	8412	ATP5H	10476	DTYMK	1841	DMXL1	1657
C40		CPM	1368	TLX1	3195	PLCL1	5334
MAPKAPK5	8550	FRBZ1	360023	C8A	731	RAD9A	5883
YAF2	10138	LYSAL1		ENG	2022	HOXA10	3206
KAI1	3732	WDFY3	23001	NOTCH4	4855	PPAT	5471
PDCD6IP	10015	IL20RA	53832	TTK	7272	GJB5	2709
ITGA3	3675	MGC47869	144608	CD2AP	23607	MRPL28	10573
SATB1	6304	FDX1	2230	PRKCH	5583	TAF5	6877

Gene Symbol	Entrez Gene ID	Gene Symbol	Entrez Gene ID	Gene Symbol	Entrez Gene ID	Gene Symbol	Entrez Gene ID
EGFR	1956	PTPRG	5793	ERCC3	2071	USP47	55031
DNAJB4	11080	MME	4311	CCPG1	9236	TRIM56	81844
PLCG2	5336	CYP2B6	1555	MCM2	4171	CSE1L	1434
ITGA2	3673	CCNB2	9133	RIMS3	9783	DUSP5	1847
SRP72	6731	BAD	572	CES1	1066	ABCC1	4363
TLR1	7096	MAPK6	5597	JAM3	83700	MAGEF1	64110
CXCL13	10563	GDF15	9518	ARHGAP17	55114	GDF10	2662
ACVR1	90	ITGA6	3655	SEN7	57337	PRPSAP2	5636
ZNF22	7570	MAP2K3	5606	XPC	7508	PTMA	5757
GRIA3	2892	C8B	732	TGOLN2	10618	KIAA1102	22998
FLJ13710	79875	IL6R	3570	AKR1C4	1109	PPP1R15B	84919
CLCA1	1179	TP53I11	9537	RS1	6247	HPGD	3248
ZNF318	24149	IL2RA	3559	STK35	140901	MAP3K7IP1	10454
COLEC12	81035	FGFR2	2263	F13A1	2162	ACTL6B	51412
HAMP	57817	RC3		SKP1A	6500	MAT2B	27430
DKFZP586J0619	26173	LIMK2	3985	NFKB1	4790	COX8A	1351
FLJ13397		YT521	91746	CYC1	1537	CDC42BPA	8476
SECP43	54952	ANKRD5	63926	HNRPU	3192	ASXL1	171023
MRE11A	4361	CBLB	868	ID3	3399	GPT2	84706
MGC39820		PCDH10	57575	IRF5	3663	ASB3	51130
CHD1L	9557	LACE1	246269	IL17R	23765	NALP1	22861
TTLL3	26140	CA12	771	EEF1A1	1915	SLC25A15	10166
CHUK	1147	ATP6V1G1	9550	STIP1	10963	SLC35E3	55508
ALEX1		KIAA1219	57148	PFC	5199	CLDN10	9071
RAB32	10981	RIT1	6016	PRKCD	5580	PDCL	5082
KIAA1344	57544	TMEM16C	63982	IRF2	3660	PPP2R5A	5525
UBE2I	7329	GTF2E1	2960	CD7	924	KIAA1524	57650
SHREW1	55966	KIAA0657	23363	IRAK2	3656	CMRF-35H	11314
LAP3	51056	FLJ20716	55026	BLZF1	8548	PPP1R1B	84152
PPP3CC	5533	FIGN	55137	MAP3K8	1326	KIF1A	547
EBNA1BP2	10969	COX10	1352	PSG3	5671	TOP2A	7153
PPT1	5538	F11R	50848	SLC16A4	9122	MAD2L1	4085
FLJ32942	121355	HSD17B2	3294	NHS	4810	MYF5	4617
MGC2452		PPP2R2A	5520	FLJ32731	138050	PTPN6	5777
F-LANa		C14orf94	54930	KIAA1853	84530	WRN	7486
FLJ21439	80208	WDR22	8816	HIBCH	26275	RGS14	10636
UBADC1	10422	FLJ10458	54475	AGPAT4	56895	CASP3	836
CBR1	873	PAK7	57144	MIZF	25988	DAP3	7818
SNX27	81609	INSIG2	51141	AQP3	360	BAG4	9530
CADPS	8618	CIQR1	22918	ARTN	9048	CR2	1380
C20orf104		RICS	9743	FCER2	2208	CXCL3	2921
RAB11A	8766	BCR	613	SOX7	83595	PPT2	9374
ENTPD8		STAF42	117143	FLJ13912	64785	CHEK1	1111
ANXA4	307	SMARCA2	6595	DNCI2	1781	RBM10	8241
KIAA0459	23252	SASH1	23328	SNAPC2	6618	TA-LRRP	23507
SPTLC1	10558	DDX3X	1654	SP192	60313	RICH1	
NPTX2	4885	SSX2IP	117178	MEP50	79084	KIFAP3	22920
ARF5	381	RTTN	25914	EPOR	2057	KIAA0173	
LOC90806	90806	OPHN1	4983	USP32	84669	C6orf152	167691
SELE	6401	WNT4	54361	KIAA1336		ZDHHC18	84243

Gene Symbol	Entrez Gene ID	Gene Symbol	Entrez Gene ID	Gene Symbol	Entrez Gene ID	Gene Symbol	Entrez Gene ID
MS4A7	58475	APXL2	134549	IFNGR2	3460	HOXA4	3201
BAG4	9530	ACVR2	92	CGI-79		ELF3	1999
SLC26A2	1836	KIAA1946	165215	PHKA1	5255	IFRD1	3475
DSCAM	1826	C14orf118	55668	DKFZp686A17109		HOXB6	3216
LOH3CR2A	29931	NARG2	79664	LOC130940	130940	NCF1	4687
LUC7L2	51631	KIAA1449		TAF5	6877	LAF4	3899
C2	717	ALOX15B	247	HDC	3067	ABL1	25
BCS1L	617	MESPI	55897	TRPC5	7224	CCL3	6348
DHX57	90957	KIAA1600	57700	MGC27034		IRAK1	3654
TIEG2		TCL6	27004	BAAT	570	STAT1	6772
TM7SF3	51768	COL21A1	81578	dJ383J4.3	91687	ZNF42	7593
LOC284296	284296	UBQLN2	29978	ARID4B	51742	FGF9	2254
MGC39325	90362	FLJ22002		COG6	57511	AQP2	359
CML66	84955	TCF7	6932	MGC61571	152100	GRK5	2869
ANC_2H01		CAPZB	832	FLJ25477	219287	FLJ32810	143872
NJMU-R1	64149	RPL23A	6147	SYT13	57586	FAD104	
COQ6	51004	ART3	419	ARPC1B	10095	CBL	867
EIF2AK3	9451	ETS1	2113	COG8	84342	IL1F5	26525
KIAA2002	79834	ZFYVE26	23503	SLCO3A1	28232	FADS2	9415
SEC14L1	6397	APOA1BP	128240	NMNAT2	23057	FLJ20573	
CDYL	9425	MAC30	27346	SLC7A9	11136	RP42	54165
TM4SF2	7102	TRIP12	9320	TBC1D7	51256	CAPNS2	84290
MGC3101	79007	RAD23B	5887	ZNF490	57474	ITLN1	55600
LOC223082		SIK2		BAG1	573	KIAA1078	23271
DOCK11	139818	SPOCK2	9806	ENAH	55740	DSTN	11034
TM9SF2	9375	FHOD3	80206	GFR		P11	8909
RRS1	23212	CDS1	1040	LOC339263	339263	EFHD1	80303
C2orf11	130132	FLJ20035	55601	C1orf21	81563	BAALC	79870
HSPE1	3336	STARD10	10809	KIAA1906	114795	ARAF	369
CD81	975	KLHL7	55975	WDR10	55764	FLJ12476	64799
ARHGEF10	9639	TGFA	7039	RFC1	5981	NOPE	57722
DHRS6	56898	GMFB	2764	PIK3R3	8503	FECH	2235
MYO1B	4430	C20orf55	83541	CORO1B	57175	HBXIP	10542
GNB5	10681	PHF14	9678	C7orf28B	221960	WDFY2	115825
SPCS2	9789	CAPN3	825	ZCCHC14	23174	PPM2C	54704
KIAA1171	57465	C1QBP	708	MYLK	4638	YAP	55249
CAMKK2	10645	USP34	9736	FLJ46230	400679	KIAA1374	57560
KIF22	3835	SLC16A2	6567	GNA12	2768	FLJ10826	55239
SMAD5	4090	PAX8	7849	COL6A3	1293	CRSP2	9282
TOMM34	10953	LTB4R2	56413	TXN	7295	KIAA1126	57210
MNDA	4332	CDC23	8697	KIAA0251	23042	DKFZp761C121	
AP1S2	8905	COL11A1	1301	CTSL	1514	CREB5	9586
P11	8909	MAP4	4134	OCRL	4952	ADSSL1	122622
BTN1A1	696	DAB2	1601	CDCA7	83879	SLC26A2	1836
CASP9	842	PDE4B	5142	MAP4K4	9448	FLJ12903	64766
CCL7	6354	IL24	11009	ZCCHC2	54877	SLC39A14	23516
HSD11B1	3290	TYK2	7297	RAC2	5880	FLJ38964	161253
TGFBRAPI	9392	FER	2241	ZNF43	7594	GPC5	2262
BMPR1B	658	MAP3K7IP1	10454	GNAI1	2770	STK38	11329
TNFSF14	8740	HAT1	8520	ITGAE	3682	GPC4	2239

Gene Sym- bol	Entrez Gene ID	Gene Sym- bol	Entrez Gene ID	Gene Sym- bol	Entrez Gene ID	Gene Sym- bol	Entrez Gene ID
EIF5	1983	ETAA16	54465	GYG2	8908	SNX17	9784
MGC11242	79170	SYCP2	10388	SEC24C	9632	SENP2	59343
FGA	2243	MACF1	23499	MBD5	55777	PRPF4	9128
TYRP1	7306	KIFC2	90990	NUP155	9631	SEC14L2	23541
APCS	325	SMARCA4	6597	TA-WDRP		SF3A1	10291
PLAGL2	5326	CD44	960	CD164	8763	IQGAP1	8826
PRDX3	10935	ZBTB24	9841	ZNF512	84450	ZNF500	26048
BNIP1	662	SNTB1	6641	IFNAR1	3454	LOC114926	114926
ATP6V1H	51606	SH3BGRL2	83699	PLEKHC1	10979	GNAO1	2775
KAL1	3730	PCAF	8850	PSD	5662	FLJ30834	132332
CNTN2	6900	GPR4	2828	MKI67	4288	OLFM1	10439
RPA3	6119	MAOA	4128	CYP4V2	285440	CALR	811
HIF1A	3091	VAPA	9218	RHOA	387	NDUFB9	4715
TOR1A	1861	ACSL4	2182	CD84	8832	RUSC2	9853
CSF2	1437	PTPNS1	140885	HMGCR	3156	SGK	6446
GZMA	3001	CACNB3	784	SNX24	28966	MGC15937	92292
TRIP	10293	ATR	545	CSE1L	1434	SRPRB	58477
RAD51	5888	ISG20	3669	LOC253012	253012	FMO1	2326
IFNGR1	3459	BLVRB	645	BRE	9577	FLJ31300	131669
SIAT1	6480	TRIM26	7726	TLN1	7094	BTK	695
DF	1675	EDN2	1907	AP3D1	8943	EHMT1	79813
TUBB	203068	C3	718	TYROBP	7305	FGG	2266
MUSK	4593	TGFA	7039	FOXG1B	2290	PEPD	5184
CSNK1A1	1452	HCK	3055	CD72	971	CCNE1	898
PIK3AP1	118788	MMP14	4323	IL7R	3575	HOXB2	3212
KCNJ1	3758	PBEF1	10135	ARF6	382	RARA	5914
WWP2	11060	HIPK2	28996	GFRA1	2674	EGR3	1960
PDCD7	10081	PRKACB	5567	YY1	7528	TNC	3371
TARDBP	23435	PPP4C	5531	SKIV2L	6499	SLC3A2	6520
ZIC4	84107	FLJ31818	154743	SYK	6850	CD226	10666
C40		GPP34R		IBRDC2	255488	TCF1	6927
ATP6AP2	10159	KIAA0399		APPL	26060	SPAG4L	140732
G3BP	10146	EDG6	8698	FGIF	54851	CDKL5	6792
COX7A2	1347	FLJ35728	164127	PLB1	151056	C6orf37	
GPR116	221395	C14orf150	112840	TBXAS1	6916	LOC143458	143458
PIP3AP	54545	KIAA1764	85444	TED		AARSL	57505
CUL1	8454	MYO1F	4542	RAB35	11021	NOLA2	55651
IARS	3376	IL17R	23765	SENP7	57337	C6orf75	60487
NOTCH2	4853	STCH	6782	KIAA1333	55632	PTPRB	5787
CREBL2	1389	C10orf45	83641	MRS2L	57380	KIAA1357	
VRK2	7444	PGAM1	5223	CLIC4	25932	ATP11C	286410
RAP1GDS1	5910	SAE1	10055	ACY1L2	135293	SUMF2	25870
NEIL2	252969	PCLO	27445	FGF18	8817	GCM1	8521
C15orf15	51187	FLJ10853	55246	PTOV1	53635	RPS6KB1	6198
PARG1	9411	BCCIP	56647	PDAP1	11333	PTPRN2	5799
RABGEF1	27342	COG4	25839	GNB1	2782	SNTB2	6645
ANKRD15	23189	MIS12	79003	RPL22	6146	RRM1	6240
PCM1	5108	KIAA0974	317662	ZNF148	7707	GPR86	
DNAJC5	80331	IL16	3603	DAZAP2	9802		
SIAT7E	81849	SCRG1	11341	AAAS	8086		

Gene Symbol	Entrez Gene ID	Gene Symbol	Entrez Gene ID	Gene Symbol	Entrez Gene ID	Gene Symbol	Entrez Gene ID
VPS13A	23230	PMAIP1	5366	PPIL6	285755	KIAA0992	23022
NHLH1	4807	FGF13	2258	TRIM47	91107	TBC1D13	54662
TNFRSF7	939	RPA1	6117	NUDT13	25961	HECA	51696
DVL3	1857	MAP2K6	5608	DSC2	1824	SKP1A	6500
FCGRT	2217	TNFSF13	8741	FKBP1A	2280	FLJ33996	
MX1	4599	CHST10	9486	IL15RA	3601	DDOST	1650
ADD2	119	HCP5	10866	CRABP2	1382	FLJ21657	64417
TLR2	7097	KPNA3	3839	ABLIM1	3983	NIP30	80011
EGR1	1958	DCLRE1C	64421	MAP1A	4130	CX3CL1	6376
SLC39A7	7922	KIAA1600	57700	CASP7	840	SLC37A4	2542
LOC149603	149603	CGI-141	51026	PRKG2	5593	PSMD9	5715
RXRG	6258	CPSF5	11051	SDCCAG8	10806	RNF128	79589
ITGB4	3691	SLCO4C1	353189	MYD88	4615	FLJ41410	
SPAM1	6677	FOXA1	3169	GTF2A1	2957	ATP1B3	483
ARRDC4	91947	C20orf104		RFC4	5984	NNT	23530
CENTA2	55803	PKIB	5570	LITAF	9516	CHD5	26038
MGAT4A	11320	FLJ14564		SMAD3	4088	B3GNT6	11041
ICAM3	3385	CAMSAP1	157922	CD3G	917	MAP2K1	5604
SNIP1	79753	FLJ10201		CCL4	6351	MAFF	23764
SLIT2	9353	FLJ13220	60558	PIN1	5300	CENTG1	116986
CROT	54677	FLJ31818	154743	FIGF	2277	MGC3207	84245
ARL4A	10124	XBP1	7494	SLMAP	7871	THBS1	7057
TNIP2	79155	DNAJC5	80331	LL5beta		FETUB	26998
ANXA11	311	EBF	1879	KIF9	64147	C1orf24	116496
TREX2	11219	CGI-100		LST1	7940	OR2A7	401427
SDCBP	6386	IFIT5	24138	GABRR1	2569	ID1	3397
C9orf40	55071	IMPA1	3612	MGC33382		GATA5	140628
LAPTM4B	55353	PTEN	5728	GEMIN6	79833	RAP2A	5911
CNN2	1265	ARS2	51593	Spir-1		CSF1R	1436
CIRH1A	84916	SCYE1	9255	KIAA1340	57542	ANXA2	302
C10orf7	8872	CLASP1	23332	AKAP11	11215	SMARCA2	6595
FLJ20559		PDZGEF1		LOC115294	115294	TBCC	6903
ADAMTS1	9510	PIF1		FLJ11273	54664	LCN2	3934
TIE		EIF2B1	1967	FLJ22557		CHRM4	1132
SS18L1	26039	MGC22014	200424	PITPNC1	26207	NMI	9111
FLJ31340	222223	PSG6	5675	CD47	961	CAT	847
DDX28	55794	GSPT1	2935	KIAA1706	80820	CALM2	805
PRKCH	5583	FLJ10826	55239	AP1S2	8905	BATF	10538
KIAA0513	9764	ZNF291	49855	RAP1B	5908	SORBS1	10580
ARMCX6	54470	CYCS	54205	WDR47	22911	CREBL1	1388
SEC22L3	9117	TJP1	7082	ILK	3611	LTA	4049
FKBP5	2289	RPL28	6158	KIAA1191	57179	DGKE	8526
LILRB1	10859	KIAA1949	170954	SKD3	81570	PLAG1	5324
AHR	196	PRKRIR	5612	NTRK2	4915	NIF3L1BP1	80145
MRPS5	64969	SLC5A6	8884	KIAA0725		DZIP1	22873
LOC221810		NIPSNAP3A	25934	FLNB	2317	TBX3	6926
MSH3	4437	BIRC1	4671	FAM3C	10447	PTCRA	171558
PLS3	5358	ASF1A	25842	STAT6	6778		
IL13RA2	3598	BCAP31	10134	FLJ10081	55683		
C5	727	BCL6	604	ACMSD	130013		

Gene Symbol	Entrez Gene ID	Gene Symbol	Entrez Gene ID	Gene Symbol	Entrez Gene ID	Gene Symbol	Entrez Gene ID
DKFZp547B1713	128061	FLJ20156	54839	FLJ33215		TCF12	6938
SCLY	51540	ARRDC3	57561	USP36	57602	BIRC3	330
NCOA2	10499	B3GNT5	84002	MGC13102	84283	BIRC2	329
CLTB	1212	TAPBP	6892	PTPRH	5794	ITGAM	3684
ALS2CR8	79800	P5326		TTL	150465	REL	5966
ACTR1B	10120	SEMA6A	57556	KIAA1582		EPHA4	2043
NOTCH3	4854	ALCAM	214	AGXT2	64902	VCAM1	7412
TCERG1	10915	DKFZp547C195	257160	GPR1	2825	MFAP1	4236
CHPT1	56994	MLLT3	4300	PROX1	5629	TXNIP	10628
LOC51057	51057	GABRA2	2555	HBXAP	51773	FLJ35954	166968
STMN1	3925	NARG1L	79612	GUSB	2990	ITGB4BP	3692
KIAA0350	23274	CPNE1	8904	SSA2	6738	SMARCD2	6603
STYK1	55359	APTX	54840	FLJ21308		RSNL2	79745
CNTNAP2	26047	UFD1L	7353	GFPT1	2673	FLJ20152	54463
SOSTDC1	25928	ESRRG	2104	LEPRE1	64175	LOC93082	93082
FLJ30990	150737	CNP	1267	SLC26A11	284129	KIAA0882	23158
IFITM2	10581	ACVR2	92	FLJ10876		ATP13A	
EP300	2033	USP14	9097	UBE2N	7334	FOXD1	2297
FBXL20	84961	CLIPR-59	25999	TARBP2	6895	PRDX3	10935
RNF44	22838	SLC25A6	293	ADD3	120	TERF2IP	54386
C6orf35	55836	ARFIP1	27236	RRAGC	64121	GRHPR	9380
RAB9P40	10244	C18orf51	125704	ABHD8	79575	SLC4A1	6521
CSNK2B	1460	YIFI	10897	MGC34646	157807	PLA1A	51365
DAAM2	23500	TACC1	6867	TOB2	10766	ZSWIM3	140831
FABP4	2167	ZNF3	7551	TIMP1	7076	SUPV3L1	6832
CDC14B	8555	CLU	1191	LZTR1	8216	BRUNOL6	60677
EFNA1	1942	EMP1	2012	HR	55806	STX5A	6811
DNMT2	1787	TNPO1	3842	C21orf66	94104	MTRF1L	54516
C20orf108	116151	LMO7	4008	FLJ10849		ANXA7	310
SMYD4	114826	TLN1	7094	C10orf48	283078	ZNF236	7776
CDC2	983	LDB2	9079	PIP5K2C	79837	PER1	5187
TAF12	6883	AQP11	282679	RAPGEF4	11069	NR4A3	8013
SLC13A3	64849	ZNF347	84671	HIPK3	10114	GL009	
MAP2K4	6416	DHFR	1719	PBX1	5087	C21orf59	56683
MLLT2	4299	ITGAX	3687	SPTA1	6708	CPD	1362
CBL	867	FBLN1	2192	SLC30A7	148867	RFXAP	5994
TBRG4	9238	MAPK14	1432	CDH6	1004	RPL10A	4736
DHCR7	1717	CD80	941	LR8	28959	NIFUN	23479
RB1	5925	CCL19	6363	PRKCQ	5588	HCLS1	3059
ITGA5	3678	SMAD2	4087	CCNH	902	SBF2	81846
IGFBP3	3486	IL1RAP	3556	FLJ36812	255252	CDO1	1036
RELB	5971	BCL10	8915	FGB	2244	KIAA0157	23172
TIA1	7072	NGFB	4803	NSMAF	8439	NUDT1	4521
LOC90167	90167	CXCL10	3627	ALOX5	240	TTR	7276
DIRAS2	54769	PAX3	5077	HSPA1A	3303	TYK2	7297
KIAA1076	23067	BCL7B	9275	COX15	1355	NEO1	4756
PRDM1	639	SLC35B4	84912	PIR	8544	ZNF236	7776
PVRL3	25945	NEUROD2	4761	ID2	3398	DAB2IP	153090
PPM1L	151742	B7	10233	HOXA1	3198	CYB5	1528
ZNF25	219749	CYBA	1535	TNFSF13	8741	PPBP	5473

Gene Symbol	Entrez Gene ID	Gene Symbol	Entrez Gene ID	Gene Symbol	Entrez Gene ID	Gene Symbol	Entrez Gene ID
ARPC3	10094	ZDHHC3	51304	CDC25B	994	FLJ10747	55219
POU2F1	5451	FGA	2243	SEDL	6399	MCAM	4162
GNLY	10578	LRP2	4036	SEN54L	283989		
EDG4	9170	TLK1	9874	KLF1	10661		
MYOG	4656	MEN1	4221	SERPINE1	5054		
IL11	3589	RAB36	9609	PHF8	23133		
CFH	3075	TLR3	7098	RPS10	6204		
RING1	6015	CD36	948	ITIH2	3698		
P2RXL1	9127	PCSK6	5046	MAP3K5	4217		
PRKCI	5584	KITLG	4254	FLJ20032	54790		
MYH10	4628	PDZK2	79849	LAMR1	3921		
MTP	4547	RAD17	5884	USP47	55031		
B3GNT1	10678	SSA1		KIDINS220	57498		
FLJ33215		ACPP	55	MSR1	4481		
WARS2	10352	EDG3		ANP32E	81611		
NUP43	348995	TP73L	8626	ATP8B3	148229		
GALNT3	2591	SEC10L1	10640	C7orf26	79034		
RAB25	57111	RUNX1	861	IL1RAP	3556		
RCP		GPR123	84435	PLAC3			
GZMH	2999	ZNF75	7626	IL10RA	3587		
PRKAR1A	5573	PDE4C	5143	AGTR2	186		
SMN2	6607	DBR1	51163	G22P1	2547		
DKFZP564O1664	81556	LOC51244		DDR1	780		
KIAA1586	57691	HHL		MAPKAPK2	9261		
DKFZP434E2135		BMX	660	GALNT10	55568		
TXNRD1	7296	SLC19A2	10560	MGC3048			
TSC	54997	AMPH	273	TTC9	23508		
SGNE1	6447	NAV1	89796	ANKRD24	170961		
RGS5	8490	NFE2L2	4780	ACE	1636		
ARHGEF7	8874	SLC4A3	6508	POLE	5426		
PCNP	57092	TLP19	51060	RAB40B	10966		
CPEB2	132864	HSPC056		GMPS	8833		
FLJ14525	84886	RUFY2	55680	CUL5	8065		
RAB31	11031	AMSH-LP	57559	PPP2R5E	5529		
KCNK7	10089	C6orf152	167691	GAB1	2549		
KIAA1221		ATP6V1E1	529	NOLC1	9221		
TDE2	57515	PPP2R4	5524	DPP4	1803		
ARIH2	10425	GLS	2744	MLH1	4292		
CALB2	794	KIAA1041		CR2	1380		
LOC113444	113444	STX12	23673	CD86	942		
DSCR1L1	10231	MS4A8B	83661	PTPN12	5782		
RPS6KA1	6195	ZBTB1	22890	DSG2	1829		
SLC25A22	79751	FUSIP1	10772	OGG1	4968		
FMNL3	91010	FLJ21924	79832	COX5A	9377		
WDR9	54014	CLASP2	23122	NOS1	4842		
C10orf4	118924	SLC39A6	25800	CHAF1A	10036		
MCCC2	64087	SMCY	8284	ZNF354A	6940		
BCL2L2	599	MAP1B	4131	SCAP2	8935		
FBLP-1	54751	FLJ12895	65982	SPTAN1	6709		
EP400	57634	CHURC1	91612	NFYA	4800		

Das erfindungsgemäße Verfahren ist jedoch nicht auf diese Gene beschränkt, sondern kann auf alle Gene humanen und tierischen Ursprungs angewandt werden.

Beispiele für zellbasierte Tests sind Messungen der Vitalität der Zellen, der metabolischen Aktivität von Zellen, der Bindung von Liganden an Rezeptoren, der Aktivität von zellulären Enzymen, der Aktivität von Genen über Reporter-vermittelte Promotorstudien oder der Bildung von reaktiven Sauerstoffradikalen. Dabei können solche zellulären Assays das Ziel verfolgen die Wirksamkeit oder Wirkungsweise Substanzen zu testen. Solche getesteten Substanzen sind bevorzugterweise pharmakologisch aktive Substanzen. Die getesteten Substanzen sind bevorzugterweise Liganden für zelluläre Rezeptoren. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform wird eine Vielzahl solcher Substanzen getestet werden. Die zellbasierten Tests können dabei in Form eines Hochdurchsatzscreening (HTS) durchgeführt werden, welches das Screening einer Vielzahl von Substanzen in kurzer Zeit erlaubt.

Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren ist in einer Ausführungsform vorgesehen, dass die Zellen vor dem Einfrieren der Zellen behandelt werden, um sie in eine rekombinante Zelle zu überführen. Dabei wird bevorzugterweise die Nukleinsäure und bevorzugterweise die heterologe Nukleinsäure und noch bevorzugterweise die heterologe Nukleinsäure, die für ein heterologes Molekül kodiert, in die Zelle durch Transfektion, Transduktion, Infektion eingebracht. Derartige Verfahren sind den Fachleuten auf dem Gebiet bekannt und, unter anderem beschrieben in (Graham F.L. and van der Eb A.J., *Virology* 52(2):456-467, 1973; Pagano J.S. et al., *J. Virol.* 1(5):891-897, 1967; Felgner P.L. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84(21):7413-7417, 1987; Hamer D.H. and Leder P., *Nature* 281(5726):35-40, 1979; Neumann E. et al. *EMBO J.* 1(7):841-845, 1982).

In einer weiterhin bevorzugten Ausführungsform wird das zelluläre Molekül, d. h. das Gen oder die Gene in den Zellen bzw. das/die Transkriptions- oder Translationsprodukt(e) davon, allgemein hierin auch als das Zielmolekül bezeichnet, bevorzugterweise mit Hilfe des heterologen Moleküls in seinem Expressionsverhalten oder seiner Aktivität modifiziert, wobei die Modifikation des Expressionsverhaltens bevorzugterweise die Inhibierung, Knock down oder Knock out der Zelle darstellt. Dies gilt bevorzugterweise dann, wenn es sich bei den Genen um nicht-essentielle Gene handelt, d.h. Gene, die verschieden sind von den essentiellen Genen. Es ist auch im Rahmen der vorliegenden Erfindung, dass die Inhibierung bzw. Knock down oder Knock out der Gene, die bevorzugterweise zelluläre Moleküle im Sinne der vorliegenden Erfindung sind,

erst nach dem Auftauen der Zellen erfolgt. Maßnahmen hierzu sind den Fachleuten auf dem Gebiet bekannt und sind im Detail hierin weiter beschrieben.

Maßnahmen, um die entsprechenden Zellen in ein Einfriermedium, Kulturmedium oder Zellkulturgefäß zu überführen, sind den Fachleuten auf dem Gebiet ebenfalls bekannt und umfassen, insbesondere, Aspirieren und Pipetieren.

Gemäß der vorliegenden Erfindung sind die Zellen, die Gegenstand des erfindungsgemäßen Verfahrens zum Einfrieren und Lagern von Zellen sind, rekombinante Zellen. Dabei sind rekombinante Zellen bevorzugterweise solche, bei denen eine Änderung ihrer genetischen Ausstattung gegenüber dem Wildtyp der korrespondierenden, nicht-rekombinanten Zelle vorliegt. Bevorzugterweise liegt eine derartige geänderte genetische Ausstattung dann vor, wenn ein genetisches Element in die Zelle eingeführt ist oder daraus entfernt ist. Es ist auch im Rahmen der vorliegenden Erfindung, dass eine rekombinante Zelle eine solche ist, bei der die Relativposition von einem oder mehreren genetischen Elementen oder Nukleinsäureabschnitten relativ zu anderen genetischen Elementen bzw. Nukleinsäureabschnitten gegenüber der im Wildtyp vorliegenden Anordnung verändert ist. Schließlich ist eine rekombinante Zelle im Rahmen einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung auch eine solche, bei der das zeitliche Expressionsmuster des oder der genetischen Elemente, insbesondere eines oder mehrerer der Gene der Zelle, gegenüber oder verglichen mit der zeitlichen Reihenfolge der genetischen Expression derselben in einer Zelle vom Wildtyp verändert ist.

Eine bevorzugte Zelle, die gemäß dem erfindungsgemäßen Verfahren behandelt wird, ist eine rekombinante Zelle, die eine heterologe Nukleinsäure enthält.

Wie hierin bevorzugterweise verwendet ist eine heterologe Nukleinsäure ein Nukleinsäuremolekül, das in dieser Form in einer korrespondierenden Zelle vom Wildtyp nicht vorkommt. Dabei umfasst der Begriff der heterologen Nukleinsäure auch solche Nukleinsäuren, die zeitlich oder örtlich geändert exprimiert werden, wobei sich die Änderung auf den Wildtyp der in Frage stehenden Zelle bezieht. Bevorzugterweise enthält die heterologe Nukleinsäure weitere Elemente, die insbesondere für die Expression der heterologen Nukleinsäure in der Zelle hilfreich sind. Derartige Elemente sind den Fachleuten bekannt und umfassen, unter anderen, Promotoren, Enhancer und Terminatoren. Die heterologe Nukleinsäure kann darüber hinaus auch Bestandteil eines größeren Nukleinsäuremoleküls sein. Ein derartiges größeres Nukleinsäuremolekül ist be-

vorzugterweise ein Vektor und bevorzugterweise ein Expressionsvektor. Das besagte größere Nukleinsäuremolekül kann jedoch auch ein artifizielles humanes oder Säugetier-Chromosom sein, ein Yeast artificial chromosome (YAC), ein bakterielles artifizielles Chromosom (BAK) der Zelle sein.

Besonders bevorzugte Vektoren sind dabei Plasmide ebenso wie virale Vektoren. Besonders bevorzugte Vektoren auf der Grundlage von Viren sind rekombinante Replikations-defiziente Adenoviren, Adeno-assoziierte Viren, Baculoviren, Sendaviren, Herpes simplex Typ 1 Viren, Lentiviren und Retroviren.

Es ist im Rahmen der vorliegenden Erfindung, dass das von der heterologen Nukleinsäure codierte heterologe Molekül mit einem oder mehreren zellulären Molekülen in Wechselwirkung tritt. Dabei ist es besonders bevorzugt, wenn die Wechselwirkung derart ist, dass das heterologe Molekül die Wirkung oder weitere Wechselwirkungen des zellulären Moleküls inhibiert bzw. einen entsprechenden Knock-Down oder Knock-Out bedingt oder zur Folge hat. Die zellulären Moleküle, mit denen das heterologe Molekül in Wechselwirkung tritt bzw. dessen Funktion oder Wechselwirkungen modifiziert, bevorzugterweise inhibiert werden, sind bevorzugterweise jene, die in Tabelle 1 hierin angegeben sind. Es ist jedoch im Rahmen der vorliegenden Erfindung, dass die zellulären Moleküle nicht auf die in Tabelle 1 angegebenen Moleküle beschränkt ist.

Eine besonders bevorzugte heterologe Nukleinsäure ist eine heterologe Nukleinsäure oder heterologes Molekül, dass aus der Gruppe ausgewählt ist, die Antisense-Moleküle, RNAi-vermittelnde Moleküle, Aptamere, Anticaline, Peptid-Aptamere und Antikörper umfasst.

Antikörper, wie hierin verwendet, sind bevorzugterweise monoklonale Antikörper, die gemäß dem Protokoll von Cäsar und Milstein und Weiterentwicklungen davon hergestellt werden können. Antikörper sind dabei auch Antikörperfragmente oder -derivate, wie bspw. Fab-Fragmente, Fc-Fragmente aber auch einzelsträngige Antikörper, solange diese generell in der Lage sind, an das Zielmolekül und insbesondere das zelluläre Molekül spezifisch zu binden. Neben monoklonalen Antikörpern können auch polyklonale Antikörper verwendet werden.

Peptide oder Polypeptide, die mit einem Zielmolekül, und im Rahmen der vorliegenden Erfindung somit insbesondere mit einem zellulären Molekül in Wechselwirkung treten, können mit im Stand der Technik bekannten Verfahren wie beispielsweise Phage-Display gescreent werden.

Diese Techniken sind den Fachleuten auf dem Gebiet bekannt. Dabei wird bei der Erzeugung derartiger Peptide, die auch als Peptid-Aptamere bezeichnet werden, typischerweise so vorgegangen, dass eine Peptid-Bibliothek angelegt wird, bspw. in Form von Phagen, und diese Bibliothek in Kontakt gebracht wird mit einem Zielmolekül. Die bindenden Peptide werden sodann typischerweise als Komplex zusammen mit dem Zielmolekül von den nicht bindenden Mitgliedern der Bibliothek entfernt. Es ist dabei im Rahmen der Kenntnisse der Fachleute auf diesem Gebiet, dass die Bindungseigenschaften zumindest bis zu einem bestimmten Umfang von den jeweils konkret vorliegenden Versuchsbedingungen, wie bspw. Salzgehalt und dergleichen, abhängen. Nach Abtrennen der mit einer höheren oder stärkeren Affinität oder Kraft an das Zielmolekül bindenden Peptide von den nicht-bindenden Mitgliedern der Bibliothek bzw. vom Zielmolekül können diese sodann charakterisiert werden. Gegebenenfalls ist vor der Charakterisierung ein Amplifikationsschritt, bspw. durch Vermehrung der entsprechenden, das Peptid bzw. die Peptide codierende Phagen erforderlich. Die Charakterisierung umfasst bevorzugter Weise die Sequenzierung der an das Zielmolekül bindenden Peptide. Die Peptide sind dabei hinsichtlich ihrer Länge grundsätzlich nicht beschränkt. Typischerweise werden in derartigen Verfahren jedoch Peptide mit einer Länge von 8 bis 20 Aminosäuren erhalten bzw. verwendet. Die Größe der Bibliotheken beträgt 10^2 bis 10^{18} , bevorzugter Weise 10^8 bis 10^{15} verschiedene Peptide.

Eine spezielle Form von an Zielmolekülen bindenden Polypeptiden stellen die Anticaline dar, wie sie beispielsweise in der deutschen Patentanmeldung DE 197 42 706 beschrieben sind.

Weiterhin können auch kleine Moleküle verwendet werden, die die Wirkung der Zielmoleküle antagonisieren. Derartige kleine Moleküle können beispielsweise durch ein Screeningverfahren, insbesondere ein Screening von Bibliotheken kleiner Moleküle identifiziert werden. Dabei wird das Zielmolekül mit einer Bibliothek in Kontakt gebracht und jene Mitglieder der Bibliothek, die daran binden, ermittelt, gegebenenfalls von den anderen Mitgliedern der Bibliothek bzw. vom Target abgetrennt und optional weiter charakterisiert. Auch hier wird die Charakterisierung des kleinen Moleküls nach den Fachleuten auf diesem Gebiet bekannten Verfahrensweisen erfolgen, so z.B. die Verbindung identifiziert und die Molekularstruktur bestimmt werden. Diese Bibliotheken umfassen dabei so wenig wie zwei und soviel wie bis zu mehrere 100 000 Mitglieder. Derartige kleine Moleküle werden auch als small molecules bezeichnet und sind solche, die der „Lepinsky Rule of five“ folgen.

Aptamere, wie hierin verwendet, sind D-Nukleinsäuren, entweder einzelsträngig oder doppelsträngig, die spezifisch an ein Zielmolekül binden. Die Herstellung von Aptameren ist bspw. beschrieben im Europäischen Patent EP 0 533 838. Dabei wird wie folgt vorgegangen:

Bei dem Verfahren zur Erzeugung der Aptameren wird eine Mischung aus Nukleinsäuren, d. h. potentiellen Aptameren bereitgestellt, wobei eine jede Nukleinsäure aus einem Segment aus wenigstens acht aufeinanderfolgenden, randomisierten Nukleotiden besteht und diese Mischung mit dem Zielmolekül in Kontakt gebracht wird, wobei Nukleinsäuren, die an das Zielmolekül binden, ggf. auf der Grundlage einer erhöhten Affinität, verglichen mit der Kandidatenmischung, vom Rest der Kandidatenmischung abgetrennt werden und die solchermaßen erhaltenen an das Zielmolekül, ggf. mit einer höheren Affinität oder Kraft, bindenden Nukleinsäuren amplifiziert werden. Diese Schritte werden mehrfach wiederholt, so dass am Ende des Verfahrens spezifisch an das jeweilige Zielmolekül bindende Nukleinsäuren, sogenannte Aptamere, erhalten werden. Es ist im Rahmen der vorliegenden Erfindung, dass diese Aptamere stabilisiert werden können, bspw. durch Einführung bestimmter chemischer Gruppen, wie den Fachleuten auf dem Gebiet der Aptamer-Entwicklung bekannt. Aptamere werden derzeit bereits therapeutisch eingesetzt. Es ist auch im Rahmen der vorliegenden Erfindung, dass die solchermaßen hergestellten Aptamere für die Targetvalidierung und als Leitsubstanzen für die Entwicklung von Medikamenten, insbesondere von kleinen Molekülen, verwendet werden.

Auf einem grundsätzlich ähnlichen Prinzip beruht die Herstellung oder Erzeugung von Spiegelmeren, die im Rahmen der vorliegenden Erfindung auf der Grundlage der Zielmoleküle entwickelt werden können. Die Herstellung von Spiegelmeren ist bspw. beschrieben in der internationalen Patentanmeldung WO 98/08856. Spiegelmere sind L-Nukleinsäure, d.h. bestehen aus L-Nukleotiden, und zeichnen sich im wesentlichen dadurch aus, dass sie in biologischen Systemen eine sehr hohe Stabilität aufweisen und gleichzeitig, vergleichbar den Aptameren, mit einem Zielmolekül spezifisch wechselwirken bzw. an dieses binden können. Dabei wird genauer so vorgegangen, dass eine heterogene Population aus D-Nukleinsäuren erzeugt wird, die Population mit dem optischen Antipoden des Zielmoleküls in Kontakt wird, im vorliegenden Falle somit mit dem D-Enantiomer des natürlicher Weise auftretenden L-Enantiomers, sodann jene D-Nukleinsäuren abgetrennt werden, die nicht mit der optischen Antipode des Zielmoleküls in Wechselwirkung getreten sind, die D-Nukleinsäuren, die mit der optischen Antipode des Zielmoleküls in Wechselwirkung getreten sind, bestimmt, ggf. abgetrennt und sequenziert werden und anschließend L-Nukleinsäuren synthetisiert werden, die in ihrer Sequenz mit derjenigen zuvor

für die D-Nukleinsäuren ermittelten Sequenzen identisch sind. Ähnlich dem Verfahren zur Herstellung von Aptameren ist es auch hier möglich, durch mehrfaches Wiederholen der Schritte geeignete Nukleinsäuren, d.h. Spiegelmere anzureichern bzw. zu erzeugen.

Eine weitere Klasse von Verbindungen, die unter Verwendung der Zielmoleküle hergestellt bzw. entwickelt werden können, sind Ribozyme, Antisense-Oligonukleotide und RNAi.

All diesen Klassen ist dabei gemein, dass sie nicht auf der Ebene des Translationsproduktes der Zielmoleküle ihre Wirkung entfalten, sondern auf der Ebene der für das jeweilige Protein codierenden Nukleinsäure. Oder, anders ausgedrückt, diese Klasse ist geeignet für Zielmoleküle, die als codierende oder nicht-codierende Nukleinsäuren vorliegen.

Bei Ribozymen handelt es sich um katalytisch aktive Nukleinsäuren, die bevorzugter Weise aus RNA aufgebaut sind und aus zwei Teilbereichen bestehen. Der erste Teilbereich ist für eine katalytische Aktivität verantwortlich, wohingegen der zweite Teil für eine spezifische Wechselwirkung mit einer Ziel-Nukleinsäure verantwortlich ist. Kommt es zur Ausbildung einer Wechselwirkung zwischen der Ziel-Nukleinsäure und dem zweiten Teil des Ribozyms, typischer Weise durch Hybridisierung von zueinander im wesentlichen komplementären Basenbereichen, kann der katalytische Teil des Ribozyms entweder intramolekular oder intermolekular, wobei letzteres bevorzugt ist, die Ziel-Nukleinsäure hydrolysieren für den Fall, dass die katalytische Wirkung des Ribozyms eine Phosphodiesterase-Aktivität ist. In der Folge kommt es zu einem – ggf. weiteren – Abbau der codierenden Nukleinsäure, wobei der Titer des Zielmoleküls sowohl auf der Nukleinsäure- als auch der Proteinebene sowohl intrazellulär als auch extrazellulär verringert wird. Ribozyme, deren Verwendung sowie Konstruktionsprinzipien sind den Fachleuten auf dem Gebiet bekannt und bspw. beschrieben in Doherty und Doudna (Ribozyme structures and mechanisms. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 2001;30:457-75) und Lewin und Hauswirth (Ribozyme gene therapy: applications for molecular medicine. *Trends Mol Med* 2001, 7:221-8).

Auf einem grundsätzlich ähnlichen Wirkmechanismus beruht die Verwendung von Antisense-Oligonukleotiden. Antisense-Oligonukleotide hybridisieren infolge Basenkomplementarität typischerweise mit einer Ziel-RNA, normalerweise mit mRNA und aktivieren dadurch RNAaseH. RNAaseH wird sowohl durch Phosphodiester als auch Phosphorothioat-gekoppelte DNA aktiviert. Phosphodiester-gekoppelte DNA wird jedoch schnell durch zelluläre Nukleasen mit Ausnahme von Phosphorothioat-gekoppelter DNA abgebaut. Diese resistenten, nicht-natürlicher

Weise auftretende DNA-Derivate inhibieren RNAaseH nicht, wenn sie mit RNA hybridisiert sind. Mit anderen Worten, Antisense-Polynukleotide sind nur als DNA-RNA-Hybridkomplex wirksam. Beispiele für derartige Antisense-Oligonukleotide finden sich, u.a. in US-Patent US 5,849,902 oder US 5,989,912. Prinzipiell besteht das wesentliche Konzept der Antisense-Oligonukleotide darin, gegen bestimmte RNA eine komplementäre Nukleinsäure bereitzustellen. Mit anderen Worten, ausgehend von der Kenntnis der Nukleinsäuresequenz des Zielmoleküls können durch Basenkomplementarität geeignete Antisense-Oligonukleotide hergestellt werden, die zu einem Abbau der codierenden Nukleinsäure, insbesondere der mRNA des Zielmoleküls, führen.

Eine weitere Klasse von Verbindungen sind RNAi-vermittelnde Moleküle. Derartige Mittel weisen typischerweise eine Länge von etwa 21 bis 23 Nukleotiden auf. Dabei entspricht einer der beiden Stränge der RNA einer Sequenz eines abzubauenen Genes. Mit anderen Worten, ausgehend von der Kenntnis der für das Zielmolekül codierenden Nukleinsäure, insbesondere der mRNA, kann eine doppelsträngige RNA hergestellt werden, wobei einer der beiden RNA-Stränge komplementär zu der besagten, für das Zielmolekül codierenden Nukleinsäure ist, bevorzugter Weise zur mRNA, und diese dann zum Abbau der entsprechenden codierenden Nukleinsäure führt und damit einhergehend zu einer Verringerung des Titers des jeweiligen Zielmoleküls. Die Erzeugung und Verwendung von RNAi als Medikament bzw. diagnostisches Mittel ist bspw. beschrieben in den Internationalen Patentanmeldungen WO 00/44895 und WO 01/75164.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform ist die heterologe Nukleinsäure ein RNAi-vermittelndes Molekül. Die folgenden Ausführungen werden beispielhaft unter Bezugnahme auf derartige RNAi-vermittelnde Moleküle offenbart, gelten jedoch in gleicher Weise für eine jegliche andere, durch eine heterologe Nukleinsäure codierte Molekülspezies und insbesondere für Antisens-Moleküle, Aptamere, Anticaline, Peptid-Aptamere und Antikörper.

Für die RNAi-Technologie macht man sich die Eigenschaft von zellulären Enzymen, so genannten DNA-abhängige RNA-Polymerasen, zunutze, die in der Lage sind einen Abschnitt einer DNA in eine RNA zu überschreiben. Entsprechend können zur Auslösung des RNAi-Prozesses DNA-Abschnitten in Zellen eingebracht werden, die für eine siRNA-Sequenz codieren. Dabei kann ausgehend von den DNA-Abschnitten zunächst die Bildung einer intermediären shRNA erfolgen, oder die doppelsträngige siRNA durch separate Expression der komplementären RNA

Einzelstränge entstehen; die shRNA und die doppelsträngige siRNA werden im Anschluss daran, d.h. nach ihrer Expression durch zelluläre Enzyme zu einer aktiven siRNA prozessiert. DNA-basierte Vektoren, welche solche shRNA oder siRNAs exprimieren, werden hierin als siRNA-Vektoren bezeichnet. Diese Technologie wird auch als DNA-directed RNAi (ddRNAi) bezeichnet. Sowohl diese Technologie als auch die entsprechenden Vektoren sind im Stand der Technik als solches bekannt.

Zur Expression der DNA-Abschnitte sind weitere genetische Elemente erforderlich, insbesondere ein Promotor. Ein Promotor gewährleistet, dass die DNA-abhängigen RNA-Polymerasen an die DNA binden und die Transkription der RNA initiiert wird. Der Promoter kann derart gestaltet sein, dass die Bindung der RNA-Polymerase und die einhergehende Transkription der RNA erst bei Anwesenheit eines aktivierenden Moleküls, d.h. eines Induktors erfolgt. Solche Systeme werden als induzierbare Expressionssysteme, bzw. induzierbare Promotoren bezeichnet. Beispiele für solche Systeme sind das Tetrazyklin-induzierbare Expressionssystem (Gossen M. und Bujard H., Proc Natl Acad Sci U S A 89(12):5547-51, 1992), das Ekdysol-induzierbare Expressionssystem (No D. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:3346-3351, 1996), das P1 Cre/lox Rekombinationssystem (Dale E.C. and Ow D.W., Proc. Natl. Acad. Sci. 88:10558-10562, 1991), das Estradiol-induzierbare Expressionssystem (Whelan J. And Miller N., J Steroid Biochem Mol Biol. 58(1):3-12, 1996) sowie Ribozym-basierte induzierbare Expressionssysteme (Yen L. et al., Nature 431:471-476, 2004). Die bei der ddRNAi- Technologie verwendeten DNA-Vektoren können somit genauso wie chemisch synthetisierte siRNAs für die gezielte Ausschaltung von Genen in tierischen und menschlichen Zellen verwendet werden.

Zu einer weiteren Klasse an dsRNA Molekülen, die die Funktion von Genen ausschalten oder verändern können, gehören auch endogene mikro-RNAs (miRNAs), wie z. B. in der Veröffentlichung von Lee et al. beschrieben (Lee R.C. et al., Cell 75(5):843-854, 1993) beschrieben sind. miRNAs werden durch Gene kodiert und in mRNA transkribiert. Abschnitte dieser mRNA sind komplementär zueinander, so dass sich das Molekül in eine RNA-Struktur mit partiellem Doppelstrangcharakter faltet. Dieser Bereich besteht aus einem dsRNA-Stamm und einer Schleifen- oder Loopregion, welche die beiden homologen Bereiche verbindet. Endogene Enzyme erkennen diese Struktur und prozessieren daraus kleinere einzelsträngige RNA-Moleküle, welche ihrerseits wieder eine Homologie zu weiteren, endogenen mRNAs besitzen, deren Abbau sie verursachen. Für diesen miRNA-induzierten Abbauprozess sind dieselben Klassen an körpereigenen Enzymen verantwortlich, welche auch die RNAi für shRNA und siRNAs vermitteln.

Eine weitere Klasse von dsRNA Molekülen, die die Funktion von Genen ausschalten oder verändern können, stellen die Endoribonuklease-behandelte siRNAs (esiRNA) dar. Dabei entstehen von einem größerem Abschnitt doppelsträngiger RNA, die zu einem Gen homolog ist, über den Verdau mit einer Endoribonuklease kurze, doppelsträngige RNAs. Diese esiRNAs initiieren analog zu den siRNAs den Abbau der mRNA des Gens zu dem sie homolog sind.

Für RNAi-Versuche bzw. die Auslösung von RNAi werden siRNA oder siRNA-Vektoren in die Zellen eingebracht. Durch das Wachstum der Zellen und der dadurch bedingten Zunahme der Zellmasse in einer Kultur werden solche genetischen Elemente ausgedünnt, so dass auch deren Einfluss auf die Genexpression zeitlich begrenzt ist. Man spricht dann von transienter Transfektion. Für jeden RNAi-Versuch müssen daher erneut siRNA oder siRNA-Vektoren in die Zellen eingebracht werden.

Unter einer RNAi Bibliothek versteht man bevorzugterweise eine Vielzahl gegen unterschiedliche Gene gerichteter siRNAs. Solche siRNA Bibliotheken werden eingesetzt, um (eine) bestimmte Funktion(en) von Gruppen von Genen, oder der Gesamtheit der Gene (Genom) eines Organismus in zellulären Assays zu untersuchen. siRNA Bibliotheken können typischerweise nur in speziell ausgestatteten Versuchseinrichtungen eingesetzt werden, da die Transfektion, Transduktion oder Infektion der Zellen und die Kontrolle der Effizienz des Knock-Down nur unter erheblichem apparativem Aufwand möglich ist. Daher ist die Verwendung von siRNA Bibliotheken für den Wissenschaftler in einem normal ausgestatteten Labor nicht möglich. Das erfindungsgemäße Verfahren löst auch dieses Problem, in dem bereits transfizierte, transduzierte oder infizierte Zellen einer siRNA Bibliothek eingefroren, gelagert und Wissenschaftlern geliefert werden können.

Die Effizienz der Transfektion mit siRNAs oder siRNA-kodierenden Vektoren bestimmt nachhaltig die Menge der in der Zelle wirksamen siRNA Moleküle und damit auch die Effizienz des induzierten RNAi-Effekts. Die Effizienz der Transfektion ist von einer Vielzahl von Faktoren, wie der Zusammensetzung des Mediums, dem physiologischen Zustand oder aber Passagenzahl der Zelle, abhängig. Viele dieser Faktoren sind vom Experimentator nur schwer zu kontrollieren. Daher kommt es oft zu Schwankungen der Effizienz der Transfektion, was zu unterschiedlichen Versuchsergebnissen innerhalb einer Testreihe führt und so die Interpretation von Versuchser-

gebnissen erschwert, weshalb das erfindungsgemäße Verfahren gerade für diese Art von Anwendungen so vorteilhaft ist.

Um das Problem der transienten Expression zu umgehen, werden DNA-Vektoren verwendet, die zusätzlich zum eingebrachten Gen ein Selektionsgen wie beispielsweise für ein Selektionsantibiotikum, die den Fachleuten auf dem Gebiet bekannt sind, tragen. Durch Behandlung mit einem Selektionsantibiotikum wird sichergestellt, dass nur Zellen überleben, die das Selektionsgen und damit auch das interessierende Gen in ihr Genom eingebaut haben. Als DNA-Vektoren eignen sich besonders Plasmid-basierte DNA-Vektoren, Retroviren, und besonders die Klasse der Lentiviren, welche auch nicht-teilende Zellen erfolgreich transduzieren und das Virusgenom in das Wirtsgenom integrieren können. Die genetische Veränderung wird dadurch bei jeder Zellteilung an die Tochterzellen weitergegeben, wodurch eine stabile Expression des betreffenden Gens erreicht wird. Diese Technologie findet auch für siRNA-Vektoren Anwendung. Der Nachteil stabiler Expression ist, dass die Herstellung einer Zelllinie sehr zeit- und personalintensiv ist.

Zum gezielten transienten Ausschalten von Genen wird eine siRNA in die Zelle gebracht, um die RNAi auszulösen. Dies kann beispielsweise durch Transfektion mit einer synthetischen siRNA oder einem DNA-Vektor, bevorzugt durch die Transduktion oder Infektion mit einem rekombinanten Adenovirus, Adeno-assoziierten Virus, Bacculovirus, Sendaivirus, Herpes simplex Virus, Lentivirus, Retrovirus, oder eines anderen für den Gentransfer geeigneten DNA-Vektors erfolgen. Der Vorteil von siRNA-exprimierenden Adenoviren besteht darin, dass ein, im Vergleich zur Verwendung von synthetischer siRNA, wesentlich breiteres Spektrum an Zelllinien, aber auch primäre Zellen, mit hoher Effizienz transduziert werden kann. Dadurch wird auch eine hohe Effizienz des RNAi-Effektes möglich. Zudem werden Adenoviren aktiv über Rezeptor-vermittelte Mechanismen von der Zelle aufgenommen, wodurch der ausgelöste Effekt unabhängig von veränderlichen Parametern einer Zellkultur ist.

Für die Transfektion, Transduktion oder Infektion können Zellen aus wachsenden oder nicht-wachsenden Zellkulturen verwendet werden. Bei wachsenden Zellkulturen werden vorzugsweise Zellen aus Zellkulturen der exponentiellen Wachstumsphase verwendet. Dabei sind bevorzugterweise vor der Transfektion, Transduktion oder Infektion gerade so viele Zellen in dem Gefäß, dass der Boden des Gefäßes gleichmäßig und zu nicht mehr als 90 % mit Zellen bedeckt ist. Die Transfektion, Transduktion oder Infektion der Zellen zum Auslösen der RNAi kann zwischen etwa 30 Minuten und 144 Stunden, bevorzugt zwischen etwa 10 und 24 Stunden, besonders be-

vorzugt zwischen etwa 16 und 20 Stunden vor dem Einfrieren der Zellen auf die Lagertemperatur erfolgen.

Bei Einbringen einer siRNA oder eines nicht-induzierbaren DNA-Vektors für die Expression von siRNA für einen Knock-Down eines Gens aus der Klasse der essentiellen Gene erfolgt die Transfektion, Transduktion, oder Infektion 30 Minuten bis 12h, besonders bevorzugt zwischen 1h und 6 h vor dem Einfrieren auf die Lagertemperatur. Wird hingegen ein DNA-Vektor verwendet, bei welchem die Bildung von siRNA erst in Gegenwart eines Induktors erfolgt, wird die Transfektion, Transduktion oder Infektion der Zellen zum Auslösen der RNAi zwischen 30 Minuten und 144 Stunden, bevorzugt zwischen 10 und 24 Stunden, besonders bevorzugt zwischen 16 und 20 Stunden vor dem Einfrieren der Zellen auf die Lagertemperatur durchgeführt. Die Ernte der Zellen erfolgt vorzugsweise vor dem Erreichen der vollständigen Bedeckung des Zellkulturgefäßes mit einem lückenlosen Zellrasen, d.h. vor Erreichen einer vollständigen Konfluenz.

Die Erfindung wird nun anhand der folgenden Beispiele und Figuren weiter erläutert, aus denen sich weitere Merkmale, Ausführungsformen und Vorteile der Erfindung ergeben. Dabei zeigt

Fig. 1 das Ergebnis des p53-Knock-Downs in dem Western blot gemäß Beispiel 1;

Fig. 2 das Ergebnis einer mikroskopischen Untersuchung der Zellmorphologie der in Beispiel 1 beschriebenen Zellen, wobei

Fig. 2A HCT116-Zellen nach normaler Kultivierung,

Fig. 2B HCT116-Zellen nach 24 Stunden nach Auftauen aus einer 96-Well-Multititerplatte; und

Fig. 2C mit Ad.shRNA.p53-infizierte HCT116-Zellen 24 Stunden nach Auftauen aus einer 96-Well-Multititerplatte zeigt;

Fig. 3 die Vitalität der Zellen aus Beispiel 2, wie mit dem WST-8-Reduktionsassay gemessen;

- Fig. 4 die Vitalität der Zellen gemäß Beispiel 3, wobei die Zellvitalität gemessen ist mit dem WST-8-Reduktionsassay;
- Fig. 5 die Vitalität der Zellen gemäß Beispiel 4, wobei die Zellvitalität gemessen ist mit dem WST-8-Reduktionsassay;
- Fig. 6 die Vitalität der Zellen gemäß Beispiel 5, wobei die Zellvitalität gemessen ist mit dem WST-8-Reduktionsassay;
- Fig. 7 die Vitalität der Zellen gemäß Beispiel 5, wobei die Zellvitalität gemessen ist mit dem WST-8-Reduktionsassay;
- Fig. 8 die Virusfreiheit aufgetauter Zellen gemäß Beispiel 8, wobei die Menge an infektiösen Viren im Überstand ermittelt wurde.
- Fig. 9 die Vitalität der Zellen gemäß Beispiel 9, wobei die Wachstumskurven von modifizierten Zellen aufgezeichnet wurde.

Beispiel 1: Einfrieren und Lagern von HCT116 Zellen mit Knock-down gegen p53

HCT116 (ATCC: CCL-247) Darmkrebszellen wurden in dem Kulturmedium McCoy's Kompletmedium (McCoy's, 2mM L-Glutamine, 10% FCS) kultiviert, bis eine ausreichende Anzahl von Zellen zum Infizieren mit einem shRNA-Adenovirus zur Hemmung von p53 (Ad.shRNA.p53) zur Verfügung stand.

Ad.shRNA.p53 ist ein E1/E3-deletierter Adenovirus mit der zu p53 homologen sense shRNA-Sequenz gactccagtggtaatctac unter der Kontrolle des RNA Polymerase III Promotors U6. Die Konstruktion des Adenovirus Ad.shRNA.p53 erfolgte durch Klonieren der shRNA-Sequenz (Brummelkamp T.R. et al., Science, 296(5567):550-553, 2002) für den Knock-Down von p53 in den Vektor pENTR™/U6 (Invitrogen, Carlsbad, Californien, USA) und der anschließenden homologen Rekombination *in vitro* mit dem Vektor pAd/Block-iT™-DEST RNAi Gateway® vector system gemäß den Angaben des Herstellers (Invitrogen, Carlsbad, Californien, USA).

Das Kulturmedium wurde abgenommen und für die Transduktion durch ein Kulturmedium mit reduziertem Serumgehalt (2% FCS) ersetzt. Danach wurden 2 oder 8 infektiöse Viruspartikel (multiplicity of infection = MOI) des Ad.shRNA.p53 pro Zelle in das Kulturmedium gegeben und für 16h inkubiert. Die multiplicity of infection (MOI) wurde durch Ermittlung des zytopathischen Effekts nach Infektion von 293 Zellen mit Verdünnungen, des mittels Ultrazentrifugation mit CsCl-Gradienten gereinigten Virus Ad.shRNA.p53, ermittelt (TCID₅₀).

Das Zellkulturmedium wurde entfernt und die Zellen wurden 3-mal mit PBS gewaschen, bevor mit einer Trypsinlösung (2,5g/l) die adhären Zellen von der Zellkulturgefäßoberfläche gelöst wurden. Die Zellen wurden in Kulturmedium aufgenommen, die Zellzahl bestimmt, die Zellen bei 100 x g für 5 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert und das Zellpellet mit Einfriermedium (95% Kompletmedium, 5% DMSO) auf eine Zellzahl von 5×10^5 Zellen pro Milliliter eingestellt. Nachfolgend wurden je 50µl dieser Zellsuspension in jede Kavität einer 96-well Multititerplatte gegeben. Als Kontrolle (Ktr. in Fig. 1) wurde mit HCT116 Zellen, die nicht mit Adenovirus infiziert waren, in gleicher Weise eine Zellsuspension hergestellt und jeweils 50µl dieser Zellsuspension in jede Kavität einer 96-well Multititerplatte überführt. Die 96-well Multititerplatten wurden mit einem Vakuumiergerät in einen Plastikbeutel eingeschweißt (20µm Polyamid / 70µm Polyethylen, Alexander Brandau, vakuumtüte.de), wobei die Multititerplatten auf einen Atmosphärendruck von 0,2 bar gebracht wurden. Danach wurden die Multititerplatten in einen Gefrierschrank mit einer Temperatur von -78°C überführt, wobei die Platten mit ihrer Unterseite direkt auf einen Einlegeboden platziert wurden.

Nach 2-wöchiger Lagerung wurden zunächst die Plastikfolie der Plastikbeutel entfernt und die Zellen in einen Zellkulturinkubator (37°C, 5% CO₂, 90% Luftfeuchte) überführt. Nach 30 Minuten wurde 150µl frisches Kulturmedium pro Kavität der Multititerplatten und in 50µl Einfriermedium suspendierten Zellen zugegeben. Nach 48h wurden Lysate der Zellen mit einem Lysispuffer (50mM Tris-HCl pH 8,0; 150mM NaCl; 1mM EDTA; 0,5 mM Dithiothreitol; 2 µM Leupeptin; 1 mM Benzamidin; 2µM Aprotinin; 0,5% Nonidet-P40) hergestellt, die Gesamtproteinmenge der Lysate nach der Methode von Bradford (Bradford M.M., Anal. Biochem. 72:248-254, 1976) bestimmt und gleiche Mengen Protein pro Probe auf ein 12,5% SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. Nach Auftrennung der Proteine mittels Elektrophorese wurden die Proteine aus dem Gel auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran transferiert und mit einem p53-spezifischen monoklonalen Antikörper (Klon DO-1, BD Pharmingen) ein Western blot zum Nachweis des p53 Proteins durchgeführt (Fig. 1).

Parallel wurde die Integrität der Zellen nach dem erfindungsgemäßen Einfrierverfahren mit Zellen in nicht eingefrorenen Kontrollgefäßen im Mikroskop verglichen. Dazu wurde das Kulturmedium abgenommen und die Zellen mit PBS überschichtet. Mit dem Mikroskop Zeiss Axio-Vert 35, ausgestattet mit einer digitalen Kamera (AxioCam MR), und dem Bildverarbeitungssoftware AxioVision wurden Durchlichtaufnahmen in 400-facher Vergrößerung generiert (Fig. 2). Die Ergebnisse sind in Fig. 2A-C dargestellt.

Fig. 1 zeigt eine vergleichbare Abnahme der Bandenintensität im p53-Western Blot von Ad.shRNA.p53-transduzierten HCT116 Zellen in eingefrorenen (24h nach Auftauen, 48h Stunden nach Auftauen) und nicht eingefrorenen Zellen (normal kultiviert). Dabei blieb der Knock-down bis zu 48h nach Auftauen erhalten.

Das Beispiel 1 zeigt somit, dass HCT116 Zellen, welche gemäß dem in Beispiel 1 beschriebenen Verfahren eingefroren wurden, 48h Stunden nach Auftauen eine intakte Morphologie aufweisen.

Soweit nicht anders angegeben wurden in den folgenden Beispielen die gleichen Verfahren angewendet wie in Beispiel 1.

Beispiel 2: Zytotoxizität von 5-Fluorouracil in HCT116 mit und ohne p53 Knock-down

Um die Funktionalität der nach dem in Beispiel 1 beschriebenen erfindungsgemäßen Verfahren eingefrorenen Zellen zu zeigen, wurden die Zellen nach dem Auftauen in ein Zytotoxizitäts-Assay verwendet. HCT116 Zellen wurden nach Infektion mit Ad.shRNA.p53 in 96-well Multiwellplatten wie in Beispiel 1 beschrieben eingefroren. Als Kontrolle wurden unbehandelte HCT116 verwendet. Nach dem Einfrieren wurden die Zellen nach einem Monat wieder aufgetaut und unterschiedliche Konzentrationen des Chemotherapeutikums 5-Fluorouracil in das in Beispiel 1 beschriebene Kulturmedium gegeben. Nach 48h wurde die Zytotoxizität von 5-Fluorouracil bestimmt, indem das Kulturmedium durch ein mit WST-8 versetztes Kulturmedium (CKK8-Assay, Dojindo Molecular Technologies, Inc.) gemäß den Angaben des Herstellers ersetzt wurde. Dazu wurde die metabolische Aktivität anhand des Umsatz des Tetrazoliumsalzes WST-8 (WST-8 Reduktionsassay) von 5-Fluorouracil behandelten Zellen bestimmt und mit der metabolischen Aktivität unbehandelter Zellen (Zellvitalität 100%) verglichen.

Die aufgetragenen Werte in Fig. 3 sind die Mittelwerte einer Dreifachbestimmung. Es wird deutlich, dass 5-Fluorouracil die Vitalität bei HCT116 Zellen herabsetzt. In Übereinstimmung mit Literaturdaten (Bunz et al., 1999, J. Clin. Investig. 104:263-269; Longley et al., 2002, Cancer Res. 162:2644-2649; Boyer et al. 2004, Clin Cancer Res. 2158-2167), zeigt sich, dass Ad.shRNA.p53 transduzierte HCT116 Zellen ohne p53 (□) eine geringere Empfindlichkeit gegenüber dem Chemotherapeutikum 5-Fluorouracil aufweisen als die unbehandelten HCT116 Zellen mit funktionellem p53 (◆).

Das Beispiel 2 zeigt somit, dass das erfindungsgemäße Verfahren besonders gut geeignet ist, in Multiwellplatten gelagerte Zellen für funktionelle Untersuchungen von Genen in zellulären Assays vorzuhalten.

Beispiel 3: Vergleich der Lagerung von Zellen im Tiefkühlschrank mit und ohne Vakuum

HCT116 Zellen wurden wie in Beispiel 1 beschrieben kultiviert und 50µl einer Zellsuspension in Einfriermedium (95% Komplettmedium, 5% DMSO) in jedes Well einer 96-well Multititerplatte pipettiert. Die mit Deckel verschlossenen 96-well Multititerplatten wurden einzeln in einen Folienbeutel vakuumverschweißt. Als Kontrolle wurden 96-well Multiwellplatten ohne Vakuum in Folienbeutel eingefroren. Die eingeschweißten Platten und die Kontrollen wurden unter gleichen Bedingungen in einen -80°C Tiefkühlschrank gestellt und eingefroren gelagert. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Multiwellplatten nicht gestapelt wurden, um ein zügiges Einfrieren zu gewährleisten.

Die Zellen wurden unter diesen Bedingungen in 96-well Multiwellplatten für einen, drei und sechs Monate gelagert und ein WST-8 Reduktionsassay wie hierin beschrieben durchgeführt. Dazu wurde das Kulturmedium gegen ein mit WST-8 Reagenz versetztes Kulturmedium gemäß den Vorgaben des Herstellers ausgetauscht (CCK8-Assay, Dojindo Molecular Technologies, Inc.). Die Zellvitalität wurde nach 1 h durch die Messung der Absorption des mit WST-8 versetzten Kulturmediums bei 450nm bestimmt. In Fig. 4 ist die prozentuale Vitalität der Zellen im Vergleich zu nicht eingefrorenen Kontrollzellen (Vitalität 100%) dargestellt. Im Vakuum gelagerte Zellen konnten auch nach sechs Monaten mit einer Zellvitalität von über 90% wieder auf-

getaut werden. Wurden die Zellen hingegen ohne Vakuum gelagert, so verringerte sich ihre Vitalität bereits nach 3 Monate auf 70% und nach 6 Monaten auf 42%.

Das Beispiel 3 zeigt somit, dass durch Lagerung unter Vakuum die Vitalität von rekombinanten Zellen, die bei -80°C gelagert werden, auch nach längeren Zeiträumen erhalten werden kann. Dadurch ist dieses Verfahren besonders gut geeignet, Zellen für zellbasierte Assays langfristig vorzuhalten.

Beispiel 4: Zellvitalität in Abhängigkeit des Volumens des verwendeten Einfriermediums

HCT116 Zellen wurden wie in Beispiel 1 beschrieben kultiviert. Zusätzlich wurden A549 Zellen (ATCC: CCL-185) mit dem Kulturmedium Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM) Kompletmedium (DMEM, 2mM L-Glutamin, 2mM Natrumpyruvate, 10% FCS) kultiviert. Nachdem eine ausreichende Menge an Zellen zur Verfügung stand, wurden beide Zelllinien wie im Folgenden beschrieben, eingefroren.

Für HCT116 Zellen wurde das Einfriermedium McCoy's, 10% FCS, 2mM L-Glutamat, 4% DMSO und für A549 Zellen das Einfriermedium DMEM, 2mM L-Glutamin, 2mM Natrumpyruvate, 10% FCS 5% Glyzerin verwendet. Abweichend von dem Vorgehen in Beispiel 1 wurden Zellsuspensionen in Einfriermedium von 50 μl aus 1×10^6 Zellen pro Milliliter, 100 μl aus 5×10^5 Zellen pro Milliliter, 200 μl aus $2,5 \times 10^5$ Zellen pro Milliliter und 400 μl aus $1,25 \times 10^5$ Zellen pro Milliliter in einzelne Kavitäten einer 48-Well gegeben, so dass jeweils 5×10^4 Zellen in jeder Kavität vorhanden war. Danach wurden die Zellen nach dem erfindungsgemäßen Verfahren wie in Beispiel 1 beschrieben eingefroren. Nach einer Woche wurden die Zellen aufgetaut und nach 30 Minuten wurde jeweils das Doppelte des Volumens des Einfriermediums an Kulturmedium zugegeben. Die Zellen wurden für 48h kultiviert und die Vitalität mit einem WST-8 Reduktionsassay wie hierin beschrieben bestimmt. Um die Vitalität der Zellen nach den Einfrierverfahren zu bestimmen, wurden parallel mit einer Verdünnungsreihe von Zellen in nicht eingefrorenen Kontrollgefäßen ein WST-8 Reduktionsassay durchgeführt. Anhand der Zellzahlen in der Verdünnungsreihe wurde eine Korrelationskurve erstellt und daraus die Zellvitalität der dem Einfrierverfahren unterworfenen Zellen bestimmt.

Das Beispiel 4 zeigt, dass die Vitalität von Zellen, die in Volumina des Einfriermediums von mehr als 50µl Einfriermedium eingefroren gelagert wurden, bis unter 75% (A549) bzw. 50% (HCT116) im Vergleich zu nicht eingefrorenen Kontrollzellen absinkt. Demnach kann die Zellvitalität in dem Einfrierverfahren besonders gut erhalten werden, wenn die Zellen in einem ausreichend niedrigen Volumen des jeweiligen Einfriermediums eingefroren werden.

Beispiel 5: Vergleich des Einfrierens in Tropfen mit dem konfluenten Einfrieren aus größeren Zellkulturgefäßen

Wie in Beispiel 1 beschrieben, wurden HCT116 Zellen kultiviert und eine Zellsuspension mit 5×10^5 Zellen/ml in Einfriermedium hergestellt. Abweichend von Beispiel 1 wurden 1,5 ml der Zellsuspension auf 10 cm Zellkulturschalen ausgebracht. Dabei wurde die Zellsuspension zum einen auf der gesamten Zellkulturoberfläche ausgebracht, so dass sich ein konfluenter Flüssigkeitstopfen bildete (konfluentes Einfrieren), zum anderen wurde die Zellsuspension in kleine voneinander getrennte Tropfen mit jeweils 100µl Volumen ausgebracht (Einfrieren in Tropfen). Die Zellen wurden wie für 96-well Multiwellplatten in Beispiel 1 beschrieben eingefroren und nach einer Woche Lagerung bei -80°C in einen Zellkulturinkubator (37°C, 5% CO₂, 90% Luftfeuchtigkeit) gestellt. Nach 30 min wurde 10 ml Kulturmedium zu den Zellen gegeben. 48h nach dem Auftauen in einem Zellinkubator wurden die Zellen trypsinisiert und mit einer Zählkammer (Fa. Neubauer) im Phasenkontrast bei 100facher Vergrößerung die Gesamtzellzahl pro 10cm Zellkulturschale bestimmt. Zudem wurde die Zellvitalität in einem Farbausschlusstest mit dem Farbstoff Erythrosin B bestimmt. Die Zellen wurden 15 min bei Raumtemperatur in der Färbelösung (25mg Erythrosin B pro 1 ml PBS) inkubiert und die Anteil der gefärbten Zellen an der Gesamtzellzahl unter dem Mikroskop im Durchlicht bestimmt.

Das Beispiel 5 zeigt, dass die Vitalität der Zellen durch das Einfrieren in Tropfen gegenüber nicht eingefrorenen Kontrollzellen unverändert bleibt, wohingegen die Vitalität bei konfluentem Einfrieren auf 80% sinkt. Das Beispiel 5 zeigt weiterhin, dass beim Einfrieren in Tropfen 48h nach dem Auftauen eine Zunahme der Zellzahl um 57,35 % gegenüber der initial eingefrorenen Zellzahl erhalten wurde, wohingegen das konfluente Einfrieren zu einer Abnahme der Zellzahl um 23,45% führte.

Beispiel 6: Verfahren zum Einfrieren und Lagern von Zellen bei Virusfreiheit im Einfriermedium und Zellkulturmedium der Zellen nach dem Auftauen

Die Bindung von humanen Adenoviren an eukaryontische Zellen erfolgt durch Interaktion des Virus mit Molekülen der Zelloberfläche. Die sich anschließende Virusaufnahme erfolgt entweder durch eine spezifische Wechselwirkung mit weiteren Molekülen auf der Zelloberfläche oder durch unspezifische Virusaufnahme (Meier O., J Gene Med. 2004, 6 Suppl 1:S152-63. Review). Die Virusaufnahme erfolgt zeitabhängig und erreicht ca. 16h nach Viruszugabe (16h post Transduktion) zum Zellkulturmedium ein Maximum (Mittereder N. et al., J Virol. 1996, 70:7498-509). Die sowohl spezifische als auch unspezifische Adhäsion von Adenoviren an eukaryotische Zellen und verbleibende Menge an infektiösen Viruspartikeln nach Transduktion im Zellkulturüberstand führt dazu, dass bei Viruszugabe zu einer Zellkultur ein Bruchteil an Adenoviren an der Zelloberfläche unspezifisch adhäriert und bei unvollständiger Entfernung des Zellkulturmedium eine Restmenge an infektiösen Adenoviren zellassoziiert verbleibt.

Gemäß einer Stellungnahme der zentralen Kommission für biologische Sicherheit (ZKBS, Az.: 6790-10-28 2, 2005. Allgemeine Stellungnahme der ZKBS zu häufig durchgeführten gentechnischen Arbeiten mit den zugrunde liegenden Kriterien der Vergleichbarkeit: Gentransfer mit Hilfe von Adenovirus Typ 5. Az.: 6790-10-28 2, geänderte Fassung vom November 2001) sind Zellen, welche mit replikationsdefekten Adenoviren transduziert werden und den Replikationsdefekt dieser Adenoviren nicht komplementieren als S1 Organismen einzustufen. Erfolgt der Waschvorgang für die Herstellung der gemäß der vorliegenden Erfindung hergestellten cryopräservierten Zellen vollständig, so dass nach dem Auftauen keine Virusaktivität mehr nachgewiesen werden kann, kann eine Einstufung des Produkts, d. h. der genetisch veränderten cryopräservierten Zellen, nach Sicherheitsstufe S1 erfolgen. Ein solches Verfahren für einen vollständigen Waschvorgang ist im Folgenden beschrieben.

Das vorliegende Beispiel zeigt, dass sich durch ein erweitertes Waschverfahren die Anzahl an Zell-assoziierten infektiösen Partikeln vollständig entfernen lassen.

1×10^6 A549 Zellen wurden mit 100 infektiösen Adenoviren, welche GFP unter der Kontrolle eines CMV Promoters exprimieren, pro Zelle transduziert und die Anzahl an infektiösen Viren nach verschiedenen Zeitpunkten nach Viruszugabe ermittelt. Die Konzentration der infektiösen Viren, angegeben in fluorescence forming units (FFU) im Medium, betrug 2×10^7 FFU gesamt

und 2×10^6 FFU/ml nach Viruszugabe. Die Ergebnisse insbesondere der Versuche a – c sind in Fig. 8 dargestellt.

Titerbestimmung:

Die Bestimmung der gene transducing units (GTU) erfolgt durch mikroskopische Bestimmung der Anzahl fluoreszierender Zellen (fluorescence forming units, FFU) nach Infektion von 293HEK Zellen mit seriellen Virusverdünnungen (Mittereder a. a. O.).

Die FFU-Titer der Überstände/Lysate werden in FFU/ml angegeben

a) Abnahme infektiöser Viren im Zellkulturüberstand

10µl Mediumüberstand wurden nach 1h, 3h, 6h, nach 24h abgenommen und seriell verdünnt. und auf 293 Zellen in 96 wells gegeben und nach 48h die Anzahl an fluoreszierenden Zellen (FFU) im Duplikat ermittelt (Fig. 8, 0h,1h,3h,6h, 24h Überstand). Die Virusmenge im Zellkulturüberstand nimmt innerhalb von 24 Stunden um den Faktor 1.5×10^3 ab (Tabelle 2a).

Tabelle 2a	Verdünnung	FFU/well	Mittelwert Titer
Nach 1h:	1:1000	23 und 42	3.25×10^5
Nach 3h:	1:1000	28 und 33	3.05×10^5
Nach 6h:	1:1000	4 und 7	5.05×10^4
Nach 6h:	1:100	44 und 53	4.85×10^4
Nach 24h:	1:1000	13 und 13	1.30×10^4

b) Einfrieren nach Standardprozedur und FFU recovery aus den eingefrorenen Zellen.

Die Zellen wurden vor dem Einfrieren standardmäßig 1x mit PBS nach dem Trypsinieren gewaschen (Standardprozedur) und gemäß dem hierin und insbesondere in den vorhergehenden Beispielen nach dem beschriebenen Einfrierverfahren in 96-well cryokonserviert und für eine Dauer von 48h bei -80°C aufbewahrt. Anschließend wurden die Zellen gemäß dem hierin und insbesondere in den vorhergehenden Beispielen beschriebenen Verfahren aufgetaut. Nach dem Auftauen wurden aus drei zufällig ausgewählten wells die Anzahl an infektiösen Adenoviren in 10µl Überstand (Duplikat) 48 Stunden nach Auftauen bestimmt (Fig. 8, 48h QSTEP Überstand). Durch die vorstehend beschriebene Standardprozedur lässt sich die Anzahl infektiöser Viren um

den Faktor 100 verringern, eine absolute Virusfreiheit in dem Sinn, dass keine Viren mehr nachweisbar sind, ist allerdings noch nicht erreicht (Tabelle 2b).

FFU 48h nach Auftauen / well

Tabelle 2b	Well	FFU/well	Mittelwert Titer
Nach 4h:	Well 1	6 und 6	3.5×10^2
Nach 4h:	Well 6	1 und 3	1.5×10^2
Nach 4h:	Well 12	11 und 5	8.0×10^2

c) Einfrieren nach der optimierten Prozedur und FFU recovery aus den eingefrorenen Zellen.

1×10^6 Zellen auf einer 10cm Zellkulturschale werden vor dem Trypsinieren 3 x mit mindestens 0,1 Volumen Kulturmedium, vorzugsweise 0,5 Volumen und besonders vorzugsweise größer 1Volumen (10 ml) Waschpuffer gewaschen, sowie nach der Trypsinbehandlung erneut 2 x mit mindestens 0,1 Volumen Kulturmedium, vorzugsweise 0,5 Volumen und besonders vorzugsweise größer 1Volumen (10ml) Waschpuffer gewaschen (optimierte Prozedur). Als Waschpuffer eignen sich phosphate buffered solution (PBS), hanks buffered salt solution (HBSS) oder vergleichbare Waschlösungen. Jeder Waschriff beinhaltet hier eine Resuspension der Zellen durch mindestens 5 x Auf- und Abpipetieren des halben Waschvolumens und eine erneute Zentrifugation im Waschgefäß bei 800 x g, 5 min und RT.

Das Einfrieren der Zellen erfolgt gemäß dem hierin und insbesondere in den vorhergehenden Beispielen beschriebenen Einfrierverfahren auf 96-well Platten. Die cryokonservierten Zellen werden für eine Dauer von 48h bei -80°C aufbewahrt und gemäß dem hierin und insbesondere in den vorhergehenden Beispielen beschriebenen Verfahren aufgetaut. Nach dem Auftauen werden aus drei zufällig ausgewählten wells die Anzahl an infektiösen Adenoviren in 10 μl Überstand (Duplikat) 96 Stunden nach Auftauen bestimmt (Fig. 8, 96h QSTEP Überstand plus). Die dabei erhaltenen Werte für die Anzahl der FFU/well 96 h nach Auftauen sind mit den Werten 48 h nach Auftauen identisch (Daten nicht gezeigt). Die Anzahl an FFU/well steigt mit der Zeit an und erreicht nach 96 h ein Maximum (Ergebnisse hier nicht gezeigt).

Der Versuch wurde ein zweites Mal wiederholt (Biologisches Replikat 2) Durch die optimierte Waschprozedur lässt eine absolute Virusfreiheit im Überstand erreichen (Tabelle 2c,d).

FFU 96h nach Auftauen / well (Biologisches Replikat 1)

Tabelle 2c	Well	FFU/well	Mittelwert Titer
Nach 4h:	Well 1	0 und 0	-
Nach 4h:	Well 6	0 und 0	-
Nach 4h:	Well 12	1 und 0	0.5×10^2

FFU 96h nach Auftauen / well (Biologisches Replikat 2)

Tabelle 2d	Well	FFU/well	Titer
Nach 4h:	Well 1	0 und 0	-
Nach 4h:	Well 6	0 und 0	-
Nach 4h:	Well 12	0 und 0	-

Mit dem vorstehend beschriebenen Verfahren wird ein Kopierschutz und eine erhöhte biologische Sicherheit dadurch erreicht, dass nach dem Auftauen der Zellen keine Viren in dem Einfriermedium enthalten sind, sondern die virale Nukleinsäure in den aufgetauten Zellen bei Verwendung von adenoviralen Vektoren in einer Form vorliegt, die eine Entstehung viraler Partikel nur bei Vorliegen der spezifischen molekularen Rahmenbedingungen erlaubt.

Beispiel 7: Verfahren zur Erzeugung, Einfrieren und Lagerung von rekombinanten Zellen enthaltend heterologe Nukleinsäuren, welche eine Verringerung der Zellvitalität und/oder Proliferation oder einen toxischen oder induzierbar-toxischen Phänotyp aufweisen

Das hierin beschriebene Verfahren zur Herstellung und Lagerung von rekombinanten Zellen kann zur Herstellung jeglicher rekombinanter Zellen verwendet werden, insbesondere wenn diese eine heterologe Nukleinsäure enthalten. Das Einbringen bestimmter heterologer Nukleinsäuren, insbesondere solcher, welche Zellzyklus-regulierenden Gene, Gene aus dem Bereich der Apoptose, Gene, die die Adhäsionsfähigkeit von Zellen beeinflussen, essentielle Gene des Stoffwechsels, und Gene, welche allgemein die Zellvitalität und Proliferation beeinflussen, kann eine Verringerung der Zellvitalität nach dem Auftauen der Zellen zur Folge haben. Ein Beispiel für ein solches Gen und dessen Auswirkungen auf die Zellvitalität und Proliferation ist im vorliegenden Beispiel für den Knockdown des Gens pRb in HCT116 Zellen gezeigt und die Ergebnisse sind in den Figs. 9a, 9b, 9c und 9d dargestellt.

5×10^4 HCT116 Zellen wurden mit 12 infektiösen Adenoviren (AdshpRb), welche eine shRNA unter Kontrolle des U6 Promoters exprimieren, die einen Knockdown des Proteins pRb induziert pro Zelle eine Dauer von 6 h transduziert und die Zellen gemäß dem hierin beschriebenen Verfahren für die Dauer von 48 Stunden auf 24-well Platten eingefroren und im Anschluss daran gemäß dem hierin beschriebenen Verfahren aufgetaut und die Anzahl an Zellen während der nächsten drei Tage in Kultur mittels einem Haemozytometer bestimmt. Das Ergebnis ist in Fig. 9a dargestellt.

In einem zweiten Versuch wurden die Zellen für eine Dauer von 24 Stunden mit der gleichen Menge Virus transduziert und im Anschluss daran gemäß dem hierin beschriebenen Verfahren für die Dauer von 48 Stunden auf 24-well Platten eingefroren und im Anschluss daran gemäß dem in diesem Patent beschriebenen Verfahren aufgetaut und die Anzahl an Zellen während der nächsten drei Tage in Kultur mittels einem Haemozytometer bestimmt. Das Ergebnis ist in Fig. 9b dargestellt.

Für den Fall einer kurzzeitigen Dauer der Virusinfektion, welche so zu wählen ist, dass eine genügend große Anzahl an Viren in die Zelle gelangen, dies ist typischerweise nach einer Expositionszeit von 1-16 Stunden der Fall, jedoch die heterologe Nukleinsäure noch nicht seine zelluläre Wirkung entfaltet hat, dies ist für Promoter-basierten Konstrukte frühestens nach 1h, typischerweise bereits nach 6 Stunden, und sicher nach 12 Stunden der Fall, wurde eine Erhaltung der Zellvitalität nach dem Auftauen der Zellen beobachtet und der Phänotyp, hier eine Verlangsamung der Zellproliferation bei Zellen, welche mit einem Adenovirus, der eine shRNA gegen pRb exprimiert (Knockdown von pRb mittels AdshpRb), nicht aber bei nicht-transduzierten Zellen und Zellen, welche mit einem Kontrollvirus (AdshU6) transduziert wurden, festgestellt (Fig. 9a).

Die Zellen, welche mit AdshpRB transduziert wurden, wuchsen nach 48h bzw. 72h hochsignifikant ($p < 0.01$, T-test) langsamer als die nicht-transduzierten Zellen, bzw. Zellen, welche mit AdshU6 transduziert wurden (Fig. 9a, gekennzeichnet mit **).

Der Knockdown des Proteins pRb in Zellen, welche mit AdshpRB transduziert waren, war 24h nach Auftauen im Western Blot vollständig, wie in Fig. 9c dargestellt. Das Kontrollvirus ist ein Adenovirus, das nur den U6 Promoter in der E1 Region enthält und keine shRNA exprimiert.

Wurde der Knockdown von pRb in den HCT116 Zellen vor dem Einfrieren der Zellen durch Transduktion der Zellen mit 12 infektiösen Partikeln AdshpRb (MOI12) für eine Dauer von 24 Stunden vorgenommen, so konnten diese Zellen den Einfrier- und Auftauprozess nicht überleben, wie in Fig. 9b dargestellt. Diese Zellen wiesen zum Zeitpunkt des Einfrierens im Western Blot einen vollständigen Knockdown von pRb auf, wie in Fig. 9d dargestellt. Dieses Ergebnis wurde auch für A549 Zellen beobachtet. Zellen, welche für 24 Stunden mit den gleichen Mengen Kontrollvirus (MOI 12) (AdshU6) transduziert wurden, zeigten hingegen keine Veränderung hinsichtlich ihrer Vitalität und Proliferation, verglichen mit den untransduzierten Zellen, wie in Fig. 9b dargestellt. Zellen, welche mit AdshU6 transduziert waren, zeigten keine Veränderung in der Proteinmenge im Western Blot von pRB, verglichen mit den Kontrollzellen (Daten nicht gezeigt).

Das vorliegende Beispiel belegt somit, dass der Einfrierprozess für diese (mit AdshpRb transduziert) modifizierte Zellen und somit allgemein für rekombinante Zellen, die eine heterologe Nukleinsäure enthalten, die zu einer Veränderung, typischerweise Verringerung der Zellvitalität und/oder der Zellproliferation führt, einen zusätzlichen Stress darstellt, so dass diese Zellen den Einfrierprozess nicht überleben (Fig. 9b). Dies impliziert, dass Modifikationen, welche toxisch für die Zelle sind, entscheidend sind für die Fähigkeit der modifizierten Zellen eingefroren zu werden. Friert man hingegen die modifizierte Zelle in solchen Fällen, wie in diesem Beispiel gezeigt, ein, bevor sich die biologische Wirkung der Modifikation manifestiert, so kann eine derartig veränderte Zelle unter Beibehaltung der Vitalität eingefroren und wieder aufgetaut werden.

Die in der vorangehenden Beschreibung, den Ansprüchen und den Zeichnungen offenbarten Merkmale der Erfindung können sowohl einzeln als auch in beliebiger Kombination zur Verwirklichung der Erfindung in ihren verschiedenen Ausführungsformen wesentlich sein.

Ansprüche

1. Verfahren zum Einfrieren und Lagern von Zellen in einem Gefäß umfassend die Schritte
 - a) Einfrieren der Zellen als Zellsuspension auf eine Lagertemperatur und
 - b) Lagern bei dieser Temperatur,

wobei das Lagern der Zellen in dem Gefäß unter gasdichtem Abschluss oder in einer inerten Atmosphäre erfolgt,

dadurch gekennzeichnet, dass die Zellen rekombinante Zellen sind.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die rekombinanten Zellen eine heterologe Nukleinsäure enthalten.

3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass die heterologe Nukleinsäure die Vitalität und/oder die Proliferation der Zellen verringert.

4. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Vitalität und/oder Proliferation der Zellen nach dem Auftauen der Zellen durch die heterologe Nukleinsäure verringert wird.

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 3 oder 4, dadurch gekennzeichnet, dass die heterologe Nukleinsäure ein oder mehrere Gene oder die Transkriptionsprodukte oder Translationsprodukte davon beeinflusst, bevorzugt inhibiert oder abbaut, wobei das Gen ausgewählt ist aus der Gruppe umfassend Gene, die die Apoptose, Nekrose oder Seneszenz betreffen, vermitteln oder steuern; Gene, die die Adhäsionsfähigkeit der Zellen betreffen, vermitteln oder steuern; Gene, die essentielle Gene des Stoffwechsels sind; Gene, die die Zellstabilität und Zellproliferation betreffen, vermitteln oder steuern; Gene, deren Derogulation Apoptose, Seneszenz oder Nekrose einer rekombinanten Zelle induzieren können; und Gene, die essentiell für die Zellteilung sind.

6. Verfahren nach einem der Ansprüche 2 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass die heterologe Nukleinsäure vor dem Einfrieren nicht zur Expression gebracht wird.

7. Verfahren nach einem der Ansprüche 2 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass die heterologe Nukleinsäure nach dem Auftauen der Zellen zur Expression gebracht wird.
8. Verfahren nach einem der Ansprüche 2 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass die heterologe Nukleinsäure unter der Kontrolle eines induzierbaren Promotors steht.
9. Verfahren nach einem der Ansprüche 2 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass die heterologe Nukleinsäure so vor dem Einfrieren der Zellen in die Zelle eingebracht wird, dass die heterologe Nukleinsäure vor dem Einfrieren nicht mehr zur Expression gebracht werden kann.
10. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass die heterologe Nukleinsäure durch einen viralen Vektor in die Zelle eingebracht wird und bevorzugterweise der virale Vektor vor dem Einfrieren der Zellen in der Zelle nicht transkribiert oder repliziert wird.
11. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass der virale Vektor in der Zelle transkribiert oder repliziert wird in einem Umfang, so dass keine durch die heterologe Nukleinsäure bedingte Veränderung der Zellaktivität und/oder Zellproliferation vor dem Einfrieren der Zellen auftritt.
12. Verfahren nach einem der Ansprüche 2 bis 11, dadurch gekennzeichnet, dass die heterologe Nukleinsäure für ein heterologes Molekül codiert, wobei das heterologe Molekül bevorzugterweise ausgewählt ist aus der Gruppe, die Antisense-Moleküle, RNAi-vermittelnde Moleküle, Aptamere, Anticaline, Peptid-Aptamere und Antikörper umfasst.
13. Verfahren nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, dass das heterologe Molekül mit einem oder mehreren zellulären Molekülen in Wechselwirkung tritt.
14. Verfahren nach einem der Ansprüche 12 bis 13, dadurch gekennzeichnet, dass das heterologe Molekül einen Knock-Down eines oder mehrerer zellulärer Moleküle bedingt, bevorzugterweise nach Expression der heterologen Nukleinsäure.
15. Verfahren nach Anspruch 13 oder 14, dadurch gekennzeichnet, dass das zelluläre Molekül ein Molekül ist, das ausgewählt ist aus der Gruppe umfassend Moleküle, die die Apoptose der Zelle betreffen, vermitteln oder steuern; Moleküle, die die Adhäsionsfähigkeit der Zellen

betreffen, vermitteln oder steuern; essentielle Moleküle des Stoffwechsels, Moleküle, die die Zellaktivität und/oder Zellproliferation betreffen, vermitteln oder steuern.

16. Verfahren nach einem der Ansprüche 12 bis 13, dadurch gekennzeichnet, dass das heterologe Molekül ein RNAi-vermittelndes Molekül ist, wobei bevorzugterweise das RNAi-vermittelnde Molekül ausgewählt ist aus der Gruppe, die shRNAi, siRNAs, esiRNAs und miRNAs umfasst.

17. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 16, dadurch gekennzeichnet, dass die inerte Atmosphäre bedingt wird durch Verringerung des Sauerstoffpartialdruckes oder durch Begasung mit einem Schutzgas.

18. Verfahren nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, dass die Verringerung des Sauerstoffpartialdruckes vor dem Einfrieren der Zellen erfolgt.

19. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass die Zellen in mehreren Gefäßen enthalten sind.

20. Verfahren nach Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, dass das Gefäß ausgewählt ist aus der Gruppe, die Multiwellplatten, Zellkulturschalen und Zellkulturflaschen umfasst.

21. Verfahren nach Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, dass die Multiwellplatte ausgewählt ist aus der Gruppe, die 6-Well-Platten, 12-Well-Platten, 24-Well-Platten, 48-Well-Platten, 96-Well-Platten, 384-Well-Platten und 1536-Well-Platten umfasst.

22. Verfahren nach einem der Ansprüche 18 bis 21, dadurch gekennzeichnet, dass der Sauerstoffpartialdruck in dem Gefäß auf etwa 52,5 mbar bis 0,21 mbar, bevorzugterweise auf etwa 26 mbar bis 0,21 mbar, bevorzugterweise auf etwa 13 mbar bis 0,21 mbar vermindert wird.

23. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 22, dadurch gekennzeichnet, dass der gasdichte Abschluss durch Einschweißen des Gefäßes in einem gasdichten Folienschlauch oder durch Aufbringen einer gasdichten Klebefolie erfolgt.

24. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 23, dadurch gekennzeichnet, dass nach gasdichtem Abschluss des Gefäßes ein Restvolumen an Luft in dem Gefäß verbleibt.
25. Verfahren nach Anspruch 24, dadurch gekennzeichnet, dass das Restvolumen bis zu dem 17,5-fachen, bevorzugterweise bis zu dem 15-fachen, bevorzugterweise bis zu dem 7-fachen und am bevorzugtesten gleich dem Volumen der Zellsuspension in dem Gefäß beträgt.
26. Verfahren nach einem der Ansprüche 17 bis 25 ist, dadurch gekennzeichnet, dass das Schutzgas ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Stickstoff, Helium, Neon, Argon, Krypton und Xenon.
27. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 26, dadurch gekennzeichnet, dass die Zellen eukaryotische Zellen, bevorzugterweise tierische Zellen und bevorzugterweise humane Zellen, insbesondere isolierte humane Zellen sind.
28. Verfahren nach Anspruch 27, dadurch gekennzeichnet, dass die Zellen ausgewählt sind aus der Gruppe umfassend Hela S3 (ATCC-Nr.:CCL-2.2); LoVo (ATCC-Nr.: CCL-229); L929 (ATCC-Nr.:CCL-1), HT-29 (ATCC-Nr.: HTB-38); Caco-2 (ATCC-Nr.: HTB-37); Hep G2 (ATCC-Nr.:HTB-8085); IMR-90 (ATCC-Nr.:CCL-184); PANC-1 (ATCC-Nr.:CRL-1469); DLD-1 (ATCC-Nr.:CCL-221); HCT-15 (ATCC-Nr.:CCL-225); Capan-1 (ATCC-Nr.:HTB-79); BxPC-3 (ATCC-Nr.:CRL-1687); MCF7 (ATCC-Nr.:HTB-22); SW480 (ATCC-Nr.:CCL-228); U-138 MG (ATCC-Nr.:HTB-16); HCT116 (ATCC-Nr.: CCL-247); und A549 (ATCC-Nr.: CCL-185).
29. Verfahren nach einem der Ansprüche 2 bis 28, dadurch gekennzeichnet, dass die heterologe Nukleinsäure durch einen oder mehrere Vektoren in die Zellen eingeführt ist, wobei die Vektoren bevorzugt aus der Gruppe ausgewählt sind umfassend DNA-basierte Plasmidvektoren, rekombinante Replikations-defiziente Adenoviren, Adeno-assoziierte Viren, Bacculoviren, Sendaviren, Herpes simplex Typ 1 Viren, Lentiviren und Retroviren.
30. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 29, dadurch gekennzeichnet, dass das Lagern bei einer Temperatur zwischen etwa -105°C und -50°C erfolgt, bevorzugterweise zwischen -65°C und -95°C und bevorzugterweise zwischen etwa -75°C und -85°C .

31. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 30, dadurch gekennzeichnet, dass das Einfrieren durch Kontakt wenigstens einer Fläche des Gefäßes mit einem Material mit geeigneter Wärmeleitfähigkeit erreicht wird, wobei das Material auf eine geeignete Temperatur vorgekühlt ist.
32. Verfahren nach Anspruch 31, dadurch gekennzeichnet, dass das Material ein Metall ist.
33. Verfahren nach Anspruch 31 oder 32, dadurch gekennzeichnet, dass die Temperatur, auf die das Material vorgekühlt ist, etwa zwischen -90°C und -50°C und bevorzugterweise zwischen etwa -85°C und -65°C beträgt.
34. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 33, dadurch gekennzeichnet, dass die Zellen ohne Verwendung von flüssigem Stickstoff gelagert werden.
35. Verfahren nach einem der Ansprüche 2 bis 34, dadurch gekennzeichnet, dass die rekombinanten Zellen erhältlich sind durch die folgenden Schritte:
- i) Einführen der heterologen Nukleinsäure und
 - ii) optionales Herbeiführen des Knock-Downs.
36. Verfahren nach Anspruch 25, dadurch gekennzeichnet, dass das Verfahren weiter die Schritte umfasst:
- iii) Überführen der Zellen in ein Einfriermedium und optional
 - iv) Überführen der Zellen in ein Gefäß wie in einem der vorhergehenden Ansprüche definiert
37. Verfahren nach Anspruch 35 dadurch gekennzeichnet, dass das Einführen der heterologen Nukleinsäure und/oder das Herbeiführen des Knock-Downs in Kulturmedium erfolgt und die Zellen direkt in Kulturmedium eingefroren werden.
38. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 37, dadurch gekennzeichnet, dass die Zellen eine Vielzahl von Zellen umfassen und sich die Zellen in der Art der eingeführten heterologen Nukleinsäure unterscheiden.

39. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 38, dadurch gekennzeichnet, dass die Zellen eine Vielzahl von Zellen umfassen und sich die Zellen in der Art des Knock-Downs unterscheiden.
40. Eingefrorene Zellen, herstellbar oder erhältlich nach einem Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 39, dadurch gekennzeichnet, dass durch die heterologe Nukleinsäure eine transiente Veränderung der Zellen erfolgt ist, wobei die transiente Veränderung der Zellen unter Beibehaltung der Zellvitalität stabilisiert ist.
41. Eingefrorene Zellen, herstellbar oder erhältlich nach einem Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 39, dadurch gekennzeichnet, dass durch die heterologe Nukleinsäure eine stabile Veränderung der Zellen erfolgt ist, wobei die stabile Veränderung der Zellen unter Beibehaltung der Zellvitalität erfolgt ist.
42. Eingefrorene Zellen nach Anspruch 40 oder 41, dadurch gekennzeichnet, dass die Zellvitalität für einen längeren Zeitraum, insbesondere bei Lagerung in einem Tiefkühlschrank, gegeben ist.
43. Eingefrorene Zellen nach einem der Ansprüche 40 bis 42, dadurch gekennzeichnet, dass die Zellen eine heterologe Nukleinsäure enthalten, die durch einen viralen Vektor in die Zelle eingebracht ist, und die Zellen in einem Medium eingefroren sind, wobei das Medium keinen nachweisbaren durch den viralen Vektor ausgebildeten Virus enthält, wobei der Virus bevorzugterweise ein adenoviraler Virus ist.
44. Zellbibliothek umfassend eingefrorene Zellen nach Anspruch 40 bis 42, dadurch gekennzeichnet, dass die Zellbibliothek aus einer Vielzahl von Zellpopulationen besteht, wobei eine jede Zellpopulationen der Zellbibliothek mit einer Art oder Spezies einer heterologen Nukleinsäure transfiziert, oder mit einem DNA-Vektor, der zumindest eine Art oder Spezies einer heterologen Nukleinsäure exprimiert, transduziert oder infiziert ist, wobei die heterologe Nukleinsäure verschieden ist von einer oder mehreren heterologen Nukleinsäuren, mit denen eine, mehrere, oder alle anderen Zellpopulationen der Zellbibliothek transfiziert, transduziert oder infiziert ist.

45. Verwendung von eingefrorenen Zellen nach Anspruch 40 oder 42 oder einer Zellbibliothek nach Anspruch 43 in einem zellbasierten Testsystem, bevorzugterweise in einem Hochdurchsatzscreening (HTS).

46. Verwendung von eingefrorenen Zellen nach Anspruch 40 oder 42 oder einer Zellbibliothek nach Anspruch 43, wobei die Zellen direkt nach dem Auftauen in Einfriermedium in dem Gefäß ohne Passagieren verwendet werden, insbesondere in einem zellbasierten Testsystem verwendet werden.

Fig. 1

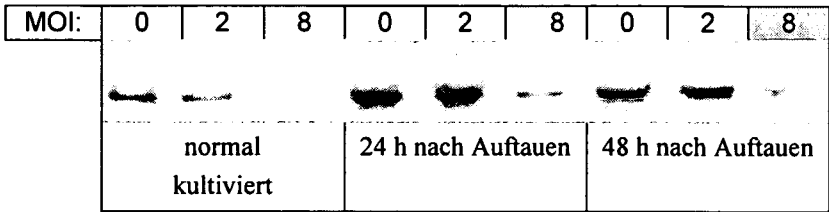
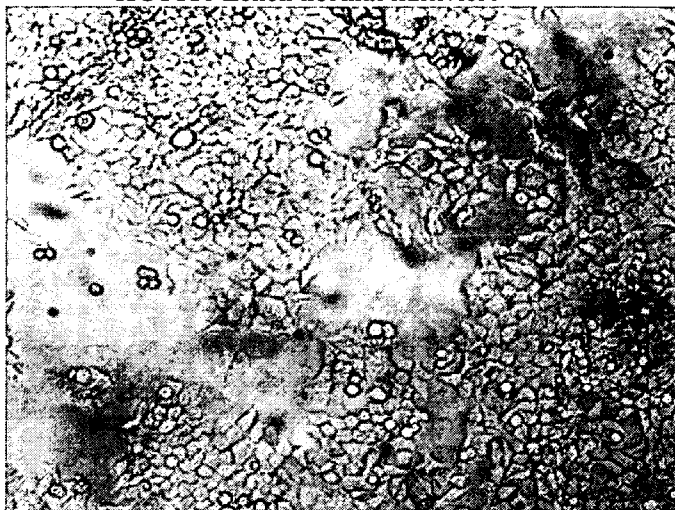


Fig. 2

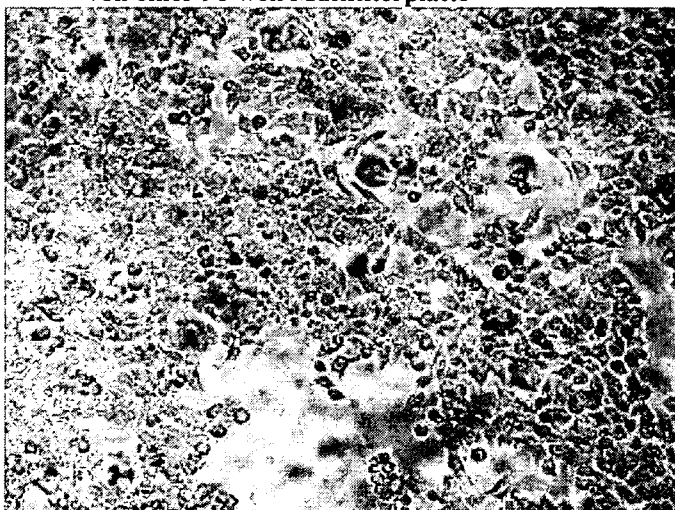
A

HCT116 Zellen normal kultiviert



B

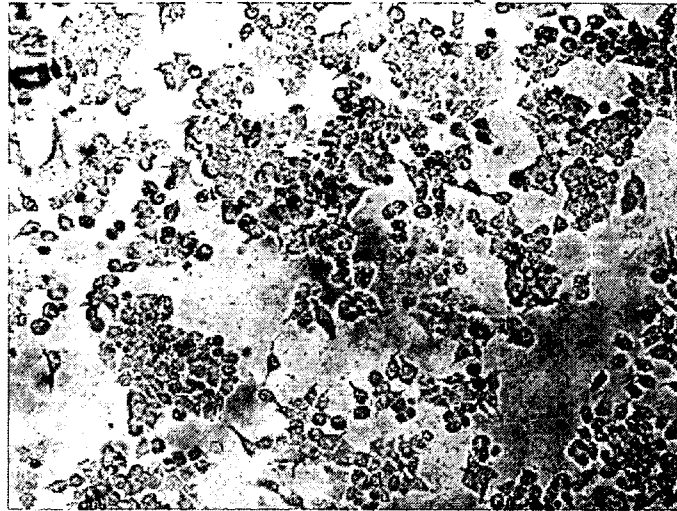
**HCT116 Zellen nach 24h nach Auftauen
von einer 96-well Multititerplatte**



3/11

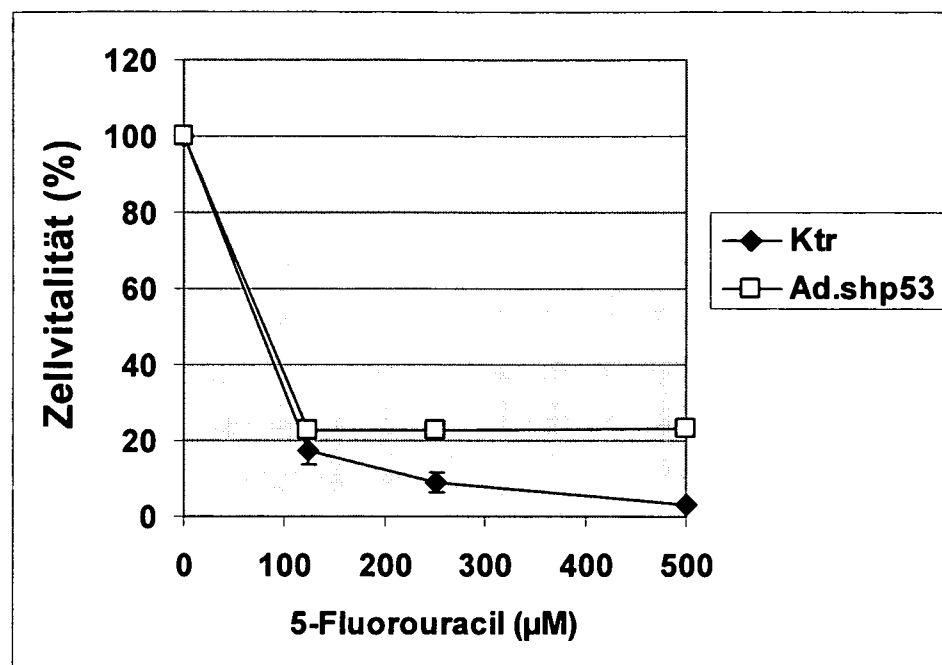
Mit Ad.shRNA.p53 infizierte HCT116 Zellen 24h nach Auftauen
von einer 96-well Multititerplatte

C



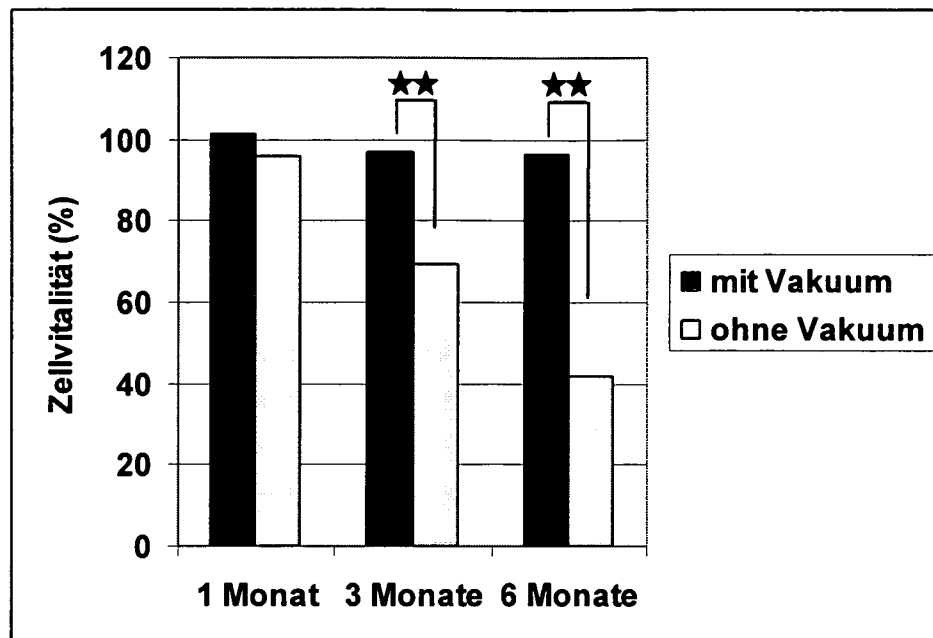
4/11

Fig. 3



5/11

Fig. 4



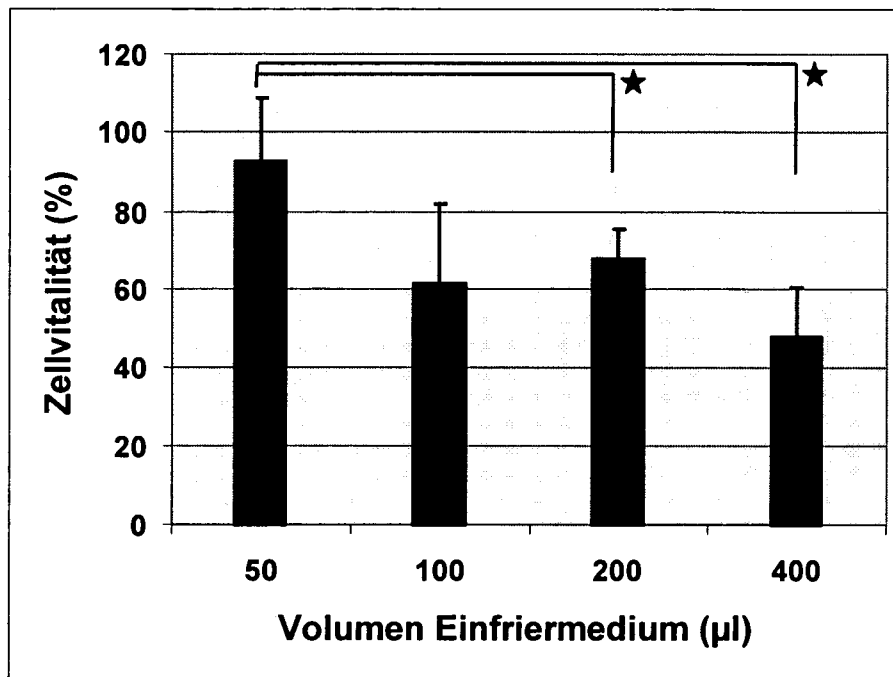
★ = Student's t-Test, P-Wert < 0,05

★★ = Student's t-Test, P-Wert < 0,005

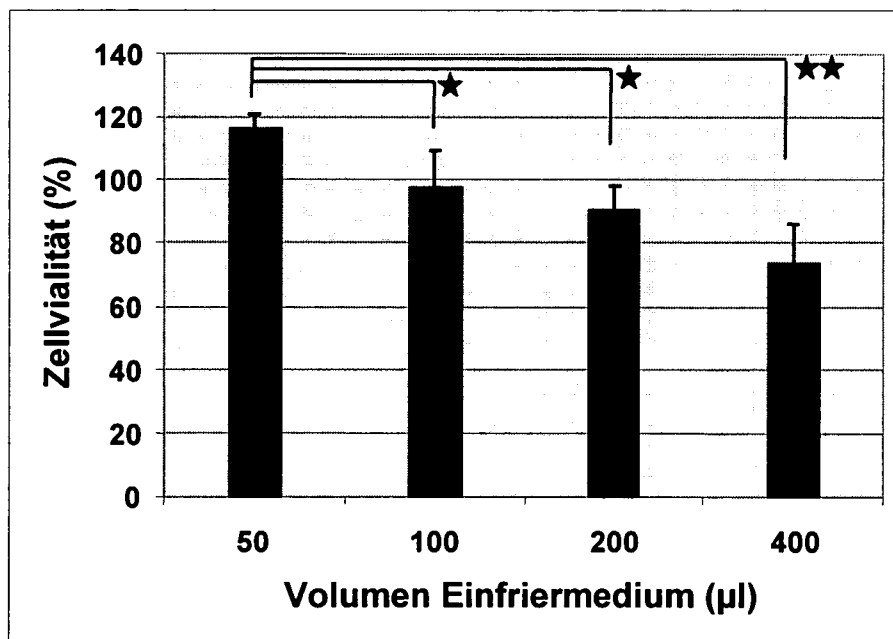
6/11

Fig. 5

Zelllinie: HCT116



Zelllinie: A549



★ = Student's t-Test, P-Wert < 0,05
★★ = Student's t-Test, P-Wert < 0,005

7/11

Fig. 6

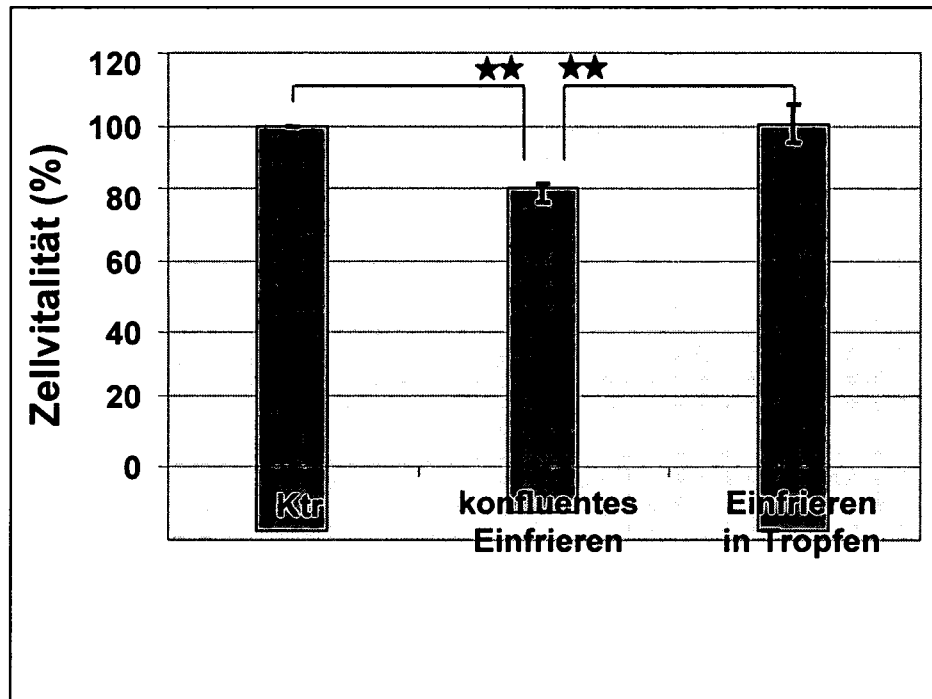
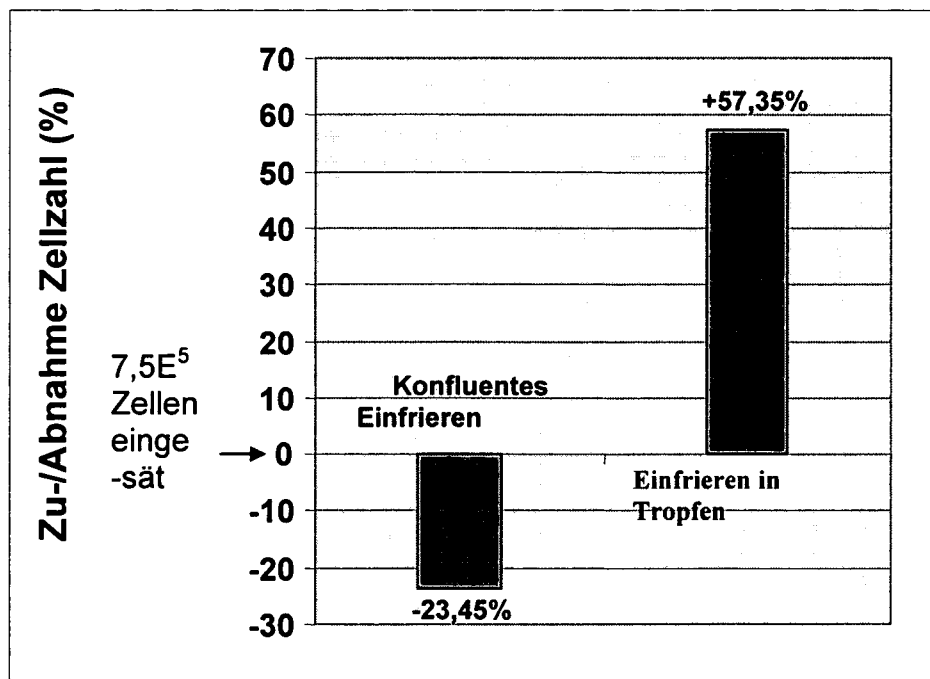
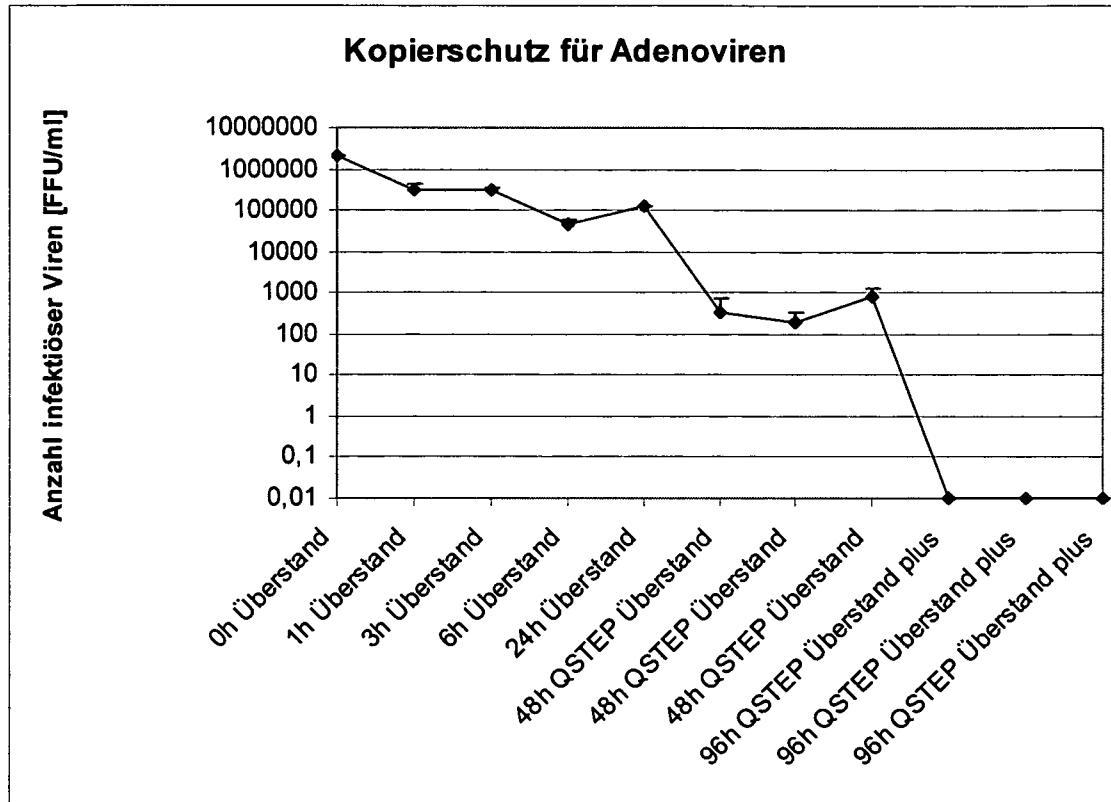


Fig. 7

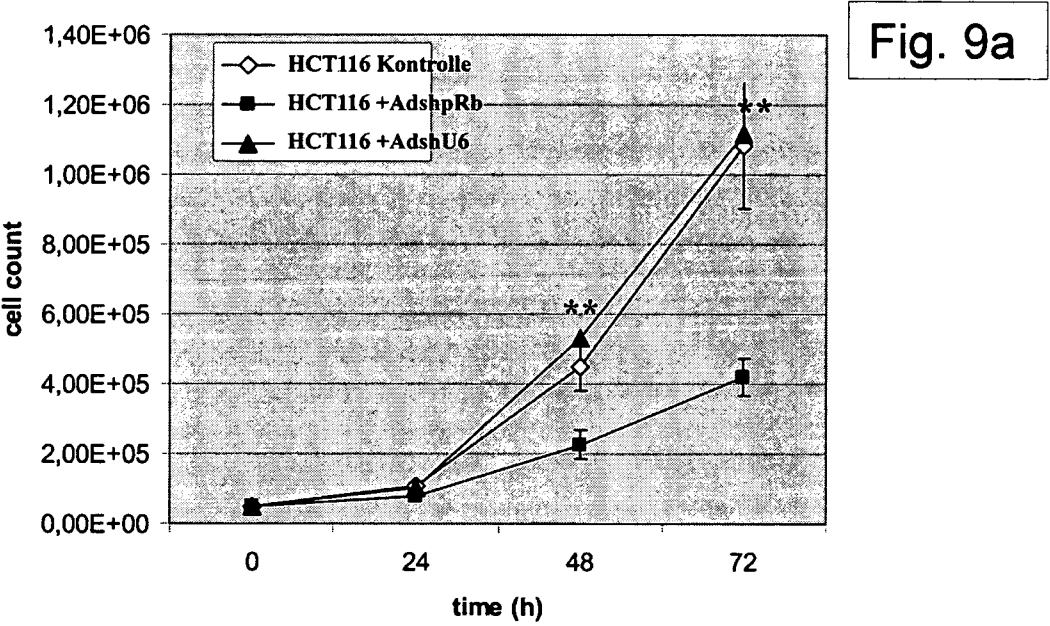


8/11

Fig.8



9/11



10/11

