

Aus der Klinik für Hämatologie und Onkologie
Medizinische Fakultät
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

**YB-1 führt in Myeloproliferativen Neoplasien zur
Therapieresistenz gegenüber JAK-Inhibitoren**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
Dr. med.
(doctor medicinae)
an der medizinischen Fakultät
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

vorgelegt von Carolin Herzog
Magdeburg, 2022

Dokumentation

Bibliographische Beschreibung

Herzog, Carolin: YB-1 führt in Myeloproliferativen Neoplasien zur Therapieresistenz gegenüber JAK-Inhibitoren 2022,

65 Seiten, 20 Tabellen, 18 Abbildungen, 314 Literaturzitate, 0 Anlagen

Klinik für Hämatologie und Onkologie

Medizinische Fakultät

Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

Kurzreferat

Myeloproliferative Neoplasien (MPN) stellen eine Gruppe von Erkrankungen dar, welche durch die klonale Expansion von myeloiden Zellen gekennzeichnet sind und durch verschiedene Mutationen ausgelöst werden können, von denen die Punktmutation im Exon 14 der Januskinase-2 (JAK2) JAK2V617F am häufigsten vertreten ist. Vor allem in fortgeschrittenen Stadien imponieren sie außerdem durch Zeichen einer systemischen Entzündung. Die Familie der Kälteschockproteine nimmt eine bedeutende Rolle in der Vermittlung von Entzündungsreaktionen ein. Einen typischen Vertreter dieser Familie stellt das Y-box-binding protein 1 (YB-1) dar. Es ist außerdem in verschiedenen Tumorentitäten überexprimiert und mit einer Verschlechterung der Prognose assoziiert. In der vorliegenden Arbeit konnten wir zeigen, dass YB-1 eine verstärkte Expression in primären Zellen erkrankter MPN-Patienten zeigt. Der shRNA-medierte *Knock-down* von YB-1 in humanen und murinen mutierten Zellen resultierte in einer erhöhten Neigung zu Apoptose, insbesondere bei zusätzlicher Inhibition des onkogenen Signalwegs durch den JAK1/2-Inhibitor Ruxolitinib. In einem murinen Xenotransplantationsmodell konnten diese Ergebnisse reproduziert werden. Außerdem konnte unter Behandlung mutierter Zellen mit Ruxolitinib eine Reduktion der Phosphorylierung von YB-1 erzielt werden, sodass eine Einbindung von YB-1 in die JAK2 nachgeschalteten Signalwege nahe lag. Die hier vorgestellten Daten zeigen, dass die Überexpression von YB-1 in transformierten Zellen diese vor dem apoptotischen Zelltod schützt und es somit ein neues therapeutisches Angriffsziel darstellen könnte.

Schlüsselwörter

YB-1, Myeloproliferative Neoplasien, JAK2V617F, Ruxolitinib

Inhaltsverzeichnis

Dokumentation	II
Bibliographische Beschreibung.....	II
Kurzreferat	II
Schlüsselwörter.....	II
Inhaltsverzeichnis	IV
Abkürzungen	VIII
1. Einleitung	1
1.1. Myeloproliferative Neoplasien (MPN).....	1
1.1.1. MPN kennzeichnen sich durch die Vermehrung myeloider Zellen im Knochenmark	1
1.1.2. Somatische Mutationen auf Stammzelebene und die genetische Prädisposition bestimmen über die Ausprägung der MPN	5
1.1.3. Die pathophysiologische Grundlage der MPN sind Veränderungen der Knochenmarksnische und ein inflammatorisches Syndrom.....	8
1.1.4. Die einzige kurative Therapieoption ist die allogene Stammzelltransplantation. JAK-Inhibitoren führen zur Symptomkontrolle, jedoch nicht zur molekularen Remission.....	11
1.2. Kälteschockproteine	15
1.2.1. YB-1 bindet an Nukleinsäuren und beeinflusst zahlreiche zelluläre Abläufe.....	15
1.2.2. YB-1 fördert die Onkogenese in neoplastischen Erkrankungen.....	19
1.3. Zielstellung	20
2. Material und Methoden	21
2.1. Organismen.....	21
2.1.1. Zelllinien	21
2.1.2. NSGS-Mäuse	21
2.2. Patienten und Probanden	21
2.2.1. Materialgewinnung	21
2.2.2. Auswahl des Probandenkollektivs	21
2.3. Plasmide	22
2.4. Small hairpin RNA	22
2.5. Primer.....	22
2.6. Reagenzien, Chemikalien, Kits und Assays.....	23
2.7. Antikörper	24
2.7.1. Fluorochromgekoppelte Antikörper.....	24
2.7.2. Primäre ungekoppelte Antikörper	24
2.8. Geräte	25
2.9. Materialien und Hilfsmittel	26
2.10. Puffer, Lösungen, Gele und Medien.....	26
2.11. Arbeitstechniken	30

2.11.1. Zellkultur	30
2.11.1.1. Kultivierung	30
2.11.1.2. Kryokonservierung	30
2.11.1.3. Retrovirale & Lentivirale Transfektion	30
2.11.1.4. Infektion von Suspensionszellen mit viralen Partikeln	31
2.11.2. Bakterienkultur	31
2.11.2.1. Transformation von Plasmiden.....	31
2.11.2.2. Animpfen von Bakterienkolonien.....	31
2.11.2.3. Kryokonservierung in Glycerol	31
2.11.3. Molekularbiologische Arbeitstechniken.....	32
2.11.3.1. Präparation der mRNA.....	32
2.11.3.2. cDNA-Synthese.....	32
2.11.3.3. qPCR.....	33
2.11.3.4. Bestimmung der JAK2V617F-Allellast mittels qPCR	34
2.11.4. Durchflusszytometrie	34
2.11.4.1. Färbung mit Annexin V und SytoxTM.....	34
2.11.5. Proteinbiochemie	34
2.11.5.1. Gewinnung der Proteinlysate	34
2.11.5.2. Messung der Proteinkonzentration	34
2.11.5.3. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	34
2.11.5.4. Western Blot.....	35
2.11.5.5. Immunodetektion.....	35
2.11.6. Primäres Zellmaterial.....	35
2.11.6.1. Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation	35
2.11.7. Xenotransplantation.....	35
2.11.8. Datenauswertung und Statistik	36
3. Ergebnisse	37
3.1. Das Kälteschockprotein YB-1 ist in JAK2-mutierten Zellen verstärkt exprimiert.....	37
3.2. Der Knock-down von YB-1 führt zu verstärkter Apoptose in JAK2-mutierten Zellen ..	41
3.3. Unmutierte hämatopoetische Zellen zeigen eine geringere Apoptoserate nach Knock-down von YB-1 und Behandlung mit Ruxolitinib.....	44
3.4. Im Xenotransplantationsmodell zeigt sich ein Überlebensvorteil unter Therapie mit Ruxolitinib und Knock-down von YB-1	45
3.5. Phosphorylierung und Expression von YB-1 werden durch JAK-Kinasen beeinflusst	47
3.6. Der Knock-down von YB-1 führt in MPL-mutierten Zellen zu verstärkter Apoptose....	50
4. Diskussion.....	53
4.1. Vorbetrachtung.....	53
4.2. Zusammenfassung und kritische Betrachtung	54
4.2.1. Verstärkte Aktivierung und Überexpression von YB-1 in MPN	54

4.2.2. Limitationen des shRNA-medierte Knock-downs und Möglichkeiten der Inhibition von YB-1 in vivo	56
4.2.3. Aus den in vitro-Daten lässt sich nicht auf einen therapeutischen Index einer YB-1-inhibierenden Behandlung schließen	57
4.2.4. Im Xenotransplantationsmodell zeigt sich ein Überlebensvorteil durch die Inhibition von YB-1 bei der Behandlung JAK2V617F-mutierter MPN mit einem JAK-Inhibitor.	57
4.3. Weiterführende Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe	58
4.4. Fazit und Ausblick	61
4.4.1. Wie wird die Expression von YB-1 in JAK2V617F-mutierten Zellen reguliert? ...	61
4.4.2. Welcher Mehrwert lässt sich durch eine Kombinationstherapie von Ruxolitinib mit einem MEK-Inhibitor erwarten?	62
4.4.3. Kann die Kombination von Ruxolitinib mit einem MEK-Inhibitor zur dauerhaften molekularen Remission führen?	63
4.4.4. Welche Effekte einer Kombinationstherapie sind in MPN mit Wildtyp-JAK2 zu erwarten?	64
5. Zusammenfassung	65
Bibliografie	66
Danksagung	84
Lebenslauf	85
Ehrenerklärung	87
Erklärung zur strafrechtlichen Verurteilung.....	88

Abkürzungen

ACC	acceleration
AML	Akute myeloische Leukämie
Amp.	Ampicillin
APC	Allophycocyanin
APS	Ammoniumpersulfat
ASS	Acetylsalicylsäure
Bcl-2	B-Cell Lymphoma 2
BCR-ABL	Fusionsgen durch reziproke Translokation von Chr. 9 und 22
BCS	Budd-Chiari-Syndrom
BET	Bromodomain and extra-terminal domain
BIM	Bcl-2 Interacting Mediator of cell death
bp	Basenpaare
BSA	Bovine Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
Cas	CRISPR-assoziiert
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid
CML	Chronisch myeloische Leukämie
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CRISPR	Clustered, regularly interspaced short palindromic repeats
CT	coefficient of variation
Da	Dalton
DEL	delay
DIPSS	Dynamic International Prognostic Scoring System
DMEM	Dulbecco's modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPBS	Dulbecco's Phosphate buffered Saline
dNTP	Desoxy-Nukleosidtriphosphat
e	Eulersche Zahl
E. coli	Escherischia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EMT	Epithelial-mesenchymale Transition
EpoR	Erythropoietin-Rezeptor
ERK	Extracellular-signal Regulated Kinase

ET	Essentielle Thrombozythämie
et al.	et alii
FACS	Fluorescence-activated cell scan
FDA	Food and Drug Administration
FBS	Fetal Bovine Serum
g	mittlere Erdbeschleunigung
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
Gy	Gray (Energiedosis)
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
HDAC	Histondeacetylase
HEK	Human embryonic kidney
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HIF	Hypoxie-induzierter Faktor
HPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase
HRP	Horseradishperoxidase
HSC	hematopoietic stem cell (hämatopoetische Stammzelle)
HU	Hydroxyurea
IMDM	Iscove's modified Dulbecco's Medium
IPSET	International Prognostic Score for Thrombosis in Essential Thrombocythemia
JAK2	Januskinase 2
KCl	Kaliumchlorid
KHK	Koronare Herzkrankheit
LB-Medium	Lysogeny broth medium
lncRNA	Long non-coding RNA
M	molar (Mol/Liter)
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MDM2	Mouse double minute 2 homolog
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MgSO ₃	Magnesiumsulfat
mg	Milligramm
min	Minute
Mio	Million
Mknk-1	MAPK Interacting Serine/Threonine Kinase 1
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure

miRNA	Micro-RNA
ml	Milliliter
mM	millimolar
MPL	Myeloproliferative Leukemia Virus (TPO-Rezeptor-Gen)
mRNP	Messenger Ribonucleoprotein
MSC	mesenchymale Stammzelle
MSCV	Murine Stem Cell Virus System
mTOR	Mammalian target of Rapamycin
μ l	Mikroliter
μ m	Mikrometer
μ mol	Mikromol
NaCl	Natriumchlorid
NaF	Natriumfluorid
NaOH	Natriumhydroxid
nc-RNA	non-coding RNA
Neo	Neomycin
NH ₄ Cl	Ammoniumchlorid
NH ₄ HCO ₃	Ammoniumbicarbonat
nm	Nanometer
nM	nanomolar
ns	nicht signifikant
NSGS	NOD-scid IL2Rgnull-3/GM/SF, NSG-SGM3
OligodT	15-25bp lange Sequenz aus Desoxythymidinen, welches komplementär zum Poly-A-Schwanz der mRNA ist
p	phosphoryliert
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PE	Phycoerythrin
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PCR	Polymerase Chain Reaction
pH	pondus Hydrogenii
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PMF	Primäre Myelofibrose
Puro	Puromycin
PV	Polycythaemia vera
PVT	Portalvenenthrombose
qPCR	Quantitative Polymerase Chain Reaction
Raf	Rapidly accelerated fibrosarcoma

RE	relative Expression
RNA	Ribonukleinsäure
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
rRNA	Ribosomale RNA
RT	reverse Transkriptase
SDS	Sodium-Dodecyl-Sulfat
shRNA	small hairpin RNA
snoRNA	kleine nukleoläre RNA
STAT5	Signal Transducer and Activator of Transcription 5
SOC	Super Optimal broth with Catabolite repression
TBST	Tris-buffered saline & Tween
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TGF	Transforming growth factor
TIM-3	T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3
TNF	Tumornekrosefaktor
Top10	chemisch kompetenter Escherischia coli-Stamm
tracr-RNA	trans-activating RNA
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	Transfer-RNA
U	Unit ($\mu\text{mol}/\text{min}$)
UICC	Union Internationale Contre le Cancer
UV	Ultraviolettstrahlung
ü.N.	über Nacht
V	Volt
VEGF	Vascular endothelial growth factor
WHO	World Health Organization
WT	Wildtyp
YB-1	Y-box-binding protein 1
<i>Ybx1</i>	kodierendes Gen des Y-box-binding protein 1

Hinweis

In der vorliegenden Arbeit wird zur besseren Lesbarkeit das generische Maskulinum verwendet, Abweichungen sind ggf. explizit erwähnt.

1. Einleitung

1.1. Myeloproliferative Neoplasien (MPN)

1.1.1. MPN kennzeichnen sich durch die Vermehrung myeloider Zellen im Knochenmark

MPN sind eine Gruppe von klonalen Erkrankungen mit gesteigerter Proliferation ausgereifter hämatopoetischer Zellen, insbesondere jedoch von Zellen der myeloiden Reihe, welche bei einem Großteil der betroffenen Patienten auf eine Mutation in den Genen für JAK2, den Thrombopoietin-Rezeptor (c-MPL) oder Calreticulin zurückzuführen sind. Aufgrund ihrer morphologischen Gemeinsamkeiten wurde 1951 durch W. Dameshek erstmalig ein ätiologischer Zusammenhang zwischen verschiedenen myeloiden Erkrankungen hergestellt und der Begriff der myeloproliferativen Neoplasien geprägt [1]. Nach der aktuellen WHO-Klassifikation werden die Philadelphia-Chromosom-positive chronische myeloische Leukämie (CML), die chronische Neutrophilenleukämie, die chronische Eosinophilenleukämie, die Mastozytose, die Essentielle Thrombozythämie (ET), die Polycythaemia vera (PV), die Primäre Myelofibrose (PMF), die prä-PMF und die unklassifizierbaren myeloproliferativen Neoplasien (MPN, U) zu den MPN gezählt [2]. Die PV, ET und PMF stellen dabei die häufigsten der Philadelphia-Chromosom-negativen Vertreter dar. Die Prä-PMF wird in der WHO-Klassifikation seit 2016 als eigene Subentität von der PMF abgegrenzt und geht dieser in einem Teil der Patienten voraus. In einer österreichischen Studie mit 170 Patienten mit einer Prä-PMF wurde das 15-Jahres Risiko der Transition in eine PMF mit 36,9% beschrieben [3]. Mit einer Inzidenz von 0,4-2,8/100.000 pro Jahr für PV, 0,38-1,7/100.000 pro Jahr für ET und 0,1-1/100.000 pro Jahr für PMF stellen sie seltene Erkrankungen dar [4]. Betroffen sind insbesondere Patienten im mittleren bis höheren Alter. In einer US-amerikanischen *Multicenter*-Studie betrug das mediane Erkrankungsalter von MPN-Patienten, welche zwischen 2001-2012 diagnostiziert wurden, 65, 68 bzw. 70 Jahre für die PV, ET bzw. PMF [5]. In allen Fällen kann es initial zu einer Hyperproliferation im Knochenmark kommen, welche im peripheren Blut zu Polyglobulie, Thrombozytose und Leukozytose führt. Mit fortschreitender Erkrankung entwickelt sich jedoch eine zunehmende Fibrosierung des Knochenmarks mit konsekutiver Zytopenie. Zudem besteht im späteren Stadium ein erhöhtes Risiko für die Transformation in eine akute myeloische Leukämie (AML) [6-8]. Bei jeder der genannten Entitäten stehen dabei andere Zellreihen im Vordergrund. Bei der PV besteht meist eine Panmyelose mit führender Erythrozytose, während die ET durch eine isolierte Thrombozytose gekennzeichnet ist. Die Prä-PMF geht ebenfalls mit einer Thrombozytose einher und stellt damit eine prognostisch relevante Differentialdiagnose zur ET dar, welche wahrscheinlich mit einem höheren Risiko für die Entwicklung einer AML, einer Myelofibrose und einer höheren Sterblichkeitsrate einhergeht [9]. Sie kann darüber hinaus ebenso wie die initiale PMF zu einer Leukozytose führen. Aufgrund der bereits frühzeitig eintretenden Kollagen- und Retikulinfaservermehrung bei der PMF, ist diese allerdings vordergründig durch eine Anämie

bei Panzytopenie gekennzeichnet. Im Verlauf lassen sich jedoch unreife Vorstufen im peripheren Blut nachweisen, was zum sogenannten leukoerythroblastischen Blutbild führt. Mitunter fällt eine Differenzierung zwischen den einzelnen Entitäten schwer und Übergänge in eine andere Entität sind möglich. Beispielsweise erfüllen 10-15% der PV-Patienten mit JAK2V617F-Mutation die Diagnosekriterien der PV ohne eine Erythrozytose aufzuweisen. Daher wird dieser Phänotyp auch als maskierte PV (mPV) bezeichnet. Im Vergleich zur PV ist diese Variante jedoch mit einem höheren Fibrose- und Leukämierisiko assoziiert und geht mit einer reduzierten Überlebenszeit einher [10]. Im Fall JAK2V617F-mutierter MPN wird davon ausgegangen, dass die ET, die mPV und die PV ein Kontinuum und keine streng trennbaren Entitäten darstellen. Rumi *et al.* konnten in 466 untersuchten ET-Patienten mit JAK2V617F-Mutation bei 29% einen Übergang zur PV beobachten [11]. Ursächlich dafür ist der Anstieg der JAK2V617F-Allellast im Krankheitsverlauf, welcher zur Zunahme der Erythrozytenmasse und einer sinkenden Thrombozytenzahl beiträgt [12]. Im Mausmodell führte die homozygote Mutation durch einen „*Loss of Heterozygosity*“ zur Induktion eines PV-Phänotyps [13]. Im Einklang damit sind ein Großteil der PV-Patienten homozygote Träger der JAK2V617F-Mutation [12]. Kommt es im fortgeschrittenen Stadium einer PV oder ET zur Knochenmarksfibrose, entsteht schließlich eine Post-PV- bzw. Post-ET-MF. Klinisch kennzeichnen sich die MPN durch eine Reihe konstitutioneller Symptome. Am häufigsten kommt es bei ca. der Hälfte der Patienten zu einer Fatigue. Hinzutreten können Nachtschweiß, Schlafstörungen, Konzentrationsstörungen, Schwindel, Depression und Gewichtsverlust [14]. Neben diesen unspezifischen Krankheitszeichen kommt es darüber hinaus zu Symptomen, welche klassischerweise mit MPN assoziiert sind. Eine Splenomegalie mit konsekutiven abdominellen Beschwerden und Dyspnoe sowie Knochenschmerzen sind gehäuft bei Myelofibrose anzutreffen, während ein aquagener Pruritus typisch für die PV ist [14, 15]. Die quantitativen, aber auch qualitativen Zellveränderungen im Rahmen einer MPN führen bei Patienten zu einer Thrombophilie, welche Mikrozirkulationsstörungen sowie arterielle und venöse Thrombosen verursacht. In einer Studie an 1.063 ET-Patienten, bei denen thrombembolische Ereignisse typische Komplikationen darstellen, konnten Carobbio *et al.* zeigen, dass entgegen der Erwartungen insbesondere niedrige Thrombozytenwerte und das Vorliegen einer Leukozytose sowie einer JAK2V617F-Mutation mit dem höchsten Thromboserisiko einhergehen [16]. Mikrozirkulationsstörungen äußern sich bei PV- und ET-Patienten klassischerweise durch Erythromelalgie, Sehstörungen und Kopfschmerzen. Arterielle Thrombosen treten insbesondere zerebral und koronar auf, während es im venösen System hauptsächlich zu tiefen Beinvenenthrombosen kommt [17]. Eine große, multizentrische Studie an PV-Patienten konnte zeigen, dass 45% der Todesfälle der kardiovaskulären Mortalität insbesondere durch KHK, Herzinsuffizienz, Schlaganfälle und Lungenembolien verursacht sind [18]. Eine schwere Komplikation, die typischerweise mit MPN vergesellschaftet ist, stellen viszerale Venenthrombosen dar, von denen die Portalvenenthrombose am häufigsten vorkommt [19] und bei ca. 70% der

Patienten vor der Diagnosestellung der MPN auftritt [20]. In einer Metaanalyse von Patienten mit einem Budd-Chiari-Syndrom (BCS) oder einer Portalvenenthrombose (PVT) konnte nach Exklusion der Fälle mit Leberzirrhose oder hepatobiliärer Tumorerkrankung in 40% der BCS- bzw. 31% der PVT-Patienten eine MPN festgestellt werden [21]. Seltener als Thrombosen treten Blutungsereignisse bei MPN-Patienten auf. Diese manifestieren sich am häufigsten im Gastrointestinaltrakt, an Haut und Schleimhäuten, urogenital und zerebral. Unter Patienten mit einer ET bzw. einer prä-PMF prädisponieren das Vorliegen einer frühen PMF, vorangegangene Blutungsereignisse, die Einnahme von ASS und eine Leukozytose für das Auftreten von Blutungskomplikationen [22]. Zusätzlich sind MPN-Patienten einem erhöhten Risiko für Infektionen ausgesetzt. Aus einer großen populationsbasierten Kohortenstudie mit über 8.000 Patienten aus dem schwedischen Krebsregister geht hervor, dass das Vorliegen einer MPN im Vergleich zu den Kontrollen mit einem doppelt so hohen Risiko für Infektionen einhergeht. Dem höchsten Infektionsrisiko sind PMF-Patienten ausgesetzt. Eine zytoreduktive Therapie ist dabei nicht in der Lage, zu einer Normalisierung des Infektionsrisikos zu führen, während eine Therapie mit dem JAK-Inhibitor Ruxolitinib mit einem vierfachen Risiko für Infekt komplikationen assoziiert ist [23]. Die Mortalitätsrate von MPN-Patienten ist im Vergleich zur Bevölkerung ohne nachgewiesene hämatologische Erkrankung erhöht. Hultcrantz *et al.* konnten zeigen, dass die gesteigerte Mortalität hauptsächlich auf eine maligne Transformation, Infektionen und bei jüngeren Patienten unter 60 Jahren auf kardiovaskuläre Ereignisse zurückgeht [24]. Da jedoch bereits während der Studienperiode von 1973-2005 die Anwendung potenziell leukämogener Substanzen zurückgegangen ist und moderne Therapieoptionen noch nicht zur Verfügung standen, bleibt eine aktuellere Analyse abzuwarten. Die Überlebensraten von Patienten mit einer vor 2006 diagnostizierten PV oder ET bzw. vor 2011 diagnostizierten PMF wurden in einer multizentrischen Studie auf 19,8 Jahre für ET-, 13,5 Jahre für PV- und 5,9 Jahre für PMF-Patienten geschätzt [25]. Während sich hier für ET-Patienten noch eine verminderte Lebenserwartung im Vergleich zur Normalbevölkerung gezeigt hatte, konnten neuere Analysen, in denen eine klare Abgrenzung zwischen einer ET und einer Prä-PMF erfolgte, zeigen, dass ET-Patienten bei exakter Diagnosestellung eine uneingeschränkte Überlebensrate aufweisen, während die Diagnose der Prä-PMF mit einer erhöhten Mortalität einhergeht [26].

Die Diagnose einer MPN wird anhand der Diagnosekriterien der WHO von 2022 gestellt. Dabei finden die klinische Präsentation, morphologische Kriterien und der Mutationsstatus Berücksichtigung [2]. *Tabelle 1* fasst die wichtigsten Merkmale der beschriebenen MPN-Entitäten zusammen.

	PV	ET	Prä-PMF	PMF
Treibermutationen	<ul style="list-style-type: none"> - 95% JAK2V617F¹ - 3% JAK2 Exon 12² 	<ul style="list-style-type: none"> - 50-60% JAK2V617F¹ - 25-30% CALR Exon 9^{3,4} - 3% MPLW515L⁵ 	<ul style="list-style-type: none"> - 60% JAK2V617F¹ - 9% MPLW515L^{6,7} - 20-35% CALR Exon 9^{3,4} 	
Klinik	<ul style="list-style-type: none"> - arterielle und venöse Thrombosen - Splenomegalie - Pruritus - Fatigue - Plethora - Kopfschmerzen - Hypertonie 	<ul style="list-style-type: none"> - meist asymptomatisch - Erythromelalgie - arterielle und venöse Thrombosen - Blutungen 	<ul style="list-style-type: none"> - meist keine 	<ul style="list-style-type: none"> - Fatigue - B-Symptomatik - Hepatosplenomegalie - arterielle und venöse Thrombosen - Blutungen - Infekte
Blutbild	<ul style="list-style-type: none"> - Polyglobulie - Thrombozytose - Granulozytose 	<ul style="list-style-type: none"> - Thrombozytose 	<ul style="list-style-type: none"> - Thrombozytose - Leukozytose 	<ul style="list-style-type: none"> - initial ggf. Leukozytose - Anämie - Thrombopenie - Leukopenie
Knochenmarkshistologie	<ul style="list-style-type: none"> - hyperzellulär - Panmyelose - Linksverschiebung - geringe Retikulinfaser Vermehrung möglich 	<ul style="list-style-type: none"> - normozellulär - gesteigerte Megakaryopoese mit Atypien - selten geringe Retikulinfaser Vermehrung 	<ul style="list-style-type: none"> - gesteigerte Megakaryopoese mit Atypien - gesteigerte Granulozytose mit Linksverschiebung - reduzierte Erythropoese 	
Verlauf	<ul style="list-style-type: none"> - 20-30% Übergang in sek. Fibrose^{8,9} - 2,3% 10-Jahres-Risiko für sek. AML¹⁰ 	<ul style="list-style-type: none"> - < 10% Übergang in sek. Fibrose¹¹ - 0,65% 10-Jahres-Risiko für sek. AML¹² - selten Übergang in PV 	<ul style="list-style-type: none"> - keine Retikulinfibrose > Grad 1 	<ul style="list-style-type: none"> - Retikulinfibrose Grad 2-3
Medianes Überleben	<ul style="list-style-type: none"> - 13,5 Jahre¹⁵ 	<ul style="list-style-type: none"> - 19,8 Jahre¹⁵ 		<ul style="list-style-type: none"> - 10-20% 10-Jahres-Risiko für sek. AML^{13,14} - 5,9 Jahre¹⁵

Tabelle 1 Zusammenfassung molekulargenetischer, morphologischer und klinischer Kennzeichen der verschiedenen MPN-Entitäten

¹ Baxter et al. 2005, ² Scott et al. 2007, ³ Nangalia et al. 2013, ⁴ Klampfl et al. 2013, ⁵ Piskman et al. 2008, ⁶ Vannucchi et al. 2008, ⁷ Rumi et al. 2013, ⁸ Bonicelli et al. 2012, ⁹ Kladjian et al. 2011, ¹⁰ Tefferi et al. 2013, ¹¹ Passamonti et al. 2008, ¹² Passamonti et al. 2012, ¹³ Abdulkarim et al. 2009, ¹⁴ Cervantes et al. 1991, ¹⁵ Tefferi et al. 2014

1.1.2. Somatische Mutationen auf Stammzebellebene und die genetische Prädiposition bestimmen über die Ausprägung der MPN

Vor 2005 war die molekulare Basis der Philadelphiaehromosom-negativen MPN unbekannt. Seither wurden mehrere sogenannte somatische Treibermutationen ausgemacht, welche bei einem Großteil der MPN-Patienten nachzuweisen sind und die Ausprägung des Phänotyps bestimmen. Zunächst wurde 2005 durch mehrere Arbeitsgruppen eine aktivierende Mutation in der Pseudokinasedomäne von JAK2 nachgewiesen, welche durch die Substitution von Valin zu Phenylalanin an der Position 617 zu einer konstitutiven Aktivierung der Kinase führt [27-31]. JAK2 ist mit der zytoplasmatischen Region einiger für die Hämatopoese bedeutender Zytokinrezeptoren, wie dem Erythropoietin-Rezeptor (EPO-R), dem Thrombopoietin-Rezeptor (TPO-R) und dem Rezeptor des Granulozyten-Kolonie stimulierenden Faktors (G-CSF-R) assoziiert. Normalerweise wird die Kinase durch Ligandenbindung an den Rezeptor aktiviert [32, 33]. Durch die Konformationsänderung des Rezeptors [34] kommt es zu einer gegenseitigen Phosphorylierung von zwei Januskinasen (Transphosphorylierung) [35], die im Anschluss Tyrosinreste im zytoplasmatischen Bereich des Rezeptors phosphorylieren [32], welche wiederum der Rekrutierung weiterer Signalmoleküle dienen [36, 37]. Diese führen zur Aktivierung des PI3K-, MAPK- und STAT-Signalwegs [28, 30, 38, 39]. Die Pseudokinasedomäne dient dabei der Inhibition der katalytisch aktiven Domäne [40]. Die JAK2V617F-Mutation kann in > 95% der PV- und mehr als der Hälfte der ET- und PMF-Patienten nachgewiesen werden [27, 41]. Bei der Mehrheit der JAK2V617F-negativen PV-Patienten konnten JAK2 Exon 12-Mutationen ausgemacht werden. Diese Patienten sind in der Regel jünger und weisen neben einem höheren Hb-Wert, niedrigere Leuko- und Thrombozytenwerte auf [42]. Weitere aktivierende Mutationen, welche in 3 bzw. 8% der Patienten mit ET und MF zu finden sind, betreffen das Exon 10 des Gens für den TPO-Rezeptor (*c-MPL*) an der Position W515 und beeinflussen damit die Funktion der Juxtamembrandomäne [43-45]. Seltener anzutreffen ist die mit hereditären Formen der MPN assoziierte S505-Mutation, welche die Transmembrandomäne betrifft [46, 47]. Die Mutationen bewirken eine Aktivierung des TPO-Rezeptors, woraufhin es zur Transphosphorylierung von zwei JAK2-Molekülen kommt und nachgeschaltete Signalmoleküle ligandenunabhängig rekrutiert werden [48]. Betroffene Tiere weisen im Mausmodell phänotypische Zeichen einer ET und PMF mit Clustern dysplastischer Megakaryozyten und Retikulinfaservermehrung im Knochenmark, Thrombo- und Leukozytose sowie extramedullärer Hämatopoese auf [43]. Im Jahr 2013 wurde schließlich die Calreticulin-Mutation bekannt, welche in einem Großteil der Patienten mit ET und MF ohne nachgewiesene JAK2- oder *MPL*-Mutation aufzufinden ist [49, 50]. Dabei kommt es im Exon 9 zu Insertionen oder Deletionen, welche eine Leserasterverschiebung bewirken und damit zur Entstehung eines neuen C-Terminus führen. Normalerweise fungiert Calreticulin als Chaperon im endoplasmatischen Retikulum und ist in die Calcium-Homöostase eingebunden. Die Mutation

führt zu einer Bindung des MPL-Rezeptors an Calreticulin im endoplasmatischen Retikulum. Nach Export an die Zelloberfläche resultiert eine konstitutive Aktivierung des Rezeptors [51-54]. ET-Patienten mit einer Calreticulin-Mutation weisen im Vergleich zu JAK2V617F-mutierten Patienten meist ein jüngeres Alter auf und zeigen höhere Thrombozytenwerte bei weniger ausgeprägter Erythro- und Leukozytose sowie eine höhere Tendenz zur fibrotischen Transformation [55]. Die nach Levine *et al.* [39] adaptierte *Abbildung 1* gibt einen Überblick über die bekannten Treibermutationen der MPN und veranschaulicht die nachgeschalteten Signalwege.

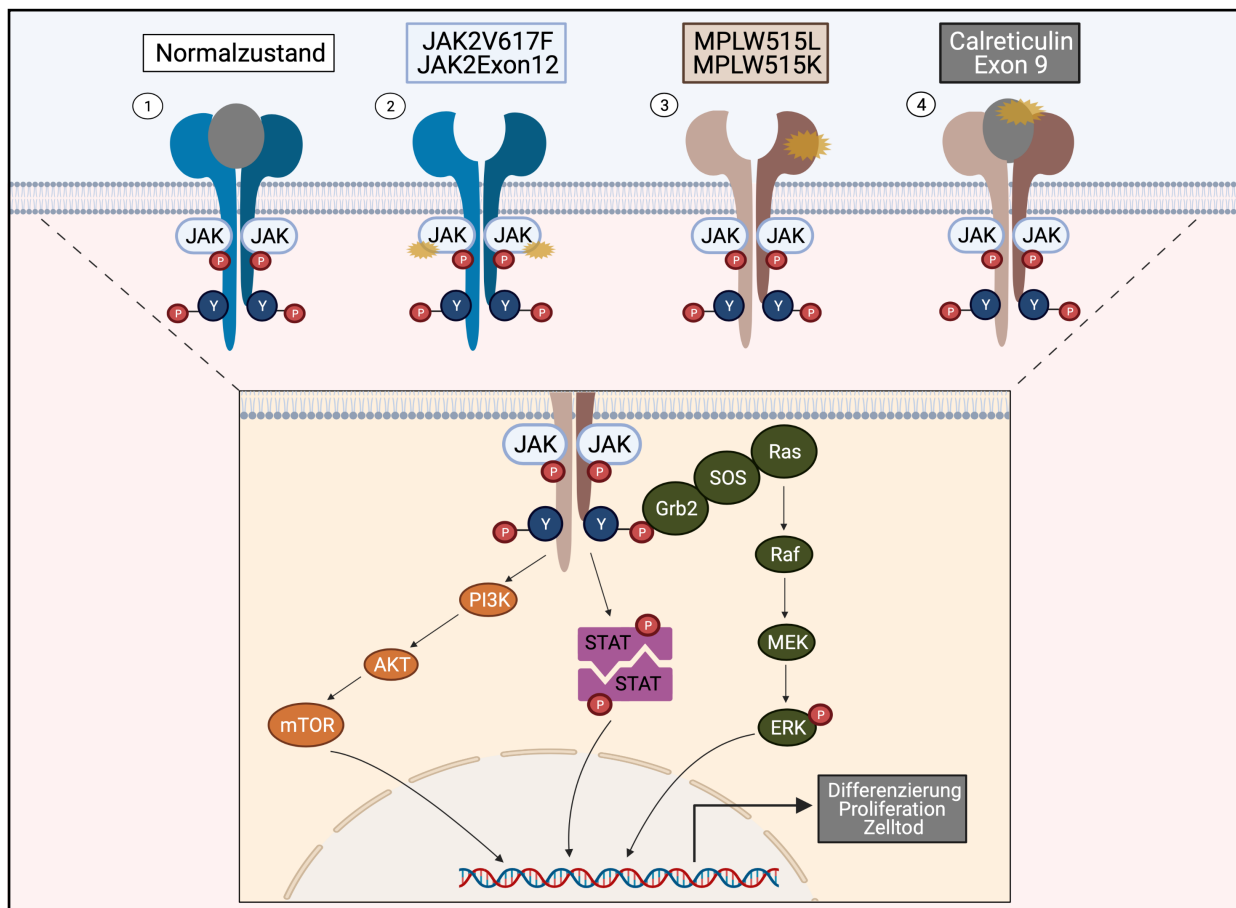


Abbildung 1 MPN-Treibermutationen und nachgeschaltete Signaltransduktion

1. Die Ligandenbindung an den Zytokinrezeptor führt über die Konformationsänderung des Rezeptors zur Transphosphorylierung von zwei JAKs, welche daraufhin Tyrosinreste in der zytosolischen Domäne des Rezeptors phosphorylieren. Es werden weitere Signalmoleküle rekrutiert und der PI3K/AKT-, der MAPK- und STAT-Signalweg aktiviert.
2. Durch die JAK2V617F- oder Exon 12-Mutationen bleibt die Inhibition der katalytisch aktiven Domäne durch die Pseudokinasedomäne aus. Es resultiert eine ligandenunabhängige Aktivierung der entsprechenden Signalwege.
3. Durch Mutationen im MPL-Rezeptor kommt es ohne Bindung des Liganden Thrombopoietin zu einer Phosphorylierung von JAK2 und einer Aktivierung der nachfolgenden Signalwege.
4. Mutiertes Calreticulin bindet im Endoplasmatischen Retikulum an den unreifen MPL-Rezeptor. An der Zelloberfläche führt der Komplex zu einer Aktivierung des Rezeptors und der Rekrutierung der nachgeschalteten Signalmoleküle. (adaptiert nach Levine *et al.*, 2007)

Es ist somit ersichtlich, dass die Treibermutationen in der Lage sind die Art des MPN-Phänotyps zu beeinflussen, wobei der zugrunde liegende Mechanismus aktuell unbekannt ist. Gemäß Nangalia & Green könnte das Ausmaß der Signaltransduktion über den EPO- oder MPL-Rezeptor entscheidend für die Ausbildung unterschiedlicher Phänotypen sein [56]. Es konnte im murinen

Transplantationsmodell mit retroviral infizierten Knochenmarkszellen gezeigt werden, dass die exzessive Produktion von TPO zu einem myelofibroseähnlichen Krankheitsbild führt [57]. Im Einklang damit weisen Patienten mit einem höheren Anteil des mutierten *MPL*-Allels eher eine Myelofibrose auf, während die ET mit niedrigeren Allellasten assoziiert ist [45]. Ähnliche Ergebnisse liegen für die Calreticulin-Mutation vor. Hier führt die 52-bp-Deletion (Typ 1-Mutation) im Vergleich zur 5-bp-Insertion (Typ 2-Mutation) zu einem ausgeprägteren Verlust negativ geladener Aminosäuren am C-Terminus [49], was mit einer stärkeren Bindung an den *MPL*-Rezeptor [58] und im Mausmodell mit dem Phänotyp einer Myelofibrose einhergeht [53]. Gleichermaßen zeigen verschiedene *JAK2*-Mutationen unterschiedliche Affinitäten zum *EPO*- oder *G-CSF*-Rezeptor mit daraus resultierender differenzieller Signaltransduktion und Ausbildung verschiedener Phänotypen [59]. Im Fall der *JAK2V617F*-Mutation konnte in transgenen Mausmodellen mit einer Induktion von *JAK2V617F* durch die *Cre*-Rekombinase unter dem *Vav*- bzw. *Mx*-Promotor oder aber einer retroviralen Expression von *JAK2V617F* in murinen Knochenmarkszellen ebenso eine Abhängigkeit des Phänotyps vom *JAK2V617F*-Expressionslevel nachgewiesen werden [60]. Dabei geht ein höherer Anteil von Wildtyp-*JAK2* eher mit einer Thrombozytose einher, während im Fall des retroviralen Modells hohe Level von *JAK2V617F* durch eine Erythrozytose mit niedrigen Thrombozytenwerten gekennzeichnet sind. Im Einklang damit ist der Verlust des *JAK2*-Wildtyp-Allels im Mausmodell mit der Ausbildung einer PV und MF assoziiert [13, 61]. Während sich kleinere homozygote *JAK2V617F*-mutierte Klone auch in ET-Patienten zeigen, ist in PV-Patienten meist ein dominanter homozygoter Klon zu finden [62]. Obwohl es bei allen Entitäten zur Expansion myeloider Zellen kommt, konnte gezeigt werden, dass der zelluläre Ursprung nicht auf der Ebene der Progenitorzellen, sondern im Stammzell-Kompartiment zu finden ist. Jamieson *et al.* wiesen 2006 erstmalig nach, dass die *JAK2V617F*-Mutation bei PV-Patienten in *CD34⁺CD38⁻CD90⁺Lin⁻* hämatopoetischen Stammzellen (HSCs) auftritt [63]. *CD34⁺*-Zellen mit *JAK2V617F*-Mutation weisen dabei ein lymphomyeloides Differenzierungspotential auf und sind in der Lage, auch B-Zellen, NK-Zellen und T-Zellen zu bilden [64]. Mullally *et al.* waren schließlich 2012 in der Lage in einem Transplantationsmodell zu demonstrieren, dass im Gegensatz zu den multipotenten Progenitorzellen (*CD150⁻CD48⁺LSK*) und HSCs mit geringem Repopulationspotential (*short-term* HSCs, *CD150⁻CD48⁺LSK*) nur die repopulationsfähigen *long-term* HSCs (*CD150⁺CD48⁺LSK*) konditioneller *Knock-in*-Mäuse mit heterozygoter *JAK2V617F*-Mutation langfristig den MPN-Phänotyp aufrechterhalten können [65]. Neben den genannten Treibermutationen existieren weitere Faktoren, welche das Auftreten einer MPN, die klonale Expansion und die Ausbildung des Phänotyps beeinflussen. Lundberg *et al.* demonstrierten, dass die Transplantation einer einzigen *JAK2*-mutierten murinen *long-term* HSC (*c-kit⁺, Sca-1⁺, CD34⁻, Flk2⁻, CD48⁻, CD150⁺*) in mit 12 Gy bestrahlte Empfängermäuse nur selten zur Manifestation einer MPN führt [66]. Diese Ergebnisse zeigen, dass neben der Treibermutation weitere Umstände vorliegen müssen, die zur Expansion des malignen Klons führen. Ungefähr ein

Drittel der MPN-Patienten weisen zusätzliche somatische Mutationen auf. Diese betreffen Regulatoren der DNA-Methylierung (DNMT3A, TET2, IDH1/2), Chromatinmodifikatoren (ASXL1, EZH2, IDH1/2), *Splicing*-Faktoren (U2AF1, SF3B1, SRSF2, RSR2) und DNA-Reparaturproteine (p53). Dabei kommt es zu einer auffälligen Häufung von Mutationen unter MF-Patienten. Daten einer Exom-Sequenzierung an 150 MPN-Patienten von Nangalia *et al.* zeigen, dass PV- und ET-Patienten im median 6,5 und MF-Patienten 13 Mutationen aufweisen [50]. Dennoch können die zusätzlichen Mutationen auch bei PV und ET zur Expansion des malignen Klons beitragen und die Ausbildung des Phänotyps beeinflussen. Für die TET2-Mutation konnte in einer Analyse von 24 Patienten gezeigt werden, dass der vorausgegangene Erwerb der JAK2-Mutation mit einer größeren Wahrscheinlichkeit zur Ausbildung einer PV einhergeht, während es in umgekehrter Reihenfolge häufiger zur ET kommt [67]. Für die MF konnte darüber hinaus die Beeinflussung der Prognose durch einige Mutationen gezeigt werden. Der Erwerb einer ASXL-, SRSF2-, IDH1/2- und EZH2-Mutation geht dabei mit einer reduzierten Überlebensrate und einem erhöhten Leukämierisiko einher [68]. Weiteren Einfluss auf die Ausbildung einer MPN und den resultierenden Phänotyp nimmt der genetische Hintergrund. In einer großen schwedischen Studie konnte für erstgradige Verwandte von MPN-Patienten eine fünf- bis siebenfache Risikoerhöhung für die Ausbildung einer MPN identifiziert werden [69]. Zunächst wurde ein Polymorphismus im JAK2-Gen, welcher als 46/1-Haplotyp bezeichnet wird als Risikoakzelerator ausgemacht. Dieser erhöht die Wahrscheinlichkeit zur Ausbildung einer MPN um den Faktor drei bis vier [70-72]. Später konnten auch andere Allele, die im Zusammenhang mit der Entstehung einer MPN stehen, identifiziert werden. Die jeweiligen Gene beeinflussen die Zellalterung, das JAK-STAT-Signaling, die epigenetische Regulation und die DNA-Reparatur und fördern die Entstehung einer MPN sowie die klonale Expansion eines JAK2V617F-mutierten Klons [73]. Da MPN insbesondere bei älteren Patienten auftreten, ist ein weiterer naheliegender Faktor das Alter. Hämatopoetische Stammzellen sind einigen altersabhängigen biochemischen und funktionellen Veränderungen ausgesetzt, welche das Erwachsen von Zellen, die eine Mutation erwerben, begünstigen können [74].

1.1.3. Die pathophysiologische Grundlage der MPN sind Veränderungen der Knochenmarksnische und ein inflammatorisches Syndrom

Neben den bereits genannten Faktoren, die die Ausprägung einer MPN beeinflussen können, spielt die Knochenmarksnische eine wichtige Rolle. Die Knochenmarksnische stellt ein Mikromilieu dar, in dem die hämatopoetischen Stammzellen ansässig sind. Im Äquilibrium verweilen die HSCs dort und interagieren über verschiedene Zytokine mit unterschiedlichen Zellarten der Nische, die in der Lage sind die Stammzellfunktion zu beeinflussen. Wesentlich für den Erhalt der HSCs sind mesenchymale Stammzellen [75], Osteoblasten [76], Stromazellen [77, 78] und Endothelzellen [78, 79].

Über Signalmoleküle, wie CXCL-12 (SDF-1), SCF und TGF-1 β werden die HSCs im Ruhezustand gehalten [77, 78, 80]. Bereits für andere myeloide Erkrankungen konnte gezeigt werden, dass mutierte HSCs zu einer Umgestaltung der Knochenmarksnische zu ihren eigenen Gunsten führen können [81] und im Verlauf unabhängig von Signalen der Nische werden [82]. Im Fall JAK2V617F-mutierter MPN konnte demonstriert werden, dass mutierte HSCs über die Produktion von IL-1 β zu einer Neuropathie mit konsekutiver Reduktion mesenchymaler Stammzellen (MSCs) führen können. Die Depletion der MSCs geht mit einer geringeren Expression des Quieszenz-fördernden Chemokins CXCL-12 [83] einher, sodass eine Expansion der mutierten hämatopoetischen Stammzellen eintritt [84]. Aus einem retroviralen TPO-induzierten Myelofibrose-Modell geht darüber hinaus hervor, dass Stromazellen im Rahmen der MPN die stammzellerhaltenden Zytokine CXCL-12 und SCF in geringerem Ausmaß exprimieren, es allerdings zur vermehrten Expression von Genen kommt, die mit Fibrose und Osteogenese assoziiert sind [85]. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass auch Zellen der Knochenmarksnische die genannten Treibermutationen im Rahmen einer MPN aufweisen können. JAK2V617F-mutierte Endothelzellen sind dabei in der Lage über den TPO-Rezeptor-Signalweg bevorzugt die Proliferation mutierter HSCs anzuregen [86]. Diese Untersuchungen zeigen, dass Zytokinen eine wichtige Rolle bei der Vermittlung von Signalen in der Knochenmarksnische zukommt. Bei MPN lässt sich darüber hinaus eine systemische Entzündung mit erhöhten Leveln zirkulierender proinflammatorischer Zytokine nachweisen. Je nach MPN-Phänotyp lassen sich dabei verschiedene Zytokinmuster unterscheiden. Tefferi *et al.* konnten bei 127 PMF-Patienten eine relevante Erhöhung zahlreicher zirkulierender Zytokine im Vergleich zu gesunden Kontrollen nachweisen. Dabei konnten gesteigerte Level bestimmter Zytokine eine prognostische Bedeutung zugeschrieben werden. Die Erhöhung von IL-8, IL-2R, IL-12, IL-15 und IP-10 stellte sich als Prädiktor für eine reduzierte Überlebensrate bislang unbehandelter Patienten heraus. IL-8 war darüber hinaus mit dem Auftreten konstitutioneller Symptome, der leukämiefreien Überlebenszeit und der Rate peripher zirkulierender Blasten verbunden. Für andere Zytokine konnte eine Assoziation zum Transfusionsbedarf, dem Auftreten einer Splenomegalie und dem Vorhandensein der JAK2V617F-Mutation hergestellt werden [87]. Auch für die ET und die PV konnte die gesteigerte Zirkulation zahlreicher Zytokine mit phänotypspezifischem Profil nachgewiesen werden. Im Fall der PV zeigte sich zudem ein Zusammenhang zwischen erhöhten Leveln des Chemokins CCL-4 und der Überlebensrate in einer multivariablen Analyse sowie von IL-1 β , IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, IL-15, IL-17 und IP-10 mit der fibrotischen Transformation in einer univariablen Analyse [88, 89]. Bei ET- und PV-Patienten liegt darüber hinaus eine Verbindung zwischen den Serumleveln des Akute-Phase-Proteins CrP und kardiovaskulären Ereignissen vor [90]. Dabei sind momentan verschiedene Pathomechanismen bekannt, die zur Progression der MPN führen. Zum einen steuern Zytokine die Funktion von MPN-Stammzellen.

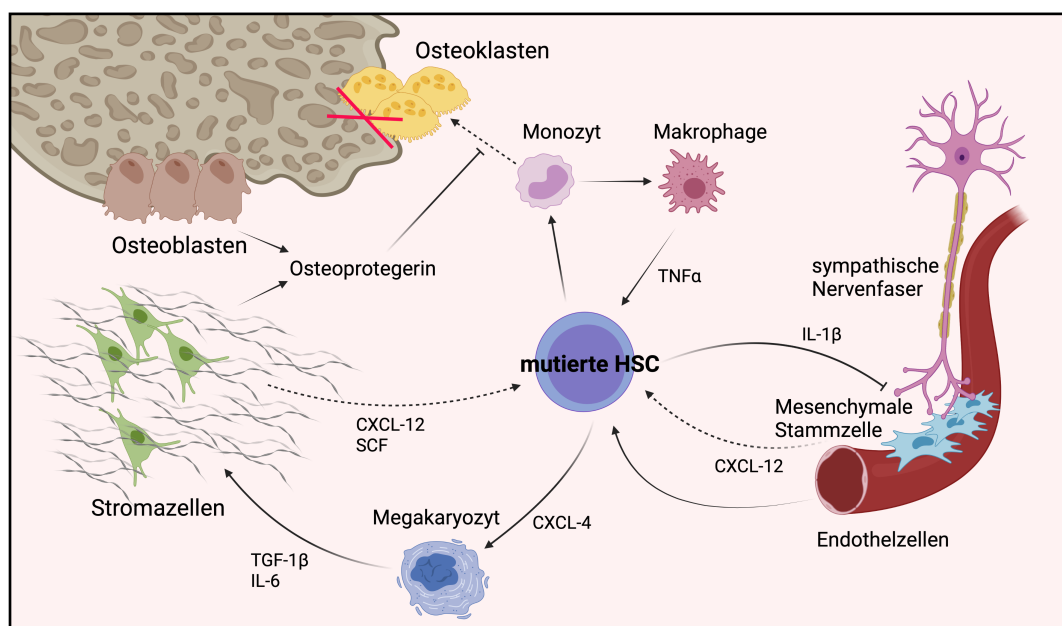


Abbildung 2 Pathophysiologische Vorgänge in der Knochenmarksnische bei Myelofibrose

Die mutierten HSCs sind in der Knochenmarksnische ansässig und interagieren dort mit verschiedenen hämatopoetischen und nichthämatopoetischen Zellen. Kennzeichnend für die Knochenmarksnische bei Myelofibrose sind die Expansion der mutierten Zellen, eine zunehmende Fibrose sowie Osteosklerose.

1. Expansion des malignen Klons: Mutierte HSCs führen über IL-1 β zu einer Schädigung der Schwann-Zellen sympathischer Nervenfasern, sodass der Verlust mesenchymaler Stammzellen resultiert, welche die HSCs normalerweise über CXCL-12 im Ruhezustand halten. Ebenfalls werden die Quieszenz-vermittelnden Faktoren CXCL-12 und SCF in geringerem Ausmaß von Stromazellen produziert. Das von Makrophagen produzierte TNF- α führt zur Proliferation mutierter Progenitorzellen.
2. Fibrose: Mutierte HSCs führen über CXCL-4 zur Expression von TGF-1 β und IL-6 in Makrophagen, woraus eine vermehrte Stromazellendifferenzierung resultiert.
3. Osteosklerose: Mutierte Osteoklasten weisen eine reduzierte osteolytische Aktivität auf. Der Osteoklastenreifung wird darüber hinaus über das von Stromazellen und Osteoblasten produzierte Osteoprotegerin entgegengewirkt.

(adaptiert nach Herlihy *et al.*, 2019)

In vitro-Experimente demonstrieren, dass die gesteigerte Expression von TNF- α in JAK2V617F-mutierten MPN die Kolonieformation mutierter Progenitorzellen fördert, während die Funktion bei Wildtypzellen eingeschränkt wird [91]. Die übermäßige Produktion von IL-8 führt zu einer Fehlregulation der Megakaryopoese, welche durch die Unterbindung des IL-8-Signalings im PMF-Modell wiederhergestellt werden kann [92]. Der fibrotische Umbau des Knochenmarks wird wiederum maßgeblich durch TGF-1 β befördert, welches von Megakaryozytenvorstufen produziert wird [93]. In einem TPO-induzierten Myelofibrosemodell zeigte sich die Expression von TGF-1 β essenziell für die Ausbildung der Fibrose [94]. Aus jüngeren Untersuchungen geht hervor, dass TGF-1 β JAK2V617F-mutierte Monozyten zur Differenzierung zu Fibrozyten anregt [95]. Ebenfalls führt das von Megakaryozyten produzierte IL-6 durch die Förderung der Stromazellendifferenzierung zu profibrotischen Effekten. JAK2V617F-, MPLW515L- oder TPO-überexprimierende HSPCs regulieren dabei im retroviralen MF-Modell das Fibrosegeschehen über die Expression des Chemokins CXCL-4, indem sie zu einer verstärkten Aktivierung des TGF-1 β -Signalwegs und einer erhöhten Expression von IL-6 in Megakaryozyten führen [96]. Neben einer Knochenmarksfibrose kommt es bei der PMF außerdem zur Osteosklerose. PMF-Patienten weisen erhöhte Plasmalevel des Osteoklastogenese-inhibierenden Faktors Osteoprotegerin auf, welcher von Osteoblasten und

Stromazellen produziert wird und mit dem Ausmaß der Osteosklerose korreliert [97]. Darüber hinaus sind Osteoklasten von PMF-Patienten ebenfalls Teil des malignen Klons und weisen neben den Treibermutationen im JAK2- oder Calreticulin-Gen eine reduzierte osteolytische Aktivität auf [98]. *Abbildung 2* fasst die pathophysiologischen Vorgänge in der Knochenmarksnische bei Myelofibrose anhand der hier dargestellten Studien adaptiert nach Herlihy *et al.* zusammen [99].

Weiterhin beeinflussen Zytokine die Effizienz einer JAK2-inhibierenden Therapie. In in vitro-Versuchen schützten IL-6, FGF und CXCL-10 murine und humane Zelllinien sowie mononukleäre Zellen aus dem peripheren Blut und Knochenmark von PV-Patienten vor JAK-Inhibitor-induzierter Apoptose [100]. Ersichtlich wird aus den genannten Untersuchungen jedoch auch die Rolle von Megakaryozyten für die Pathogenese der MPN. Die gestörte Differenzierung von Megakaryozyten führt im Mausmodell zu einer Myelofibrose [101]. Die Förderung der Megakaryozytenreifung durch einen Aurora Kinase A-Inhibitor war dementsprechend im JAK2V617F- und MPLW515L-mutierten Mausmodell sowie in einer klinischen Phase I-Studie in der Lage zu einer Reduktion der Fibrose im Knochenmark zu führen [102, 103]. Zudem tragen Megakaryozyten via CXCL-4 zum Erhalt des Stammzellpools bei [104].

1.1.4. Die einzige kurative Therapieoption ist die allogene Stammzelltransplantation. JAK-Inhibitoren führen zur Symptomkontrolle, jedoch nicht zur molekularen Remission

Abhängig von der MPN-Entität ergeben sich unterschiedliche Therapiekonzepte, welche sich nach den Empfehlungen des *European LeukemiaNet* (ELN) richten. Bei PV- und ET-Patienten steht die Prävention thrombotischer und hämorrhagischer Ereignisse im Vordergrund. Im Fall der PMF sollte die Verlängerung der Überlebenszeit, im Idealfall der Heilung angestrebt werden [105]. Vor Therapieinitiierung ist eine Risikostratifizierung obligat. Je nach Entität stehen unterschiedliche Scores zur Verfügung, welche das Alter, abgelaufene thrombembolische Komplikationen, Blutwerte, das Vorhandensein konstitutioneller Symptome und den Karyotyp einbeziehen. Für die MF wird das *Dynamic International Prognostic Scoring System* (DIPSS) bzw. der weiterentwickelte DIPSS-plus genutzt [106, 107]. Neuere Scoring-Systeme berücksichtigen ebenfalls den Mutationsstatus zur Prognoseabschätzung. [108, 109] Bei ET-Patienten kommt der *International Prognostic Score for Thrombosis in Essential Thrombocythemia* (IPSET) zur Anwendung und bei der PV dienen das Alter und das Risiko für thrombembolische Ereignisse der Risikoeinteilung [105, 110]. Der Mutationsstatus wurde lange in keinem Score berücksichtigt, obwohl für die MF nachgewiesen werden konnte, dass die CALR-Mutation im Vergleich zur JAK2V617F-Mutation oder dem *Triple*-negativen Status mit einer längeren Überlebenszeit einhergeht und auch Zusatzmutationen die Prognose beeinflussen [68, 111]. Darüber hinaus sollten allgemeine Risikofaktoren für Thrombosen wie ein Diabetes mellitus, eine arterielle Hypertonie und eine Hypercholesterinämie eingestellt werden. Zur Prophylaxe thrombembolischer Ereignisse sollte der

Hämatokrit bei der PV unter 45% gehalten werden, da höhere Werte in randomisierten Studien mit einem erhöhten Risiko für thrombotische Ereignisse und einer gesteigerten kardiovaskulären Mortalität einhergingen [112]. In erster Linie kommen dabei Phlebotomien zum Einsatz, welche in früheren Studien gegenüber den zur damaligen Zeit üblichen und nebenwirkungsbehafteten Zytoreduktiva Chlorambucil und radioaktivem Phosphor hinsichtlich der Mortalität gleichwertig waren [113]. Zusätzlich sollte niedrig-dosiertes ASS verordnet werden, welches in der ECLAP-Studie das Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse und die kardiovaskuläre Mortalität im Vergleich zu Placebo senken konnte und gleichzeitig nicht zu einer Zunahme relevanter Blutungsereignisse führte [114]. Bei Hochrisiko-Patienten, der Notwendigkeit für häufige Phlebotomien, hoher Symptomlast oder exzessiver Leuko- oder Thrombozytose kommen zusätzlich zytoreduktive Substanzen wie Hydroxyurea (HU) oder pegyliertes Interferon α zur Anwendung. In einer Studie mit 890 PV-Patienten führte HU bei einem Großteil der Teilnehmer zu einer Remission, welche allerdings nicht mit einem geringeren Risiko für thrombotische Ereignisse oder einer verbesserten Überlebensrate einherging. Die schlechte Verträglichkeit von HU führte darüber hinaus zu einer hohen Rate von Therapieabbrüchen [115]. Interferone regen hämatologische Stammzellen zur Proliferation und Differenzierung an, wodurch der Pool an repopulationsfähigen *long-term* HSCs minimiert und das Selbsterneuerungspotential beeinträchtigt wird [116]. Im Falle der MPN konnte im Mausmodell gezeigt werden, dass JAK2V617F-positive Stammzellen bevorzugt von der Interferonwirkung betroffen sind, während sich der Pool an Wildtyp-Stammzellen weniger anfällig zeigte [117]. Das aktuell einzige für die PV zugelassene Interferon ist Ropeginterferon alfa-2b. Bei ähnlicher Verträglichkeit ist es HU bezüglich molekularem und hämatologischem Ansprechen überlegen [118]. Bei Unverträglichkeit oder Therapieresistenz gegenüber HU und Interferon wird der orale JAK1/2-Inhibitor Ruxolitinib in der Zweitlinientherapie der PV eingesetzt. In den Phase III RESPONSE-Studien zeigte sich Ruxolitinib gegenüber der Standardtherapie hinsichtlich der Reduktion des Hämatokrits und der Milzgröße überlegen [119, 120]. Die RELIEF-Studie untersuchte die Veränderung der Symptomlast von stabil unter HU eingestellten Patienten mit persistierenden Symptomen. Unter Ruxolitinib ließ sich nach 48 Wochen eine nicht signifikante Verbesserung der globalen Symptomlast mit signifikanter Reduktion von Pruritusbeschwerden erzielen [121]. Eine Metaanalyse der RESPONSE-, RELIEF- und MAJIC-Studien zeigte allerdings, dass Ruxolitinib nicht zu einer signifikanten Reduktion des Thromboserisikos gegenüber der Standardtherapie führt [122]. Da die Inzidenz thrombembolischer Ereignisse jedoch in keiner der ausgewerteten Studien als primärer Endpunkt festgelegt wurde, sind weitere Daten zur endgültigen Beurteilung ausstehend. ET-Patienten mit mikrovaskulären Störungen sollten zur Reduktion kardiovaskulärer Ereignisse ebenfalls mit ASS behandelt werden. Zum Nutzen von ASS bei Niedrigrisiko-Patienten existieren aktuell jedoch keine validen Daten. Beobachtungsstudien deuten darauf hin, dass die Therapie mit ASS nur bei bestimmten Niedrigrisiko-Subgruppen mit begleitenden kardiovaskulären Risikofaktoren oder der JAK2V617F-Mutation in der Lage ist,

arteriellen bzw. venösen Thrombosen vorzubeugen. Bei CALR-mutierten Patienten ist die ASS-Therapie zudem mit einem erhöhten Blutungsrisiko assoziiert, während das Thromboserisiko unverändert bleibt [123]. Gegen eine generelle ASS-Therapie bei ET-Patienten mit niedrigem Risiko spricht außerdem, dass das Thromboserisiko bei diesen Patienten in Beobachtungsstudien im Vergleich zu Gesunden nicht erhöht ist [124]. Die Indikation für eine zytoreduktive Therapie besteht nur für Hochrisiko-Patienten und beim Vorliegen einer ausgeprägten Thrombozytose ($>1,5 \times 10^9/l$). Als Erstlinientherapie stehen auch hier Hydroxyurea und Anagrelid zur Verfügung, welche zu einer Reduktion thrombembolischer Ereignisse führen [125]. Alternativ ist der *Off-label*-Einsatz von Interferon möglich. Anagrelid beeinträchtigt die Ausreifung von Megakaryozyten und die Freisetzung der Thrombozyten [126]. Die Kombination von HU+ASS konnte jedoch in der PT-1-Studie im Vergleich zu Anagrelid+ASS zu einer ausgeprägteren Senkung der Rate thrombembolischer und hämorrhagischer Ereignisse führen [127]. Im Vergleich zur PV und ET steht bei der PMF insbesondere die Behandlung der Anämie, Splenomegalie und weiteren krankheitsassoziierten Symptomen im Vordergrund. Bei Anämie werden Erythropoietin, Kortikosteroide und das Testosteronderivat Danazol angewendet, welche zu einem Hb-Anstieg und einer Reduktion des Transfusionsbedarfs führen [128-132]. In Studien erwiesen sich zudem die Imide Lenalidomid und Pomalidomid als effektiv bei hämatopoetischer Insuffizienz [132, 133]. Bei Splenomegalie und ausgeprägter Symptomlast kommt der JAK1/2-Inhibitor Ruxolitinib zum Einsatz. Ruxolitinib konnte in der Phase III-Studie COMFORT I im Vergleich zu Placebo zu einer signifikanten Reduktion des Milzvolumens und der Symptomlast beitragen und führte zu einer Steigerung der Lebensqualität [134-136]. Auch im Vergleich zur Standardtherapie zeigte Ruxolitinib in der COMFORT II-Studie positive Effekte hinsichtlich Milzvolumen, Symptomlast und Lebensqualität [137]. Neben der Verbesserung klinischer Parameter konnte unter Ruxolitinib zudem ein histologisches Ansprechen verzeichnet werden. Gegenüber der Standardtherapie führte Ruxolitinib bei Intermediär- oder Hochrisiko-Patienten zu einer relevanten Umkehr oder Verzögerung der Knochenmarksfibrose [138]. Beachtenswert ist zudem der Einfluss von Ruxolitinib auf die Überlebensdauer von MF-Patienten. In einer gepoolten Analyse aus Daten beider COMFORT-Studien konnte nach *Cross-over*-Korrektur ein signifikanter Überlebensvorteil unter Ruxolitinib mit einer *Hazard ratio* von 0,53 ermittelt werden [139]. Die derzeit einzige kurative Therapieoption, welche in der Lage ist zu einer hohen Rate molekularer Remissionen zu führen, stellt die allogene Stammzelltransplantation dar [140]. Nach den Empfehlungen des *European LeukemiaNet* und der *European Blood and Marrow Transplantation Group* ist sie jedoch aufgrund ihrer hohen Mortalitäts- und Rezidivrate Intermediär 2- oder Hochrisiko-Patienten nach DIPSS sowie Patienten mit einer refraktären Anämie, $> 2\%$ zirkulierenden Blasten im peripheren Blut, einer Hochrisikozytogenetik, einer *Triple*-negativen MF oder der ASXL-Mutation vorbehalten [141, 142]. Somit sind die therapeutischen Optionen, welche mit dem Ziel einer Remissionsinduktion angewendet werden können, limitiert. Aufgrund des hohen Risikos für Zytopenien und eine

sekundäre AML ist eine molekulare Remission jedoch gerade für die PMF erstrebenswert. Trotz des vielversprechenden klinischen und histologischen Ansprechens unter Ruxolitinib konnte in Langzeitbeobachtungen nur eine geringe Reduktion der Allellast beobachtet werden [143, 144]. Inzwischen sind neben Ruxolitinib auch JAK-Inhibitoren der zweiten Generation bei Myelofibrose untersucht worden. In den Phase II-Studien zum JAK2-spezifischen Inhibitor Fedratinib konnte zwar ein klinisches Ansprechen, jedoch keine Reduktion der Allellast detektiert werden [145]. Nachdem Phase III-Studien zu Fedratinib wegen Sicherheitsbedenken intermittierend unterbrochen worden waren, konnte schließlich in der placebokontrollierten JAKARTA-Studie eine signifikante Reduktion des Milzvolumens und der Symptomlast bestätigt werden [146]. In JAKARTA2 konnte ebenfalls für mit Ruxolitinib vorbehandelte Patienten, welche unter der Therapie Intoleranzen, Resistenzen oder Rezidive erlitten hatten ein klinisches Ansprechen unter Fedratinib nachgewiesen werden [147]. 2021 wurde Fedratinib als Erst- und Zweitlinienoption zur Therapie der primären und sekundären Myelofibrose zugelassen. Der Wirkstoff Pacritinib hemmt neben JAK2 ebenfalls die Tyrosinkinase FLT3. In der Phase III-Studie PERSIST-2 zeigte sich unter Behandlung mit Pacritinib ein verbessertes klinisches Ansprechen im Vergleich zur Standardtherapie [148, 149]. Auf Grundlage der vorliegenden Daten wurde Pacritinib im Februar 2022 von der *U.S. Food and Drug Administration* (FDA) zur Therapie der Myelofibrose zugelassen. In der Phase III-Studie PACIFICA, welche sich zum Zeitpunkt des Verfassens dieser Arbeit in der Rekrutierungsphase befindet, soll nachfolgend auch der Effekt von Pacritinib auf die Allellast untersucht werden. Der JAK1/2-Inhibitor Momelotinib hatte sich in den SIMPLIFY I- und II-Studien als effektiv hinsichtlich eines klinischen Ansprechens erwiesen. Aufgrund einer fehlenden Überlegenheit gegenüber Ruxolitinib wurde die Entwicklung jedoch eingestellt [150]. Ebenfalls erfolgreich hinsichtlich der Reduktion von Symptomlast und Milzgröße hat sich in Phase II-Studien der JAK1/2/3-Inhibitor Jaktinib herausgestellt [151]. Aktuell werden in Studien neben JAK-Inhibitoren weitere Substanzen hinsichtlich ihres Potentials eine Remission bei MF-Patienten zu induzieren, evaluiert. Pegyliertes Interferon α führte dabei in einer kleineren Studie bei einem Großteil der Patienten zu einem molekularen Ansprechen bis hin zur vollständigen molekularen Remission bei einem Teil der Patienten [152]. In einer ersten kleinen Studie führte der Telomerase-Inhibitor Imetelstat zu einem molekularen Ansprechen bei einem Großteil JAK2V617F-mutierter ET-Patienten [153], die Anwendung bei MF-Patienten konnte jedoch trotz der höheren Telomeraseaktivität [154] nur eine geringe Rate molekularer Remissionen herbeiführen [155]. Eine Erklärung für ein geringes Ansprechen bei der Therapie maligner Erkrankungen ist das Prinzip der „synthetischen Letalität“. Demnach entwickeln mutierte Zellen eine Abhängigkeit von ursprünglich nicht onkogenen Signalwegen [156]. Die gleichzeitige Inaktivierung zweier abhängiger Signalwege geht somit mit einer erhöhten Therapieeffizienz sowie niedrigeren Dosierungen und einem günstigeren Nebenwirkungsspektrum einher. Beruhend auf diesem Konzept wurden daher unlängst Kombinationstherapien bei MPN untersucht. Da in Granulozyten von MPN-Patienten eine

Überexpression von Signalmolekülen des *Hedgehog*-Signalwegs nachgewiesen werden konnte, wurde im Mausmodell der Effekt einer Kombinationstherapie bestehend aus Ruxolitinib und dem *Hedgehog*-Inhibitor Sonidegib untersucht. Es konnte ein hämatologisches, histologisches und im Gegensatz zu den jeweiligen Monotherapien ebenfalls ein molekulares Ansprechen beobachtet werden [157]. In einer daraufhin initiierten multizentrischen Phase Ib/II-Studie konnte jedoch kein synergistischer Effekt von Sonidegib und Ruxolitinib nachvollzogen werden [158]. Da darüber hinaus eine vermehrte Expression von Histondeacetylasen (HDAC) in MF nachgewiesen wurde [159], wurde präklinisch der Effekt einer Kombinationstherapie aus Ruxolitinib und dem HDAC-Inhibitor Panobinostat evaluiert, welche im Mausmodell zu einem verbesserten klinischen und histologischen Ansprechen führen konnte [160]. Aussagekräftige klinische Daten fehlen jedoch zum aktuellen Zeitpunkt. Weitere Kombinationsmöglichkeiten mit Ruxolitinib werden aktuell untersucht. Im Rahmen der multizentrischen Phase I/II-Studie ADORE werden momentan der MDM2-Inhibitor Siremadlin, der RAF- und ERK1/2-Inhibitor Rineterkib, der p-Selektin-Antikörper Crizanlizumab, der TIM-3-Antikörper Sabatolimab und der TGF- β -Antikörper NIS793 bei mit Ruxolitinib vorbehandelten Patienten evaluiert. Weitere vielversprechende Daten aus Phase II-Studien in Kombination mit Ruxolitinib liegen für den BET-Inhibitor Pelabresib, den Bcl-2-Inhibitor Navitoclax und den PI3K-Inhibitor Parsaclisib vor [161-163]. Weiterhin wird aktuell der small molecule MDM-2-Inhibitor Navtemadlin in Kombination mit Ruxolitinib in einer Phase Ib/II-Studie untersucht.

1.2. Kälteschockproteine

1.2.1. YB-1 bindet an Nukleinsäuren und beeinflusst zahlreiche zelluläre Abläufe

Die Familie der Kälteschockproteine umfasst eine Gruppe von nukleinsäurebindenden Proteinen mit vielfältigen Funktionen, die sich durch eine evolutionär konservierte Kälteschockdomäne auszeichnen [164]. In humanen Zellen sind die Vertreter YB-1 (Gen: *Ybx1*), DbpA (Gen: *Ybx3*), DbpC (Gen: *Ybx2*), LIN28 A und B (Gene: *LIN28 A und B*), UNR (Gen: *CSDE1*), CARHSP1 (Gen: *CARHSP1*) und PIPPin (Gen: *CSDC2*) bekannt [165]. Aus Untersuchungen in anderen Organismen geht hervor, dass diese Gruppe von Proteinen in der Lage ist, an DNA- und RNA-Sequenzen zu binden und dabei regulierend auf Transkriptions- und Translationsprozesse zu wirken [166-169]. Diese Fähigkeiten machen Kälteschockproteine zu wichtigen Akteuren in verschiedenen neoplastischen Erkrankungen. Sie sind in diversen Tumorentitäten überexprimiert und fördern die Proliferation von Tumorzellen sowie die Metastasierung, ein invasives Wachstumsmuster und Resistenzen gegen gängige Therapeutika [170-174]. Das bekannteste und am meisten untersuchte Protein dieser Gruppe ist das 36 kDa große YB-1, welches aus einer Alanin- und Prolin-reichen N-terminalen Domäne (A/P-Domäne), einer Kälteschockdomäne und einer C-terminalen Domäne besteht. Einen Überblick über die zellulären Funktionen von YB-1 und

dessen Rolle in neoplastischen Erkrankungen geben die Übersichtsarbeiten von Eliseeva *et al.* und Alkrekshi *et al.* [175, 176]. Alternativ wird YB-1 auch als p50 oder DNA-binding protein B (DbpB) bezeichnet. Inzwischen sind diese Termini jedoch weniger geläufig. Ursprünglich wurde YB-1 als Transkriptionsfaktor identifiziert, welcher an die Promotoren der Gene für den MHC-Klasse II und den EGFR bindet [177, 178]. Später konnte gezeigt werden, dass YB-1 die Y-Box-Sequenz nicht bevorzugt, sondern *in vitro* und *in vivo* auch an andere DNA-Elemente bindet [179, 180] und sich insbesondere an beschädigte sowie Zytostatika-veränderte und pyrimidinreiche DNA anlagert [181-183]. Für die Bindung an Doppelstrang-DNA ist neben der Kälteschockdomäne ebenfalls die C-Terminale Domäne von Bedeutung, welche zudem eine Affinität für einzelsträngige DNA besitzt [184]. Mit noch höherer Affinität bindet YB-1 an RNA [185]. An diese bindet YB-1 über das RNA-bindende Motiv in der Kälteschockdomäne [186] und die C-terminale Domäne [187]. Durch seine Interaktionen mit Nukleinsäuren ist YB-1 in der Lage DNA-Reparaturmechanismen und die Genexpression zu regulieren. In Kolonkarzinom-Zellen interagierte YB-1 mit Enzymen der Basen-Exzisions-Reparatur und stimulierte deren Aktivität unter Einfluss von oxidativem Stress [188]. Auch in der Mammakarzinom-Zelllinie MCF7 wurde die Assoziation mit der Endonuklease III nachgewiesen, welche an der Basenexzisionsreparatur beteiligt ist und eine vermehrte Komplexbildung nach Behandlung der Zellen mit Cisplatin oder UV-Strahlung beobachtet [189]. Darüber hinaus wurde in Mammakarzinom-Zellen nachgewiesen, dass YB-1 eine intrinsische 3'-5'-Exonuklease-Aktivität besitzt und in der Lage ist, Einzelstrang-DNA zu schneiden [184]. Durch diese enzymatische Aktivität wird es zur Mitwirkung an der Nukleotid-Exzisions-Reparatur befähigt und scheint auf diesem Weg Zellen vor DNA-Crosslinks zu schützen. In humanen KB-Zellen führte der *Knock-down* von YB-1 zu einer Sensitivierung der Zellen gegenüber den quervernetzenden Substanzen Cisplatin und Mitomycin C sowie UV-Strahlung, während sich die Wirkung des Mitosehemmstoffs Vincristin und der Topoisomerase-Hemmer Etoposid und Doxorubicin nicht veränderte [190]. Auf die *Mismatch*-Reparatur wirkt es dagegen als Negativregulator, indem es die Expression von Proteinen des *Mismatch*-Repair-Komplexes reduziert und die Aggregation des Komplexes verhindert [191]. Darüber hinaus ist YB-1 über die Regulation der Expression der DNA-Polymerase- α in die DNA-Replikation involviert [192]. Durch seine Fähigkeit an RNA zu binden, konnte YB-1 in Retikulozyten von Nagern je nach Lokalisation als Akzelerator oder Repressor der Translation auftreten [193]. In freien Messenger-Ribonukleoprotein-Partikeln (mRNP) mit einem hohen Gehalt von YB-1, wird die Translation unterdrückt, während geringere Konzentrationen in ribosomalen mRNPs Translationsprozesse befördern. Zudem wirkt YB-1 stabilisierend auf posttranskriptionell modifizierte mRNA mit einer 5'-Cap-Struktur. In HeLa-Zellen konnte eine deutliche Zunahme der Halbwertszeit der mRNA unter Einfluss von YB1 nachgewiesen werden [194]. Neue Untersuchungen belegen zudem, dass YB-1 auch mit nicht-kodierender RNA (nc-RNA) interagiert. Nicht-kodierende RNA nimmt eine wichtige Rolle in vielen zellulären Vorgängen ein und ist in der Lage eine onkogene oder tumorsupprimierende Wirkung auszuüben [195]. In

Proben aus Magenkarzinom-Gewebe konnte gezeigt werden, dass YB-1 an die lange nicht-kodierende RNA (lnc-RNA) HOXC-AS3 bindet, welche in der Lage ist die Zellproliferation und -migration zu beeinflussen [196]. Darüber hinaus wird das Expressionslevel von YB-1 in Magenkarzinomzellen über lnc-RNA reguliert. Die verringerte Expression der tumorsuppressiv wirkenden lnc-RNA GAS5 führt konsekutiv zu einer geringeren YB-1- und p21-Expression mit fehlendem Zellzyklusarrest [197]. Weiterhin interagiert YB-1 mit kurzen nicht-kodierenden RNA-Sequenzen, wie miRNA, tRNA, rRNA und snoRNA [198]. Diese sind ebenfalls in die Regulation vieler biologischer Prozesse involviert und werden in malignen Zellen häufig unterdrückt [199-201]. In Pleuramesotheliom-, NSCLC-, Mammakarzinom- und Melanom-Zellen üben miRNA eine tumorsuppressive Wirkung aus, indem sie die YB-1-Expression regulieren und damit die Migration, Proliferation und Invasivität der Zellen beeinflussen [200, 202-204]. Andererseits wurde in Blasenkarzinom- und Glioblastomzellen gezeigt, dass YB-1 wiederum in der Lage ist, die Expression von miRNA und damit die Tumorigenese zu beeinflussen [205, 206]. Zu den weiteren Mechanismen der Genregulation durch YB-1 gehören außerdem die Beteiligung am mRNA-*Splicing* sowie der Umstrukturierung von DNA- und RNA-Strukturen [207-209]. Des Weiteren reguliert YB-1 über die Bindung an Aktinfilamente den Transport und die Lokalisation von mRNA in der Zelle [210]. Über Interaktion mit dem 3'- und 5'-UTR seiner eigenen mRNA reguliert YB-1 darüber hinaus sein eigenes Expressionslevel [211, 212]. Um diese vielfältigen Funktionen in den verschiedenen subzellulären Kompartimenten zu erfüllen, besitzt YB-1 die Fähigkeit aus dem Zytoplasma in den Nukleus zu translozieren. Diese Translokation ist abhängig von verschiedenen Faktoren. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl eine Phosphorylierung des Gesamtproteins, als auch eine Trunkierung desselbigen dazu beitragen [213]. In Endothelzellen liegt das inaktive Gesamtprotein im Zytoplasma an RNA gebunden vor, wohingegen die Stimulation mit Thrombin zur Abspaltung des C-Terminus führt und der Transport von YB-1 in den Zellkern initiiert wird. Während das Gesamtprotein wie zuvor beschrieben an *Y-box*-Sequenzen bindet, verliert die proteolytisch veränderte Form die Affinität zu dieser und ist dagegen in der Lage an andere Elemente zu binden [214]. In murinen Fibroblasten konnte das 20S-Proteasom als verantwortlicher Protease-Komplex identifiziert werden, welcher das C-terminale Fragment von YB-1 abspaltet. Dabei führte genotoxischer Stress zur Induktion der YB-1-Trunkierung und dessen nukleärer Akkumulation [215]. Neben der Trunkierung führt auch die Phosphorylierung an Ser102 in der Kälteschockdomäne zur Translokation von YB-1 in den Nukleus. Der PI3K-Signalweg reguliert dabei die Phosphorylierung von YB-1 über die Proteinkinase B (Akt), welche YB-1 an Ser102 phosphoryliert und die Glycogensynthasekinase 3 β , deren Aktivität im Gegensatz zu Akt bei Aktivierung des PI3K-Signalwegs unterdrückt wird [216-218]. Zudem führt die Aktivierung des MAPK-Signalwegs über ERK und die Ribosomale S6-Kinase zur Phosphorylierung von YB-1 [216, 219, 220]. In Melanomzellen konnte darüber hinaus die virale Überexpression von p53 eine

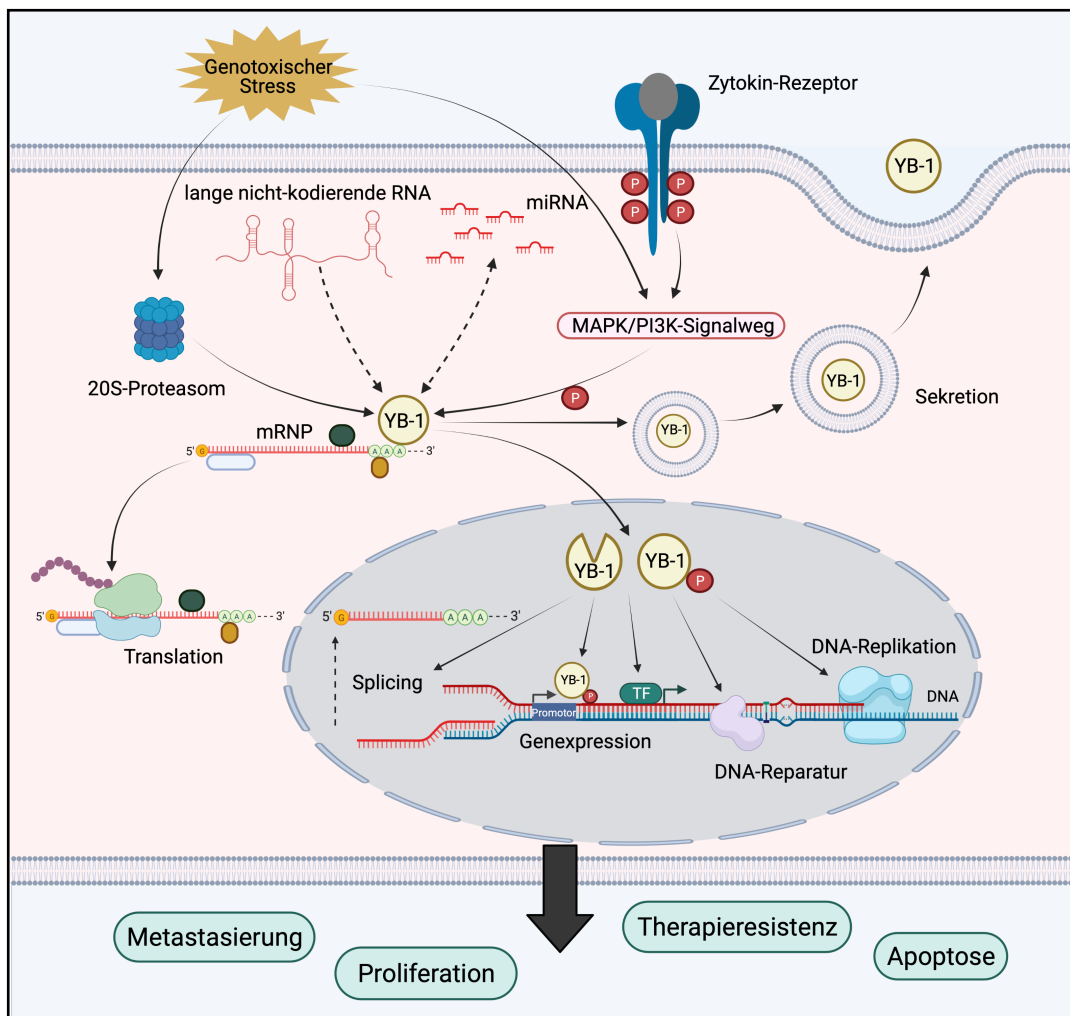


Abbildung 3 Funktionen und Interaktionen des Kälteschockproteins YB-1 in der Zelle.

In der Zelle liegt YB-1 gebunden an nicht-translatierte mRNPs vor. Eine Freigabe der mRNA, welche daraufhin translatiert wird, erfolgt durch Phosphorylierung oder Trunkierung von YB-1. Die Phosphorylierung wird über Kinasen des MAPK- bzw. PI3K-Signalwegs reguliert, welche über Ligandenbindung an einen Zytokinrezeptor oder genotoxischen Stress aktiviert werden. Die proteolytische Abspaltung eines C-terminalen Fragments wird über das 20S-Proteasom vorgenommen, welches ebenfalls durch genotoxische Einflüsse aktiv wird. Die posttranslationale Modifikation von YB-1 befähigt es zur Translokation in den Zellkern, wo es in das mRNA-Splicing, die DNA-Reparatur und die DNA-Replikation eingreift. Zudem wirkt es über die Bindung an Transkriptionsfaktoren und Promotoren verschiedener Gene auf die Genexpression ein. Im Zytoplasma bestehen darüber hinaus Interaktionen zwischen YB-1 und nicht-kodierender RNA.

Über einen endolysosomalen Sekretionsweg wird YB-1 nach extrazellulär transportiert. Durch seine Einbindung in die intrazellulären Regulationsvorgänge und die von extrazellulär ausgeübte Wirkung auf andere Zellen steuert YB-1 die Proliferation und Apoptose von Zellen und begünstigt Therapieresistenz und Metastasierung in neoplastischen Erkrankungen.

gesteigerte Phosphorylierung von YB-1 erwirken [221]. Nach dem Transport in den Nukleus kontrolliert YB-1 die Expression von Zielgenen der genannten Signalwege.

In Kolonkarzinomzelllinien wurden in einem ChIP-on-Chip-Assay 63 mit dem MAPK-Signalweg assoziierte Gene identifiziert, an deren Promotoren YB-1 bindet [222]. Darüber hinaus wurde in Kolonkarzinomzellen demonstriert, dass auch die Phosphorylierung an Ser165 und Ser176 in der C-terminalen Domäne in der Lage ist die Genexpression in Tumorzellen zu beeinflussen. Dabei wurde zudem die Involvierung von YB-1 in den NF- κ B-Signalweg aufgezeigt [223, 224]. Im Anschluss an die Phosphorylierung verliert YB-1 seine Affinität zur mRNA im Zytoplasma, welche daraufhin vermehrt translatiert wird [225]. Neben der Ausübung seiner intrazellulären Funktionen

agiert YB-1 auch von extrazellulär. In Monozyten erfolgt nach Stimulation der Zellen mit LPS ein endolysosomaler Export [226]. Kürzlich konnte die Sekretion von YB-1 zudem in Melanomzellen beobachtet werden. Nach Sekretion stimulierte YB-1 daraufhin die Migration und Invasion der Tumorzellen [227]. Durch seine Involvierung in wichtige Signalwege ist YB-1 in der Lage komplexe zelluläre Prozesse wie Proliferation und Apoptose zu regulieren. Auf den Zellzyklus nimmt es dabei über seine unterschiedliche Wirkung auf die Cyclinexpression und die Expression des Tumorsuppressors p16 Einfluss, die in den meisten beschriebenen Fällen zu einer Steigerung der Proliferationsrate führt [228-231]. Darüber hinaus schützt YB-1 durch die Regulation der Expression von p53, Bcl-xl und dem fas-Rezeptor vor dem programmierten Zelltod [232-235]. *Abbildung 3* stellt die Funktionen und Interaktionen von YB-1 in der Zelle und die Bedeutung seiner posttranslationalen Modifikationen dar.

1.2.2. YB-1 fördert die Onkogenese in neoplastischen Erkrankungen

Über seine antiapoptotische und proliferationsfördernde Wirkung kommt YB-1 eine bedeutende Rolle in entzündlichen und neoplastischen Erkrankungen zu. YB-1 ist in zahlreichen Tumorentitäten, insbesondere aber in chemoresistenten Tumoren überexprimiert [236-240], wobei für die Therapieresistenz vor allem die nukleäre Lokalisation von Bedeutung ist [241]. Zudem konnte ein erhöhtes zirkulierendes YB-1 im Serum verschiedener Tumorpatienten gefunden werden [242]. Die Expression von YB-1 in Tumorgewebe korreliert mit dem *Grading* [243-246], der Invasivität [245-249], Metastasierungswahrscheinlichkeit [247, 248, 250, 251] und der Rezidivrate [252, 253] verschiedener Neoplasien. Eine ausführliche Darstellung der Rolle von YB-1 in neoplastischen Erkrankungen erfolgt im *Review* von Alkrekshi *et al.* [176]. Frühe Untersuchungen zu YB-1 in Tumorerkrankungen erfolgten in Mammakarzinomzellen. Bargou *et al.* zeigten, dass die Behandlung der Mammakarzinom-Zelllinie MCF-7 mit Doxorubicin zur nukleären Translokation von YB-1 mit gesteigerter P-Glykoprotein-Expression und konsekutiver Therapieresistenz führte [254]. In humanen KB-Zellen erfolgte die Aktivierung des *Mdr-1*-Gens insbesondere durch zytotoxischen Stress [255, 256]. Dieser ist in der Lage zur Trunkierung, Phosphorylierung und nukleären Translokation von YB-1 zu führen [213, 215, 257, 258]. Die Steigerung der YB-1-Phosphorylierung konnte nach Behandlung von Prostatakarzinomzellen mit Taxanen durch eine Aktivierung des MAPK-Signalwegs erklärt werden [259]. Auch in KRAS-mutierten Kolonkarzinomzellen erfolgte die YB-1-Phosphorylierung über den MAPK-Signalweg. Die alleinige Inhibition des MAPK-Wegs führte in diesen Zellen jedoch zu einer reflektorischen Aktivierung des PI3K-Signalwegs, sodass nur die kombinierte Inhibition beider Signalwege einen antiproliferativen Effekt erzielen konnte [260]. In Gewebeproben von Mammakarzinom-Patientinnen ließ sich zudem eine Assoziation von höheren mRNA-Leveln von YB-1 mit einer schlechteren histologischen Tumordifferenzierung und einer verkürzten progressionsfreien Überlebensdauer herstellen [261]. In einer kleineren Studie mit

postoperativen Patientinnen zeigten höhere YB-1-Expressionslevel im Tumorgewebe ein höheres 5-Jahres-Rezidivrisiko an [262]. In Lungenkarzinomzellen korrelierten insbesondere nukleäre YB-1-Level mit der histologischen Ausdehnung (T-Stadium), der Wahrscheinlichkeit eines Lymphknotenbefalls und der Überlebensrate [237]. Eine Studie an 124 Patienten mit einem Kolonkarzinom im UICC-Stadium III zeigte ebenfalls, dass die nukleäre YB-1-Expression einen unabhängigen Marker für das rezidivfreie und das Gesamtüberleben darstellt [263]. Untersuchungen in Prostatakarzinomzellen belegen, dass die gesteigerte Invasivität und Metastasierungsrate bei YB-1-Überexpression durch die Regulation der E-Cadherin-Expression und der Förderung der epithelial-mesenchymalen Transition (EMT) zu erklären ist [245]. Dabei reguliert YB-1 die Expression von Adhäsionsmolekülen in Mammakarzinomzellen über die Aktivierung der Translation von Transkriptionsfaktoren wie *Snail-1*, welche zur vermehrten Expression mesenchymaler Gene beitragen [264]. In Nasopharynx- und Lungenkarzinomzellen führte der Einfluss von TGF- β zur Überexpression von YB-1 mit nachfolgender Einleitung der EMT [251, 265]. Weiterhin reguliert YB-1 das Tumorwachstum über die Förderung der Angiogenese. In Sarkomzellen konnte anhand eines Reporter-Assays demonstriert werden, dass YB-1 die Translation des Transkriptionsfaktors HIF-1 α reguliert, welcher bekanntermaßen zur verstärkten Expression von VEGF beiträgt und im Xenotransplantationsmodell mit Sarkomzellen zur gesteigerten Gefäßeinsprossung im Tumorgewebe führt [250]. Die Expression von VEGF in Blasenkarzinomzellen wird durch YB-1 zudem über die Repression der miRNA-29b-3p gesteuert [206]. Untersuchungen in Mammakarzinomzellen demonstrieren darüber hinaus, dass YB-1 an der Sekretion von lnc-RNA beteiligt ist, welche von Endothelzellen internalisiert wird und daraufhin die Angiogenese anregt [266].

1.3. Zielstellung

Die therapeutischen Möglichkeiten, welche bei MPN zur Remissionsinduktion führen, sind limitiert. Insbesondere für MF-Patienten ist diese zur Vermeidung sekundärer Komplikationen jedoch erstrebenswert. Ausgehend vom Prinzip der „synthetischen Letalität“ sollten im Rahmen dieser Arbeit neue therapeutische Angriffspunkte bei myeloproliferativen Erkrankungen identifiziert werden, welche in Kombination mit dem JAK-Inhibitor Ruxolitinib in der Lage sind zu einer Reduktion der Allellast zu führen. Für das Kälteschockprotein YB-1 konnte in zahlreichen neoplastischen Erkrankungen ein onkogenes Potenzial nachgewiesen werden. In den Voruntersuchungen unserer Gruppe konnte YB-1 als differenziell phosphoryliertes und hoch exprimiertes Protein in MPN-Zellen, die die JAK2V617F-Treibermutation tragen, nachgewiesen werden. Daher war es unser Ziel die Gruppe der Kälteschockproteine, speziell aber die Rolle von YB-1 in der Biologie von myeloproliferativen Neoplasien zu verstehen. Insbesondere sollte untersucht werden, ob die Inaktivierung von YB-1 in MPN-Zellen zur Sensitivierung gegenüber Ruxolitinib führen kann.

2. Material und Methoden

2.1. Organismen

2.1.1. Zelllinien

Zelllinie	Beschreibung	Herkunft
Ba/F3 (murin)	Pro-B-Zelllinie, aus C3H-Mäusen	DSMZ
HEL (human)	aus AML M6, homozygot für JAK2V617F	DSMZ
SET-2 (human)	aus ET in Blastenphase, heterozygot für JAK2V617F	DSMZ
293T (human)	embryonale Nierenzellen, lentivirale Replikation durch Expression des SV40 large T-Antigen	DSMZ
Phoenix (human)	basierend auf 293T, Expression von gag/pol und eco-env	Armstrong, Dana-Farber Cancer Institute Boston
Ba/F3 EpoR JAK2 V617F bzw. WT	stabil transfiziert mit pMSCV-EpoR-Neo und pMSCV-JAK2V617F/JAK2WT-Puro	AG Fischer, UKMD
Ba/F3 MPL W515L	stabil transfiziert mit pMSCV MPL W515L GFP	diese Arbeit
MOLM-13	aus AML M5a, FLT3-ITD-Mutation	DSMZ

Tabelle 2 Zelllinien

2.1.2. NSGS-Mäuse

NSGS-Mäuse (NOD-scid IL2Rgnull-3/GM/SF) aus dem Jackson Laboratory, USA sind genetisch veränderte Tiere, welche über Mutationen in den Genen für CTLA4 (*NOD*), PRKDC (*SCID*) und den IL-2-Rezeptor eine Toleranz gegenüber Fremdewebe entwickelt haben. Zusätzlich werden die humanen Zytokine IL-3, GM-CSF und SCF exprimiert, welche den Erhalt humaner hämatopoetischer Zellen begünstigen.

2.2. Patienten und Probanden

2.2.1. Materialgewinnung

Patientenproben wurden über die Hämatologische Tumorbank Magdeburg bezogen und die Referenzproben im Rahmen dieser Arbeit gesammelt. Die Entnahme der Blutproben erfolgte im informierten Einverständnis gemäß der Deklaration von Helsinki. Ein positives Ethik-Votum der Ethikkommission am Universitätsklinikum Magdeburg unter der Nr. 115/08 liegt vor.

2.2.2. Auswahl des Probandenkollektivs

Die Diagnose der Patienten wurde gemäß der WHO Klassifikation myeloider Neoplasien und akuter Leukämien [2] nach klinischen und molekulargenetischen Gesichtspunkten gesichert. Die Mutationsanalyse und die Bestimmung der Allellast wurde lokal durch das Molekulargenetische Speziallabor der Hämatologie des Universitätsklinikums Magdeburg durchgeführt.

2.3. Plasmide

Plasmid	Beschreibung	Herkunft
psPAX2	Lentivirales Verpackungsplasmid	Didier Trono (Addgene plasmid # 12260)
pMD2.G	Lentivirales Verpackungsplasmid	Didier Trono (Addgene plasmid # 12259)
M57DAW gag-pol	Retrovirales Verpackungsplasmid	Armstrong, Dana-Farber Cancer Institut, Boston
K73 Eco env	Retrovirales Verpackungsplasmid	Armstrong, Dana-Farber Cancer Institut, Boston
pMSCV MPL W515L GFP	MSCV-Vektor mit MPLW515L- und GFP-Sequenz	AG Heidel UKMD

Tabelle 3 Plasmide

2.4. Small hairpin RNA

small hairpin RNA	Sequenz	Vektor	Firma
scrambled	CCTAAGGTTAAGTCGCCCTCGCTCGAGCGAGG GCGACTTAACCTTAGG	pLKO.1 (Puro)	Broad Institute, Cambridge, USA
shYbx1_mouse 1	CCGGCATCTCTACCATCATCCGGTTCTCGAGAA CCGGATGATGGTAGAGATGTTTTTG	pLKO.1 (Puro)	Sigma-Aldrich
shYbx1_mouse 2	CCGGGAGAACCCTAAACCACAAGATCTCGAGAT CTTGTGGTTTAGGGTTCTCTTTTTG	pLKO.1 (Puro)	Sigma-Aldrich
shYBx1_human 1	CCGGCCAGTTCAAGGCAGTAAATATCTCGAGATA TTTACTGCCTTGAAGTGGTTTTTG	pLKO.1 (Puro)	Sigma-Aldrich
shYBx1_human 2	CCGGAGCAGACCGTAACCATTATAGCTCGAGCT ATAATGGTTACGGTCTGCTTTTTTG	pLKO.1 (Puro)	Sigma-Aldrich
shJak2_mouse 1	CCGGCCGTGATCTTAACAGCCTGTTCTCGAGAA CAGGCTGTTAAGATCACGGTTTTT	pLKO.1 (Puro)	Sigma-Aldrich
shJak2_mouse 2	CCGGCCTGGCAACAAGGAACATATTCTCGAGAA TATGTTCCCTGTTGCCAGGTTTTT	pLKO.1 (Puro)	Sigma-Aldrich

Tabelle 4 Small hairpin RNA

2.5. Primer

Primer	Sequenz (5' → 3')	Verwendung
Hprt mouse fw	GGACAGGACTGAAAGACTTG	qPCR
Hprt mouse rev	CGTTGACTGATCATTACAGTAGC	qPCR
HPRT human fw	CCTGGCGTCGTGATTAGT	qPCR
HPRT human rev	AGACGTTTCAGTCCTGTCCATAA	qPCR
Ybx1 mouse fw	CAGACCGTAACCATTATAGACGC	qPCR
Ybx1 mouse/human rev	ATCCCTCGTTCTTTTCCCAC	qPCR

<i>YBx1</i> human fw	TAGACGCTATCCACGTCGTAG	qPCR
<i>Ybx3</i> mouse fw	TCCTGTAGAAGGGAGTCGCTA	qPCR
<i>Ybx3</i> mouse rev	CACCAGCATTACGGGGAGG	qPCR
<i>Csde1</i> mouse fw	TGAACGGACAAGTTGTGTGC	qPCR
<i>Csde1</i> mouse rev	CCTGTTGGACTCTGACCCG	qPCR
<i>Carhsp1</i> mouse fw	TCTGTAGGGCTATTGGATACCC	qPCR
<i>Carhsp1</i> mouse rev	CAGAGGGCTAGGGACCACATT	qPCR

Tabelle 5 Primer

2.6. Reagenzien, Chemikalien, Kits und Assays

Firma	Chemikalien
Ambion by Life Technologies (USA)	Trizol
AppliChem (Deutschland)	Puromycin-Dihydrochlorit
Becton Dickinson (USA)	BD FACS™ Clean Solution, BD FACS™ Rinse Solution, BD FACS™ Flow Solution
BioLegend (USA)	Annexin V binding buffer
Bio-Rad (Deutschland)	Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate
Clontech (USA)	SYBR® Premix Ex Taq™
FISCHAR (Deutschland)	Ethanol 96%, vergällt
GE Healthcare (Deutschland)	Ficoll
Gibco™ by Life Technologies Thermo Fisher Scientific (USA)	Opti-MEM (1x), RPMI 1640 (1x), DMEM (1x), IMDM (1x), DPBS (1x), FBS, Horse Serum, Glutamin 200mM (100x), Penicillin/Streptomycin, Trypsin-EDTA (1x), Natriumpyruvat, nicht-essentielle Aminosäuren (100x)
Invitrogen™ (Deutschland)	PureLink™ HiPure Plasmid Filter Maxiprep Kit
Invivogen (USA)	Plasmocin 2,5mg/ml
Janssen-Cilag (Deutschland)	ERYPO (Erythropoietin)
MERCK (Deutschland)	Urea
Millipore (USA)	Immobilon Western HRP Substrate Peroxide solution & Luminol Reagent, Water for Molecular Biology
Peprtech (USA)	Interleukin 6
Pfizer (USA)	Hydrocortison
Promega (USA)	Fugene® HD Transfection
Qiagen (Deutschland)	Omniscript RT Kit, OligodT Primer 0,4µg/µl, Spin Miniprep Kit, ipsogen JAK2 MutaQuant Kit
Roche (Deutschland)	PhosSTOP™ EASYpack, cOmplete™

ROTH (Karlsruhe, Deutschland)	2-Propanol, Acrylamid, Agar, Albumin fraction V, Ampicillin Natriumsalz, APS, Asparagin, Bromphenolblau, Chloroform, DMSO, EGTA, Essigsäure, Ethanol, Glycerin, Glycin, Hefe, Hepes, KCl, MgCl ₂ , MgSO ₄ , Milchpulver, NaCl, NaF, NaOH, NaClO, NH ₄ Cl, Pepton/Trypton, Ponceau, SDS, TEMED
SelleckChem (USA)	Ruxolitinib
Serva (Deutschland)	Tween, Tris
Sigma-Aldrich (Deutschland)	Trypan-Blue, 2-Mercapto-Ethanol, EDTA, NH ₄ HCO ₃ , Triton
Thermo Fisher Scientific (USA)	PageRuler™ Prestained Protein Ladder 10-180 kDa PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder 10-250kDa

Tabelle 6 Reagenzien, Chemikalien, Kits, Assays

2.7. Antikörper

2.7.1. Fluorochromgekoppelte Antikörper

Antikörper	Firma
Alexa Fluor® 647 Annexin V	BioLegend (USA)
PE Annexin V®	BioLegend (USA)
SYTOX™ blue dead cell stain	Life Technologies (USA)

Tabelle 7 Fluorochromgekoppelte Antikörper

2.7.2. Primäre ungekoppelte Antikörper

Antikörper	Herkunft	Verdünnung	Träger-lösung	Firma
GAPDH	mouse	1:5000	5% BSA	Meridian Life Science
YB-1	rabbit	1:2000	5% BSA	Abcam (Großbritannien)
Cleaved Caspase-3	rabbit	1:500	5% BSA	Cell Signaling Technology
JAK2	rabbit	1:1000	5% BSA	Cell Signaling Technology
STAT5a	rabbit	1:100	5% BSA	Santa Cruz Biotechnology
ERK	rabbit	1:2000	5% BSA	Cell Signaling Technology
AKT	rabbit	1:2000	5% BSA	Cell Signaling Technology
STAT3	mouse	1:1000	5% BSA	Cell Signaling Technology
pYB-1 Ser102	rabbit	1:1000	5% BSA	Cell Signaling Technology
pJAK2 Tyr1007/1008	rabbit	1:1000	5% BSA	Cell Signaling Technology
pSTAT5a/b Tyr694/699	mouse	1:1000	5% BSA	Millipore
pERK Thr202/Tyr204	mouse	1:2000	5% BSA	Cell Signaling Technology
pAKT Ser473	rabbit	1:1000	5% BSA	Cell Signaling Technology
pSTAT3 Ser727	rabbit	1:1000	5% BSA	Cell Signaling Technology

Tabelle 8 Primär ungekoppelte Antikörper

2.7.3. Sekundäre HRP-gekoppelte Antikörper

Antikörper	Verdünnung	Trägerlösung	Firma
Goat anti-mouse IgG HRP	1: 2000	5% Milch	Santa Cruz Biotechnology
Goat anti-rabbit IgG HRP	1: 2000	5% Milch	Santa Cruz Biotechnology

Tabelle 9 Sekundäre HRP-gekoppelte Antikörper

2.8. Geräte

Firma	Gerät
Becton Dickinson	FACS Canto™ II
BINDER	CO ₂ -Inkubator
Bio-Rad	C1000 Touch Thermal Cycler CFX96 Real-Time System, PowerPac™ HC,
BioSan	Environmental Shaker-Incubator ES-20
Eppendorf	Centrifuge 5415R, Pipetten
Gamma-Service Medical GmbH	Biobeam 2000
Gilson	PIPETMAN® Classic 1000µl, 200µl, 20µl
Hirschmann	Pipetus®
hund Wetzlar	Mikroskop: Wilovert 30
IKA	Schüttler KS 4000 i control
INTEGRA Biosciences	Pipetboy 2
Mariefeld	Neubauer Zählkammer
neoLab	Zentrifuge mit Vortexer, Rollmischer, Vortex mixer, SHAKER DOS-10L
PeqLab	Peqstar Chemilumineszenz-Detektionsgerät, Heizblock
SHP Steriltechnik AG	Laboklav
TECAN	TECAN sunrise
Thermo Scientific	Heraeus Fresco 17, MultifugeX3R, Multifuge3SR, MultifugeX1R, HERA safe, Maxisafe 2020, NanoDrop2000 Spectrophotometer, Wasserbad SWB25, Heraeus Mikrobiologischer Brutschrank Typ B 6030
VWR	Stickstofftank
Wesemann	Tischabzüge
Zeiss	Mikroskop: Primo Vert

Tabelle 10 Geräte

2.9. Materialien und Hilfsmittel

Firma	Gerät
Becton Dickinson	Vacutainer Safety-Lok blood collection set, Vacutainer Lithium Heparin LH 68 I.U., Vacutainer One-Use Holder, 20ml Discardit II Spritze
Bio-Rad	Filz, Glasscheiben, Mini-PROTEAN Tetra Cell Elektrophorese-Zubehör, Mini Trans-Blot Module Western Blot-Zubehör, Multiplate PCR Plate
BRAND	Pasteur-Pipetten
Braun	Omnifix 40 Solo
Campingaz	Bunsenbrenner
Corning	Tissue culture dish 100x20mm FALCON
Eppendorf	1,5ml Safe-Lock Tubes, 2ml Safe-Lock Tubes, epT.I.P.S. Standard 50-1000µl, epT.I.P.S. Standard 10-100µl, epT.I.P.S. Standard/Bulk 0,5-20µl
Fuhrmann	Schlinggazetupfer
GE Healthcare	Amersham Protran 0,45 µm Nitrocellulose
Greiner bio-one	CELLSTAR TUBES 15ml, 50ml, CELLSTAR 24 well suspension culture plate, serologische Pipetten 10ml, 25ml,
Kisker Biotech	Quali-PCR-Tubes
Roth	unsterile 96-well-Platten, Impfösen, Aluminium-Folie, Tough-Tags
SARSTEDT	0,5ml SafeSeal Reagiergefäß, TC-Flasche T25, Suspen., Bel. K., TC-Flasche T75, Suspen., Bel. K., TC-Flasche T175, Susp., Bel. K., TC-Platte 6 Well, Suspension F, serologische Pipetten 5ml
Sigma-Aldrich	Gel Blot Paper 15x20cm
Simport	Cryo vials T311-1 1,2ml
VWR	Round-bottom Tubes, Spritzenvorsatzfilter 0,45µm, Cell scraper multi-position blade

Tabelle 11 Materialien und Hilfsmittel

2.10. Puffer, Lösungen, Gele und Medien

Lösung/Puffer/Medium	Ingredienzien	Verarbeitung
SOC-Medium	-0,5g Hefe 0,5% -2g Trypton 2% -0,05g NaCl 10mM -0,36g Glucose 20mM -0,02g MgCl ₂ 10mM -0,09g MgSO ₄ 10mM -0,25g KCl 2,5mM -ad 100ml vollentsalztes Wasser	Das SOC-Medium wurde autoklaviert und bei 4°C gelagert.

LB-Medium	-10g Pepton/Trypton -5g Hefeextrakt -5g NaCl -ad 1000ml vollentsalztes Wasser	Anschließend wurde Ampicillin in einer Endkonzentration von 50µg/ml hinzugefügt.
Agar	-10g Pepton/Trypton -5g Hefe -5gNaCl -15g Agar -ad 1000ml vollentsalztes Wasser	Anschließend wurde Ampicillin in einer Endkonzentration von 50µg/ml hinzugefügt.
Japan-Puffer	-25ml Hepes-Puffer (1M) -57,47ml Glycerol 86% -4,38g NaCl -4,57ml Triton -0,75 ml MgCl ₂ (1M) -12,25 ml EGTA (0,2M) -ad 500ml vollentsalztes Wasser	Der pH wurde auf 8 eingestellt.
Lysepuffer	-1ml Japan-Puffer -40µl cOplete® -10µl NaF 1M	
10x Western Blot Puffer	-30,25g Tris -144g Glycin -10g SDS -ad 1000ml vollentsalztes Wasser	Zur Herstellung des Laufpuffers (1x) wurde der 10x Western Blot-Puffer mit vollentsalztem Wasser verdünnt.
10x Transferpuffer	-32g Tris -144g Glycin -ad 1000ml vollentsalztes Wasser	Zur Herstellung des Transferpuffers (1x) wurde der 10x Transferpuffer mit vollentsalztem Wasser (74%) und Ethanol (16%) verdünnt.
10x TBST-Puffer	-100ml Tris (1M) -300ml NaCl (5M) -5ml Tween -ad 1000ml vollentsalztes Wasser	Zur Herstellung des Waschpuffers(1x) wurde der 10x TBST-Puffer mit vollentsalztem Wasser vedünnt.

Stripping-Puffer	-7,57g Tris -20g SDS -7ml Mercaptoethanol -ad 1000ml vollentsalztes Wasser	
2x Ladepuffer	-24,024g Urea 4M -2g SDS 2% -0,756g Tris -ad 1000ml vollentsalztes Wasser	Der pH der Lösung wird anschließend auf 6,8 eingestellt.
4x Ladepuffer	-12,5ml Tris 1M pH 6,8 -4g SDS -2mg Bromphenolblau -20ml Mercaptoethanol -ad 100ml vollentsalztes Wasser	
10x Erylyse-Puffer	-1,98g Ammoniumbicarbonat -20,73g Ammoniumchlorid -500 μ l EDTA 0,5M pH 7,4 -ad 250ml vollentsalztes Wasser	Der pH wurde auf 7,4 eingestellt. Der Puffer wurde steril filtriert, im Verhältnis 1:10 verdünnt und bei 4°C gelagert.
Additiva	-200ml DPBS -175 μ l Mercaptoethanol -100ml HEPES-Puffer 1M pH 7,2 -100ml Natriumpyruvat 100mM -100ml L-Glutamin 200nM -60ml nicht-essentielle Aminosäuren 10x -20ml Asparagin 10mg/ml	Die Inhaltsstoffe wurden zusammen steril filtriert und bei 4°C gelagert.

Tabelle 12 Lösungen, Puffer und Medien

Ampicillin-Stammlösung

Zur Herstellung der Stammlösung wurde das Ampicillin in 50% Ethanol und Wasser gelöst, um eine Konzentration von 50mg/ml zu erzielen und anschließend bei -20°C gelagert.

Puromycin-Stammlösung

Zur Herstellung der Stammlösung wurde das Puromycin in Wasser gelöst, um eine Konzentration von 1mg/ml zu erzielen. Diese Lösung wurde anschließend bei -20°C gelagert.

Gel	Ingredienzien
Trenngel 8%	-4,6ml vollentsalztes Wasser -2,7ml Acrylamid -2,5ml Tris 1,5M pH 8,8 -100 μ l 10% SDS - 100 μ l 10% APS -10 μ l TEMED
Trenngel 15%	-2,3ml vollentsalztes Wasser -5ml Acrylamid -2,5ml Tris 1,5M pH 8,8 -100 μ l 10% SDS -100 μ l 10% APS -10 μ l TEMED
Sammelgel 5%	-3,4ml vollentsalztes Wasser -830 μ l Acrylamid -630 μ l Tris 1M pH 6,8 -50 μ l 10% SDS -50 μ l 10% APS -5 μ l TEMED

Tabelle 13 Elektrophorese-Gele

Zelllinie	Ingredienzien	Verarbeitung
Ba/F3 parental	-500ml RPMI 1640	Ba/F3 JAK2WT-Zellen wurden mit 1U/ml Epo kultiviert. Ba/F3 parental-Zellen wurden mit Interleukin 3 (Überstand von WEHI-3B-Zellen) kultiviert.
Ba/F3 JAK2V617F	-50ml bzw. 100ml (SET-2) FBS	
Ba/F3 JAK2WT	-5ml PEN/STREP	
Ba/F3 MPLW515L	-29ml Additiva	
HEL	100 μ l Plasmocin-Stammlösung	
SET-2 MOLM-13		
Phoenix 293T Virusproduktion	-500ml DMEM -50ml FBS -5ml PEN/STREP -5ml L-Glutamin 2 mM -100 μ l Plasmocin -500 μ l NaOH 1M -5ml HEPES-Puffer pH 7,4	

Tabelle 14 Zellkulturmedien

2.11. Arbeitstechniken

2.11.1. Zellkultur

2.11.1.1. Kultivierung

Alle verwendeten Zelllinien wurden im Inkubator bei 37°C, mit 95% Luftfeuchtigkeit und einer konstanten CO₂-Konzentration von 5% nach Hinweisen des DSMZ für max. 8 Wochen kultiviert.

2.11.1.2. Kryokonservierung

Für die dauerhafte Konservierung wurden 1,5x10⁶ Zellen in 800µl ihres Mediums aufgenommen, 100µl FBS und 100µl DMSO hinzugefügt und in speziellen Cryo Vials für zunächst 2 Tage bei -80°C und anschließend im Flüssigstickstoff gelagert.

2.11.1.3. Retrovirale & Lentivirale Transfektion

Es wurden jeweils 2x10⁶ Zellen der Verpackungszelllinien Phoenix (retrovirale Transfektion) oder 293T (lentivirale Transfektion) in 10cm Kulturschalen ausgesät und für 24h kultiviert. Bei einer Konfluenz der Phoenix-Zellen von 70-80% bzw. der 293T-Zellen von 60-70% erfolgte die Transfektion. Dazu wurden die Verpackungsplasmide, das Zielplasmid, das Transfektionsreagenz und das Transfektionsmedium nach folgendem Schema zusammenpipettiert und nach kurzer Durchmischung mit dem Vortexmischer für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Ingredienzien	Retrovirale Transfektion	Lentivirale Transfektion
Verpackungsplasmide	M57DAW gag-pol: 10µg K73 Eco envelope: 3µg	psPAX2: 3µg pMD2.G: 3µg
Zielplasmid	10µg	3µg
Transfektionsreagenz (FuGENE, Promega)	69µl	27µl
Transfektionsmedium (Opti-MEM, Gibco by Life Technologies)	ad 600µl	ad 600µl

Tabelle 15 Ansatz retro- und lentivirale Transfektion

Die Lösung wurde tropfenweise in das Medium der Verpackungszellen gegeben und diese bis zum folgenden Tag im Inkubator belassen. 24h nach der Transfektion wurde das Medium gewechselt. 16 Stunden später wurde das virushaltige Medium entnommen und mit Hilfe eines Spritzenvorsatzfilters (0,45µm) gefiltert und anschließend bei -80°C gelagert oder sofort zur Infektion benutzt. Die Zellen wurden daraufhin mit 10ml frischen Virusmediums benetzt und für weitere 8h im Inkubator gelagert, um danach eine zweite Virusernte durchzuführen. Die Zellen wurden nach der letzten Ernte mit Natriumhypochlorit durch dessen viruzide Wirkung inaktiviert und entsorgt.

2.11.1.4. Infektion von Suspensionszellen mit viralen Partikeln

Es wurden 2×10^6 Zielzellen in 1ml ihres Mediums aufgenommen und in eine 6-Well-Platte überführt. Die Zellen wurden mit 3ml des geernteten Virusmediums vermischt und für 90min bei 500xg und einer Temperatur von 33°C zentrifugiert. 16-18h nach der Infektion wurden die Zellen wieder in ihr Kulturmedium aufgenommen und auf die übliche Weise kultiviert. 48 Stunden nach der Infektion wurde mit dem Selektionsprozess begonnen. Die lentiviral infizierten Zellen konnten aufgrund eines im Transferplasmid enthaltenen Puromycinresistenzgens mit 1,5µg/ml Puromycin selektioniert werden. Die retroviral infizierten Zellen konnten durch die anschließende Überexpression des mutierten Thrombopoietin-Rezeptors durch Wachstumsfaktorentzug selektioniert werden.

2.11.2. Bakterienkultur

2.11.2.1. Transformation von Plasmiden

Das SOC-Medium wurde zunächst auf 37°C erwärmt und die TOP10-Bakterien auf Eis aufgetaut. Es wurden 0,5µl der gewünschten Plasmid-DNA in 50µl Bakterien pipettiert, die Suspension leicht geschwenkt und für 30min auf Eis gelagert, danach für 30sec bei 42°C im Thermoblock inkubiert und schließlich wieder für 2min auf Eis gelagert. Nach Hinzufügen von 250µl des angewärmten SOC-Mediums wurden die Proben für 1h bei 37°C und 220rpm im Schüttler inkubiert. 100µl der Bakteriensuspension wurden auf einer ampicillinhaltigen Agarplatte verteilt und für 16 Stunden bei 37°C inkubiert.

2.11.2.2. Animpfen von Bakterienkolonien

Mit einer Impföse wurde eine Einzelkolonie auf der inkubierten Agarplatte erfasst und in 7ml ampicillinhaltiges LB-Medium überführt. Die Reaktionsgefäße wurden locker verschlossen und für 12-16h bei 37°C und 225rpm im Schüttler inkubiert. Das Sediment der Kultur wurde für die Plasmid-DNA-Extraktion mit dem Spin MiniPrep Kit® verwendet. Bei Bedarf einer größeren DNA-Menge wurde die Kultur für 8h inkubiert und 2ml dieser Kultur in 200ml ampicillinhaltigen LB-Mediums überführt. Nach einer erneuten Inkubation für 16h konnte das Sediment für die Extraktion der Plasmid-DNA mit dem Hi Pure Plasmid Filter Maxiprep Kit® genutzt werden. Die DNA wurde in sterilem, vollentsalztem Wasser aufgenommen und bei -20°C gelagert.

2.11.2.3. Kryokonservierung in Glycerol

Zur Konservierung der Bakterien wurden 500ml der zuvor beschriebenen Kultur in einem Verhältnis von 1:1 mit 86% Glycerol in einem Cryo Vial bei -80°C aufbewahrt.

2.11.3. Molekularbiologische Arbeitstechniken

2.11.3.1. Präparation der mRNA

Die mRNA wurde nach der TRIzol-Methode isoliert, welche eine Erweiterung der single step RNA-Isolationsmethode von Chomczynski und Sacchi darstellt. [267]

Die Zellen wurden in 1ml TRIzol-Reagenz aufgenommen und bei -80°C gelagert oder unverzüglich aufgearbeitet. Zur Separation der Zellbestandteile wurde dem Gemisch $200\mu\text{l}$ Chloroform hinzugefügt, das Gefäß für mehrere Sekunden geschwenkt und anschließend für 2-3min bei Raumtemperatur inkubiert, bevor eine Zentrifugation für 15min bei 4°C und 12.000xg erfolgte. Die obere wässrige Phase mit enthaltener RNA wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit Isopropanol und Ethanol präzipitiert. Nach der Zugabe von $500\mu\text{l}$ Isopropanol, einer erneuten 10-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur und einem anschließenden Zentrifugationschritt von 10min bei 4°C und 12.000xg wurde der Überstand verworfen und das Sediment durch Hinzufügen von 1ml 75% Ethanol weiter aufgereinigt. Der ethanolhaltige Überstand wurde nach einer weiteren Zentrifugation von 5min bei 4°C und 7.500xg entfernt und die präzipitierte RNA für einige Minuten getrocknet. Diese wurde in $20\mu\text{l}$ RNase-freies Wasser aufgenommen und bei -80°C gelagert.

2.11.3.2. cDNA-Synthese

Zur Synthese der cDNA wurden $2\mu\text{g}$ der RNA der Kulturzellen bzw. $1\mu\text{g}$ der RNA aus primären Zellen genutzt. Die RNA wurde zunächst für 5min bei 65°C denaturiert. Die Umschreibung der nun denaturierten RNA in cDNA erfolgte mit dem Omniscript RT Kit (Qiagen), wobei die enthaltenen Komponenten jedem Ansatz in folgenden Mengen zugefügt wurden:

Buffer RT	$2\mu\text{l}$
dNTP	$2\mu\text{l}$
OligodT	$1,25\mu\text{l}$
Reverse Transkriptase	$1\mu\text{l}$
Wasser	ad $20\mu\text{l}$

Tabelle 16 Ansatz für cDNA-Synthese

Durch eine einstündige Inkubation bei 37°C wurde schließlich die cDNA-Synthese eingeleitet, welche anschließend bei -20°C gelagert wurde.

2.11.3.3. qPCR

Jeder Probenansatz wurde nach folgendem Schema hergestellt:

cDNA	1 μ l
Primer-Ansatz (5pmol/ μ l)	1,6 μ l
SYBR Premix Ex Taq II®	10 μ l
Wasser	7,4 μ l

Tabelle 17 Ansatz für qPCR

Die cDNA aus den Zelllinien wurde in Triplikaten und diejenige aus den humanen Blutproben in Duplikaten pipettiert. Zur Vervielfältigung der cDNA wurden die untenstehenden Zyklen im Thermocycler durchlaufen.

initiale Denaturierung:	95°C, 10sec	Wiederholung der Zyklen 49x
Denaturierung der neu synthetisierten DNA:	95°C, 5sec	
Annealing:	60°C, 20sec	
Elongation:	72°C, 15sec	
Schmelzkurve:	65°C, 5sec	
	95°C, 5sec	

Tabelle 18 qPCR-Zyklen

Zur Quantifizierung der interessierenden cDNA-Moleküle wurde das Δ CT-Verfahren angewendet. Die Expression des Zielgens wurde schließlich zu der Expression des Haushaltsgens Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase 1 (HPRT1), dessen Expression als stabil angenommen wurde, normalisiert. Im Falle der genannten Zelllinien wurde zur Ermittlung der Expression das Programm Biorad CFX-Manager zu Hilfe genommen.

Für die Berechnung der Expression in den humanen Proben wurde zusätzlich eine Standardreihe benutzt. Die cDNA der Standardreihe wurde aus der RNA der AML-Zelllinie MOLM-13 gewonnen, welche in den Verdünnungen 1: 10, 1: 20, 1: 100 und 1: 200 angesetzt wurde.

Die Expression des Zielgens wurde zur Expression des Haushaltsgens HPRT1 nach der Δ CT-Methode normalisiert.

$$\Delta\text{CT}_{\text{Zielwert}} = \text{CT}_{\text{Zielgen}} - \text{CT}_{\text{HPRT}}$$

Die Δ CT-Werte wurden dabei für jedes Duplikat bestimmt.

Die selbe Berechnung wurde für die Messwerte der Standardreihe vorgenommen und anschließend der Mittelwert der Δ CT-Werte jeder Verdünnung ermittelt.

Die Standardisierung der Werte wurde im Anschluss wie folgt vorgenommen:

$$\Delta\Delta\text{CT} = \Delta\text{CT}_{\text{Zielwert}} - \Delta\text{CT}_{\text{Standard}}$$

Anschließend wurde die relative Expression bestimmt, die die exponentielle Amplifikation während der PCR berücksichtigt. $RE = 2 + e^{-\Delta\Delta CT}$

2.11.3.4. Bestimmung der JAK2V617F-Allellast mittels qPCR

Die Bestimmung der JAK2V617F-Allellast in PBMCs von Patienten wurde im Voraus von Corinna Fahldieck mit Hilfe des ipsogen JAK2 MutaQuant Kit® (Qiagen) vorgenommen.

2.11.4. Durchflusszytometrie

2.11.4.1. Färbung mit Annexin V und Sytox™

Für den Apoptose-Assay wurden jeweils 50.000 Zellen in 1ml Kulturmedium in einer 24-well-Platte ausgesät und die Behandlung mit DMSO (1:1000), 100nM Ruxolitinib und 500nM Ruxolitinib vorgenommen. Zu zwei Zeitpunkten (24 und 48 Stunden nach Behandlungsbeginn) wurden die Zellen geerntet, in 100µl Annexin *Binding Buffer* resuspendiert und jede Probe mit 2,5µl des Annexin V-Antikörpers für 15 Minuten inkubiert. Anschließend wurde das Probenvolumen mit 200µl des Annexin *Binding Buffers* expandiert. Direkt vor der Messung wurde jeweils 1µl der 1:10 verdünnten Sytox blue™-Lösung zu jeder Probe hinzugefügt.

2.11.5. Proteinbiochemie

2.11.5.1. Gewinnung der Proteinlysate

Initial wurden 5×10^6 Zellen eingesetzt, die in 5ml ihres Mediums mit 500nM Ruxolitinib oder DMSO (1: 1000) behandelt wurden. Anschließend wurden die Zellen mit 4°C kaltem PBS gewaschen und in 150µl Lysepuffer resuspendiert. Jeder Probe wurden 30µl PhosStop™ (Roche) hinzugefügt. Die Proben wurden für 30min auf Eis gelagert und im Folgenden für 10min bei 16.200xg zentrifugiert, sodass der Überstand, der die Proteinfraction enthielt, abgenommen und bei -80°C gelagert werden konnte.

2.11.5.2. Messung der Proteinkonzentration

Die Messung der Proteinkonzentration erfolgte photometrisch nach der Bradford-Methode mittels Coomassie-Brillantblau im Vergleich zu einer BSA-Verdünnungsreihe. Für die Messung wurden von jeder Konzentration der Standardreihe 2µl und 1µl der Proteinprobe eingesetzt, wobei diese jeweils im Duplikat pipettiert wurden. Den Proben wurden 200µl der 1:5-verdünnten Messlösung hinzugefügt und die Absorption bei einer Wellenlänge von 590nm im TECAN sunrise bestimmt.

2.11.5.3. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Für die Gelelektrophorese nach Laemmli wurden 40µg der gewünschten Proteinprobe eingesetzt. Zur Proteindenaturierung wurden die Proben mit den beiden Ladepuffern auf ein Gesamtvolumen von 40µl aufgefüllt (es wurden stets 10µl vom 4x Ladepuffer eingesetzt) und für 5min auf 95°C

erhitzt. $39\mu\text{l}$ jeder Probe und $7\mu\text{l}$ des Größenmarkers wurden in die Taschen des Sammelgels geladen und zunächst eine Spannung von 80V angelegt. Nach der Passage des Sammelgels wurde die Spannung auf 100V erhöht.

2.11.5.4. Western Blot

Im Anschluss an die Gelelektrophorese wurden die Proteine elektrophoretisch auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Dazu wurden Gel und Membran zwischen Filterpapier eingebettet. Dieses sogenannte „*Blotting*“ erfolgte für 1,5h bei einer angelegten Spannung von 100V unter kontinuierlicher Kühlung der Elektrophoresekammer. Anschließend wurde die Membran aus dem System entnommen und mit *Ponceau* gefärbt.

2.11.5.5. Immunodetektion

Im Anschluss an den Western Blot wurde die Membran für 1h im Blockingpuffer (5% Milchpulver in Waschpuffer) auf dem Schüttler inkubiert. Die entsprechenden Membranabschnitte wurden anschließend ü.N. in einer Lösung aus 5% BSA, Waschpuffer und dem Primärantikörper auf dem Rollmischer im Kühlschrank gelagert. Für die Immunodetektion wurden die Membranen für 1h im peroxidasegekoppelten Sekundärantikörper auf dem Schüttler inkubiert und anschließend in einer luminolhaltigen Lösung geschwenkt. Die entstandenen Lichtquanten wurden mit einer Kamera detektiert. Nach der Detektion der phosphorylierten Proteine wurden die gebundenen Antikörper durch die 15-minütige Inkubation der Membran im Stripping-Puffer bei 50°C entfernt. Die Membran wurde danach zur Detektion von Proteinen ähnlicher Größe weiterverwendet.

2.11.6. Primäres Zellmaterial

2.11.6.1. Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation

Das heparinisierte Blut wurde im Verhältnis 1:1 mit DPBS (+1%FBS) aufgefüllt, langsam über die Ficoll-Lösung geschichtet und anschließend für 30min bei $500\times g$ und 20°C ohne den Einsatz der Bremse zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurden die mononukleären Zellen im „*buffy coat*“ mit der Pipette abgenommen und erneut bei $200\times g$ zentrifugiert, in 2ml Erylyse-Puffer aufgenommen und für 4min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zellen wurden in DPBS (+1%FBS) gewaschen und in 1ml Trizol aufgenommen.

2.11.7. Xenotransplantation

HEL-Zellen wurden mit shRNA-Konstruktion gegen die mRNA von YB-1 oder einer ungerichteten Kontrolle transfiziert. Nach 72 Stunden wurden 1×10^6 Zellen in $100\mu\text{l}$ DPBS (+1%FBS) aufgenommen und auf Eis gelagert. NSGS-Mäuse wurden mit einer subletalen Dosis von 2 Gy bestrahlt und anschließend die Injektion von 1×10^6 HEL-Zellen pro Tier in die Kaudalvene vorgenommen. Die Tiere wurden kohortiert und nach fünf Tagen einer Behandlung mittels oraler

Gavage zugeführt. Dabei wurden an fünf aufeinanderfolgenden Tagen 90mg/kg Ruxolitinib oder ein äquivalentes Volumen 0,9% Kochsalzlösung verwendet.

2.11.8. Datenauswertung und Statistik

Die Auswertung der erhobenen Rohdaten erfolgte mittels nachfolgender Software:

Programm	Anwendung
Magellan V6.5 Bradford 0	Photometrische Bestimmung der Proteinkonzentration
FlowJo Version 8.8.6.	Analyse durchflusszytometrischer Daten
ImageJ Version 2006.02.01	Schneiden und Bearbeiten der Western Blot-Daten
Fusion, Vilber Lourmat	Chemilumineszenz-Detektion
BD FACSDIVA™ SOFTWARE	Erhebung durchflusszytometrischer Daten
Biorad CFX Manager	Erhebung und Auswertung von qPCR-Daten
GraphPad Prism 5 und 9	Graphische Darstellung und Statistische Auswertung
NanoDrop 2000 Software	Bestimmung der RNA- und DNA-Konzentration
Microsoft Excel, Office 2003	Sammlung und Auswertung von Daten
Apple Pages 5.5.	Verfassung der Dissertation
Apple Numbers 3.5.	Sammlung und Auswertung von Daten
IBM SPSS	Statistische Auswertung
Image Studio Lite Version 5.2.5.	Schneiden und Bearbeiten der Western Blot-Daten
BioRender.com	Illustrationen

Tabelle 19 Verwendete Software

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte unter Zuhilfenahme des Programms GraphPad Prism 9. Die verwendeten Testprinzipien sind in der Beschreibung der jeweiligen Abbildungen genannt. Die Auswertung der Apoptose-Assays erfolgte mit einem einseitigen t-Test. Die PCR-Daten von Patienten und gesunden Probanden wurden mit dem Kruskal-Wallis-Test analysiert. Zum Mittelwertvergleich zwischen den Subgruppen wurden der Dunn's-Test angewendet. Zur Analyse der gepaarten Daten nach Ruxolitinib-Behandlung diente der Wilcoxon-Test. Die Korrelationsanalyse erfolgte bei metrisch skalierten Datensätzen mit dem Pearson-Test und für ordinale Werte mit dem Spearman-Test. Zur Analyse der Kaplan-Meier-Überlebenskurven kam der Log-rank-Test zur Anwendung. Für alle verwendeten Tests wurde ein Signifikanzniveau von 5% angenommen. Ein Unterschied zwischen den untersuchten Gruppen wurde demnach bei $p \leq 0,05$ als statistisch signifikant (gekennzeichnet mit *), bei $< 0,01$ als sehr signifikant (gekennzeichnet mit **) und von $< 0,001$ als hoch signifikant (gekennzeichnet mit ***) gewertet.

3. Ergebnisse

3.1. Das Kälteschockprotein YB-1 ist in JAK2-mutierten Zellen verstärkt exprimiert

Um die Bedeutung von Kälteschockproteinen in myeloproliferativen Neoplasien zu analysieren, sollte zunächst deren Expressionslevel in MPN-Zelllinien untersucht werden. Als Zellmodell diente uns dabei eine etablierte murine hämatopoetische Zelllinie, die Pro-B-Zelllinie Ba/F3. Da die V617F-mutierte Januskinase die Assoziation zu einem Typ-I-Zytokinrezeptor benötigt, um zu einem faktorunabhängigen Wachstum von Zellen führen zu können [38], nutzten wir für unsere Experimente Zelllinien, welche zuvor stabil mit dem Erythropoietinrezeptor EpoR und der mutierten Kinase transfiziert worden waren. Als Vektor-Rückgrat diente dabei das retrovirale Vektorsystem MSCV. Es zeigte sich, dass Ba/F3 EpoR JAK2V617F-Zellen ohne Zusatz von Wachstumsfaktoren kultiviert werden konnten. Als Normalkontrolle führten wir eine Zelllinie mit JAK2-Wildtyp-Überexpression mit, die die Substitution von Erythropoietin (1U/ml) benötigte.

Die Familie der Kälteschockproteine mit dazugehörigen Genen, welche in Klammern genannt sind, besteht aus den Mitgliedern YB-1 (*Ybx1*), DbpC (*Ybx2*), DbpA (*Ybx3*), CARHSP1 (*CARHSP1*), PIPPin (*CSDC2*), UNR (*CSDE1*) und LIN28 (*LIN28*). Für *Ybx2*, *CSDC2* und *LIN28* ist eine zelltypspezifische Expression bekannt. Untersuchungen in humanen Gewebeproben zeigten, dass das Vorkommen von DbpC auf Keimzellen beschränkt ist und es nicht in Knochenmarkszellen nachgewiesen werden kann [268]. PIPPin zeigte sich in Ratten nur in Hirngewebe exprimiert [269] und LIN28 zeigt im Mausmodell in den meisten Geweben ein abnehmendes Expressionslevel während der Embryogenese [270]. Unter Verwendung verschiedener Primer-Paare konnte in Kongruenz mit der Literatur in unseren Zellmodellen keine mRNA-Expression von *Ybx2*, *CSDC2* und *LIN28* nachgewiesen werden, sodass sich die qPCR-basierte Analyse auf *Ybx1*, *Ybx3*, *CSDE1* und *CARHSP1* beschränkte. Die Daten wurden in einer *Heatmap* zusammengefasst. *Abbildung 4* zeigt die Expression in Ba/F3 EpoR JAK2V617F-Zellen gegenüber den Wildtyp-Zellen. Es wurden vier unabhängige Experimente durchgeführt. Eine konsistente Überexpression in V617F-mutierten Zellen konnte in allen Versuchen lediglich für *Ybx1* nachgewiesen werden.

Ybx1 zeigte sich im Mittel um $67 \pm 32\%$ in den JAK2V617F-mutierten gegenüber den Wildtyp-Zellen überexprimiert. Durch zwei Arbeitsgruppen konnte in der Vergangenheit zudem eine Interaktion von YB-1 mit dem JAK/STAT-Signalweg beschrieben werden. Chua *et al.* demonstrierten einen Synergismus mit dem JAK/STAT-Signalweg bei der Vermittlung von Pharmakoresistenz in Magenkarzinomzellen [271], während Lee *et al.* zeigen konnten, dass die Interaktion von YB-1 mit STAT3 in Mammakarzinomzellen zur Vermittlung antiapoptotischer Signale führt [272]. Da YB-1 auch in weiteren Daten unserer Arbeitsgruppe in myeloproliferativen Neoplasien bzw. JAK2-mutierten Zellen als hoch exprimiert und differenziell phosphoryliert beschrieben werden konnte, fokussierten wir uns im weiteren Verlauf auf YB-1.

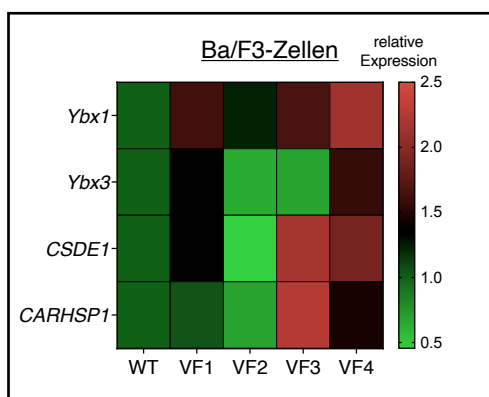


Abbildung 4. mRNA-Expression der Kälteschockproteine in JAK2-Wildtyp- und JAK2V617F-mutierten Ba/F3-Zellen. Ba/F3 JAK2-Wildtyp- und V617F-Zellen wurden in einer Dichte von 1×10^5 /ml in serumreduziertem Medium mit 0,5% FBS für 6 Stunden in einer 6-Well-Platte ausgesät. Dem Medium der Wildtyp-Zellen wurde 1U/ml Erythropoietin zugefügt. Es wurden vier unabhängige Experimente durchgeführt. Das Expressions-Level der JAK2-Wildtyp-Zellen wurden auf den Wert 1,0 normiert und die Expression in den mutierten Zellen relativ dazu dargestellt. Jede Reihe repräsentiert ein untersuchtes Kälteschockprotein, die verschiedenen Versuchsläufe sind in Spalten dargestellt. Die Farbskala dient der Darstellung der Expressionslevel. Ein Wert >1 stellt eine Überexpression im Vergleich zum Wildtyp dar, während Werte <1 eine geringere Expression ausdrücken.

Um zu überprüfen, ob sich die bisherigen Ergebnisse auf humane Zellen übertragen lassen, sollte das Expressionslevel zunächst in einer größeren Patientengruppe untersucht werden. Dazu wurden mononukleäre Zellen von 37 gesunden Probanden und 47 MPN-Patienten isoliert und die mRNA-Expression von YB-1 vergleichend in diesen humanen Zellen untersucht. Die Diagnose der MF, PV und ET war zuvor in dieser Reihenfolge bei 15, 14 bzw. 7 Patienten gestellt worden, bei vier Patienten wurde eine unklassifizierbare MPN (MPN,U) diagnostiziert. In der JAK2V617F-negativen Gruppe, welche sieben Patienten umfasste, konnten wir bei drei Patienten die MPLW515L- und bei vier Patienten die Calreticulin-Mutation nachweisen. Es zeigte sich eine signifikante Überexpression der mRNA von YB-1 in den JAK2V617F-mutierten Zellen im Vergleich zu Zellen gesunder Probanden. ($p = 0,0126$) Der Vergleich mit den JAK2-negativen MPN-Zellen ließ ebenfalls eine vermehrte Expression vermuten, wegen der geringen Fallzahl in der Gruppe der JAK2-negativen Patienten, welche sieben Probanden umfasste, ist der Expressionsunterschied hier jedoch nicht ausreichend beurteilbar. (Abbildung 5)

Aufgrund der nachgewiesenen Überexpression von YB-1 in JAK2V617F-mutierten Zellen lag die Vermutung einer Korrelation mit der JAK2V617F-Allellast nahe, sodass dieser Zusammenhang in humanen PBMCs untersucht wurde. Bei 23 Patienten war die JAK2V617F-Allellast bereits zuvor in PBMCs durch das Diagnostiklabor der Hämatologie im Rahmen der klinischen Routine bestimmt worden. In unseren analysierten Daten konnte jedoch kein linearer Zusammenhang festgestellt werden. (Abbildung 6) Bei einem Bestimmtheitsmaß R^2 von 0,109 konnten lediglich 10% der Varianz der JAK2V617F-Allellast durch das Regressionsmodell erklärt werden.

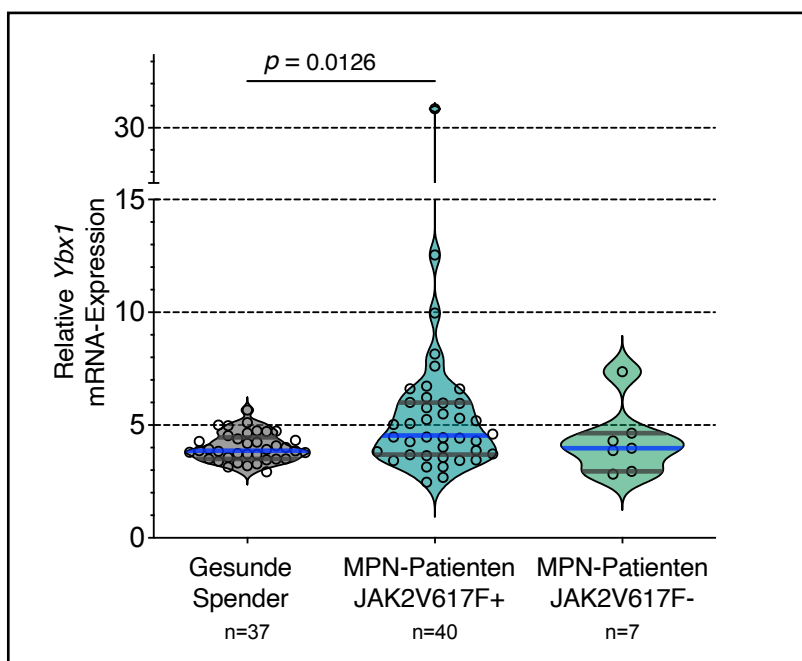


Abbildung 5. Vergleich der mRNA-Expression von YB-1 in Patienten und gesunden Spendern. Mittels Dichtegradientenzentrifugation wurden mononukleäre Zellen aus Blutproben gesunder Spender und Patienten mit diagnostizierter MPN gewonnen. In der Gruppe der JAK2V617F-negativen Patienten konnte bei drei Patienten die MPLW515L-Mutation und bei vier Patienten die Calreticulin-Mutation nachgewiesen werden. Bei keinem der Patienten war zum Zeitpunkt der Probenentnahme eine Ruxolitinibtherapie etabliert. Fehlerbalken repräsentieren den Median mit dem zugehörigen 95%-Konfidenzintervall. Zur Überprüfung der Nullhypothese wurde der Kruskal-Wallis-Test verwendet.

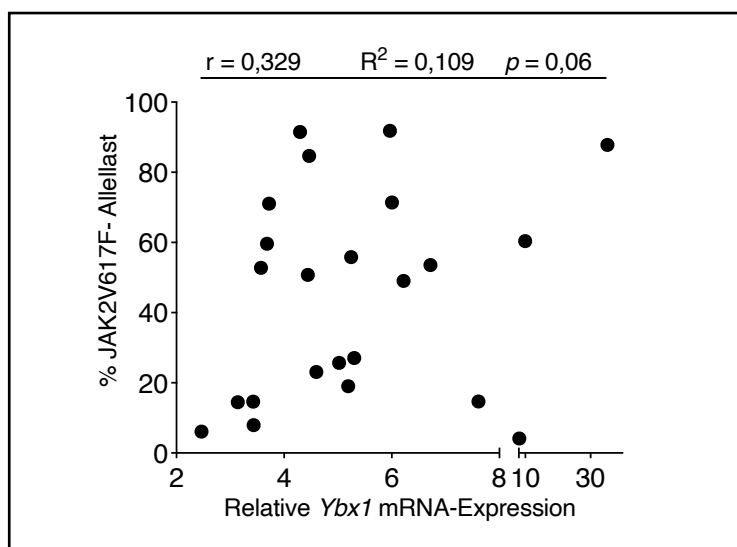


Abbildung 6. Lineare Regressionsanalyse zur Korrelation der mRNA-Expression von YB-1 mit der JAK2V617F-Allellast. Die mRNA-Expressionslevel von YB-1 und JAK2V617F bzw. JAK2 Wildtyp wurden in mononukleären Zellen aus dem peripheren Blut von MPN-Patienten bestimmt. Die Bestimmung der JAKV617F-Allellast wurde mit dem JAK2 MutaQuant Kit® durch das Diagnostiklabor der Hämatologie vorgenommen.

Zur Überprüfung des Zusammenhangs wurde der Pearson-Korrelationskoeffizient berechnet.

Zum Ausschluss des Einflusses der bekannten Parameter Alter, Geschlecht, MPN-Subtyp oder Risiko-Score bei Diagnosestellung auf die YB-1-Expression in JAK2V617F-positiv getesteten Patienten wurde weiterhin eine multivariate Analyse durchgeführt. Es zeigte sich dabei, dass das jeweils vorliegende Modell in der Gruppe der Patienten und der gesunden Probanden bei einem korrigierten R^2 von -0,021 bzw. 0,051 ebenfalls keinen Erklärungswert für die Expression von YB-1 besitzt. (Tabelle 20) Dieses Ergebnis suggeriert, dass die demographischen Unterschiede der beiden Kollektive nicht zu der differenziellen YB-1-Expression geführt haben können. Ebenso bestehen keine Hinweise darauf, dass die YB-1-Expression vom jeweiligen MPN-Subtyp oder der Risikoeinstufung abhängt. Beide Regressionsanalysen weisen jedoch eine geringe Testgüte von $1 - \beta = 0,41$ (Gesunde) bzw. 0,65 (Patienten) auf und sind damit aufgrund der geringen Größe der Stichprobe und der niedrigen Korrelationskoeffizienten mit Einschränkung zu bewerten.

		MPN	Gesund
Modellzusammenfassung	R^2	0,206	0,104
	korrigiertes R^2	-0,021	0,051
ANOVA	F	0,908	1,968
	Signifikanz	0,486	0,155
Alter	nicht standardisierter Koeffizient	-0,016	0,001
	standardisierter Koeffizient	-0,028	0,031
	Signifikanz p	0,922	0,851
Geschlecht	nicht standardisierter Koeffizient	3,536	0,397
	standardisierter Koeffizient	0,254	0,320
	Signifikanz p	0,356	0,057
MPN-Subtyp	nicht standardisierter Koeffizient	-0,316	
	standardisierter Koeffizient	-0,037	
	Signifikanz p	0,891	
Risiko-Score	nicht standardisierter Koeffizient	-3,810	
	standardisierter Koeffizient	-0,432	
	Signifikanz p	0,122	

Tabelle 20. Multiple Regressionsanalyse zur Bestimmung des Einflusses von Alter, Geschlecht, MPN-Subtyp und Risiko-Score auf die YB-1-Expression in JAK2V617F-positiven Patienten und gesunden Probanden. Die Analyse wurde getrennt für die Gruppe der Patienten und der gesunden Probanden durchgeführt. Eine klinische Risikoeinschätzung lag für 15 Patienten (11 MF, 2 PV, 2 ET) vor.

3.2. Der *Knock-down* von YB-1 führt zu verstärkter Apoptose in JAK2-mutierten Zellen

Da sich YB-1 in JAK2V617F-mutierten Zellen verstärkt exprimiert zeigte, sollte dessen funktionelle Bedeutung untersucht werden. Um eine genetische Inaktivierung von YB-1 zu erreichen, nutzten wir die Methode der RNA-Interferenz (RNAi). Zunächst erfolgte die Validierung der *small hairpin* RNAs (shRNAs) gegen murine und humane mRNA von YB-1. Mittels lentiviraler Transduktion des kodierenden Vektors, welcher zudem ein Puromycin-Resistenzgen enthielt, wurde ein *Knock-down* in murinen Ba/F3 JAK2V617F-mutierten Zellen sowie den humanen HEL- und SET-2-Zellen, welche homo- bzw. heterozygot für die JAK2V617F-Mutation sind, erzielt. Nach Selektion mit Puromycin konnte in allen Zelllinien eine > 50-prozentige Reduktion des Expressionslevels auf mRNA-Ebene erzielt werden. Im Western Blot ließ sich der *Knock-down* auch auf Proteinebene nachweisen. (Abbildung 7)

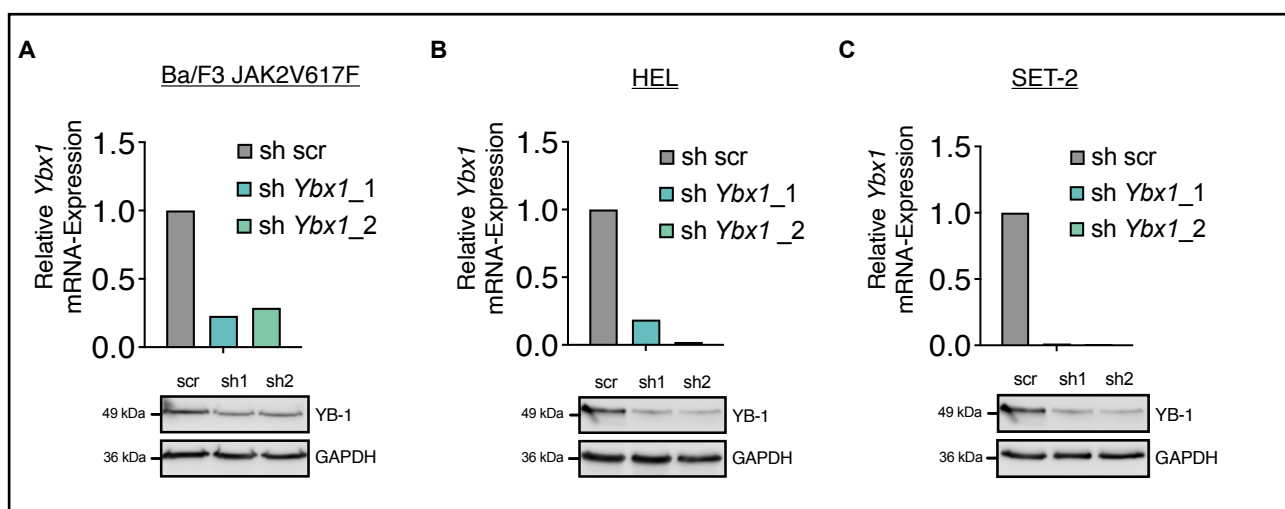


Abbildung 7 Validierung der YB-1-shRNAs in murinen und humanen Zelllinien. JAK2V617F-überexprimierende (A) Ba/F3-, (B) HEL- und (C) SET-2-Zellen wurden mit zwei verschiedenen shRNA-Konstrukten, die sich gegen die mRNA von YB-1 richten (sh *Ybx1_1*, sh *Ybx1_2*) und einer ungerichteten shRNA (sh scr) als Negativkontrolle transfiziert, mit 1,5 μ g/ml Puromycin selektiert und der erzielte *Knock-down* fünf Tage nach Transfektion mittels qPCR und Western Blot überprüft.

Anschließend sollte überprüft werden, welchen Einfluss eine Ruxolitinibbehandlung auf das Apoptoseverhalten unserer Zellen mit regulärer Expression von YB-1 (sh scr) oder *Knock-down* von YB-1 (sh *Ybx1*) hat. Dazu wurden die Zellen für 24 Stunden mit zwei verschiedenen Dosen Ruxolitinib und DMSO als Kontrollsubstanz behandelt. Eine suffiziente Inhibition der JAK2-abhängigen Signaltransduktion lässt sich *in vitro* ab einer Konzentration von 100nM erzielen [273]. In gesunden Probanden sowie in Patienten mit hepatischer oder renaler Funktionseinschränkung sind unter den üblichen Dosierungen in der MPN-Behandlung Maximalspiegel von ca. 1000nM im Plasma zu erreichen [274, 275]. Wir entschieden uns daher für eine Behandlung der Zellen mit 100nM und 500nM. Nach Abschluss der Behandlung wurde durchflusszytometrisch durch Färbung der Zellen mit Annexin V und dem „*dead cell stain*“ Sytox™ blue eine Messung der Apoptoserate vorgenommen.

Abbildung 8 skizziert schematisch den Versuchsablauf. Vitale Zellen ließen sich durch keinen der Farbstoffe anfärben, primär nekrotische Zellen dagegen lagerten ausschließlich Sytox™ blue ein. Die für unsere Messung relevanten Zellpopulationen stellten die frühapoptotischen und die in Folge eines vorangeschrittenen apoptotischen Prozesses sekundär nekrotischen Zellen dar, welche sich kräftig durch Annexin darstellen lassen und im Verlauf des Apoptoseprozesses auch Sytox™ blue einlagern.

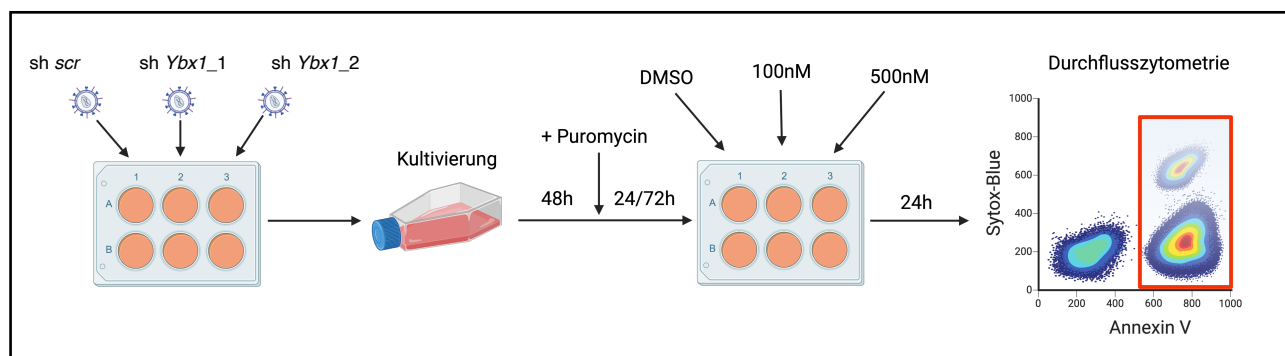


Abbildung 8. Darstellung der Durchführung des Apoptose-Assays.

2×10^6 Zellen der jeweiligen Zellreihe wurden in einer 6-Well-Platte mittels des zuvor produzierten Virusmediums transfiziert. 16-18 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen erneut unter ihren üblichen Bedingungen in Kultur genommen. 48 Stunden nach Transfektion wurde dem Medium $1,5 \mu\text{g/ml}$ Puromycin zugefügt und nach weiteren 24 Stunden im Falle der humanen Zelllinien bzw. 72 Stunden im Falle der murinen Zelllinie die Behandlung mit DMSO oder 100nM bzw. 500nM Ruxolitinib begonnen. Wiederum nach 24 Stunden wurden die Zellen der durchflusszytometrischen Analyse zugeführt. Frühapoptotische Zellen zeigten sich Annexin-positiv und Sytox™ blue-negativ. Sekundär nekrotische Zellen ließen sich neben Annexin auch mit Sytox™ blue anfärben. Beide Populationen wurden ins Gating eingeschlossen.

Dargestellt sind die Ergebnisse aus drei (murine Zellen) bzw. sechs (humane Zellen) unabhängigen Experimenten, wobei jeweils das arithmetische Mittel und die Standardabweichung abgebildet sind. (Abbildung 9) Im Fokus stand der Mittelwertvergleich der Apoptoserate von Zellen mit regulärer und reduzierter YB-1-Expression unter der JAK-Inhibition. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde daher auf eine Darstellung der Testwahrscheinlichkeiten weiterer interessanter Gruppenvergleiche, z.B.: zur Klärung der Frage, ob die kombinierte Inhibition auch dem alleinigen *Knock-down* von YB-1 überlegen ist, verzichtet.

Der *Knock-down* von YB-1 allein führte nur zu einer geringfügigen Apoptoseinduktion. Wurden die Zellen mit bestehendem YB-1-*Knock-down* jedoch mit Ruxolitinib behandelt, konnte eine Sensitivierung gegenüber dem Therapeutikum Ruxolitinib festgestellt werden. Für beide Dosierungen ließ sich in den Ba/F3-Zellen (Abbildung 9A) im Fall des *Knock-downs* ein signifikanter Unterschied der Apoptoserate im Vergleich zu den Kontrollzellen nachweisen. Weiterhin war bei Behandlung mit 500nM Ruxolitinib für beide shRNAs ein überadditiver Effekt gegenüber den Einzelmaßnahmen zu beobachten.

Obwohl die hier verwendeten Ruxolitinibdosen im therapeutischen Bereich liegen, zeigten die humanen Zelllinien HEL und SET-2 (Abbildung 9B) ein geringes Ansprechen nach einer 24-stündigen Inkubation.

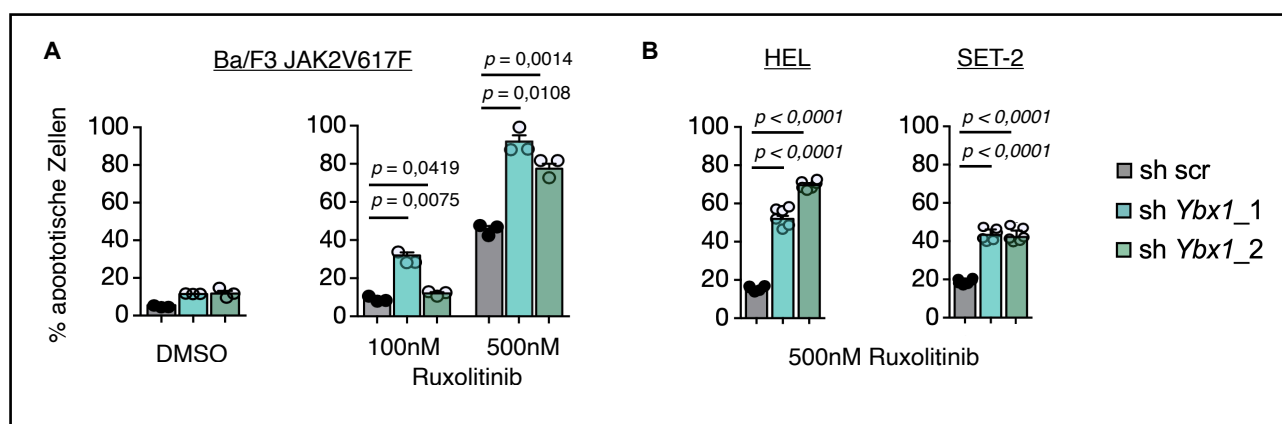


Abbildung 9. Durchflusszytometrische Bestimmung der Apoptoserate JAK2-mutierter Zellen nach Knock-down von YB-1 und Behandlung mit Ruxolitinib. Das Apoptoseverhalten der mit den sh-RNAs transfizierten JAK2V617F-überexprimierenden (A) Ba/F3- und (B) HEL- sowie SET-2-Zellen wurde nach Behandlung mit Ruxolitinib für 24h durchflusszytometrisch überprüft. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert mit Standardabweichung aus (A) drei bzw. (B) sechs unabhängigen Experimenten. Zur statistischen Analyse der Daten diente ein einseitiger t-Test. (Daten publiziert in Jayavelu et al., 2020)

Insbesondere im Fall der HEL-Zellen war ein vergleichsweise geringer Effekt auf die Vitalität der Zellen zu beobachten. Wurden nun YB-1-defiziente Zellen mit Ruxolitinib behandelt, ließ sich ein Anstieg der Apoptoserate beobachten, welcher bei HEL- und SET-2-Zellen das Ausmaß einer isolierten Ruxolitinibbehandlung überstieg.

Um diese Ergebnisse mit einer zweiten Methode zu bestätigen, sollte anschließend mittels Western Blot die Prozessierung relevanter Effektorcaspasen in der Apoptosekaskade auf Proteinebene überprüft werden. Nach Einleitung der intrinsischen Apoptosekaskade wird Cytochrom c aus den Mitochondrien ins Zytosol freigesetzt. In weiteren Schritten führt dies zur Bildung des Apoptosoms, welches die Initiator-Caspase 9 aktiviert. Diese spaltet anschließend die Effektor-Caspasen 3, 6 und 7, welche daraufhin aktiviert werden und über ihre proteolytische Aktivität zur Destruktion der Zelle führen.

Exemplarisch wurde die Caspase 3 ausgewählt. Nach deren Spaltung entstehen zwei Fragmente von 17 kDa und 19 kDa. *Abbildung 10* zeigt die YB-1-Proteinlevel in Folge der shRNA-Expression und die entstehenden Fragmente der Caspase 3 nach zusätzlicher Behandlung mit DMSO oder 500nM Ruxolitinib. Bei Behandlung der Zellen mit dem JAK-Inhibitor allein konnte in allen Fällen nur eine geringe Zunahme der Caspase 3 Fragmente nachgewiesen werden. Der *Knock-down* von YB-1 ohne zusätzliche medikamentöse Behandlung führte vor allem in den humanen Zelllinien bereits zu einer nachweisbaren Fragmentierung der Caspase, während bei YB1-*Knock-down* mit der murinen und humanen shRNA 2 unter Zugabe von Ruxolitinib ein Maximum in allen Zelllinien erreicht wurde.

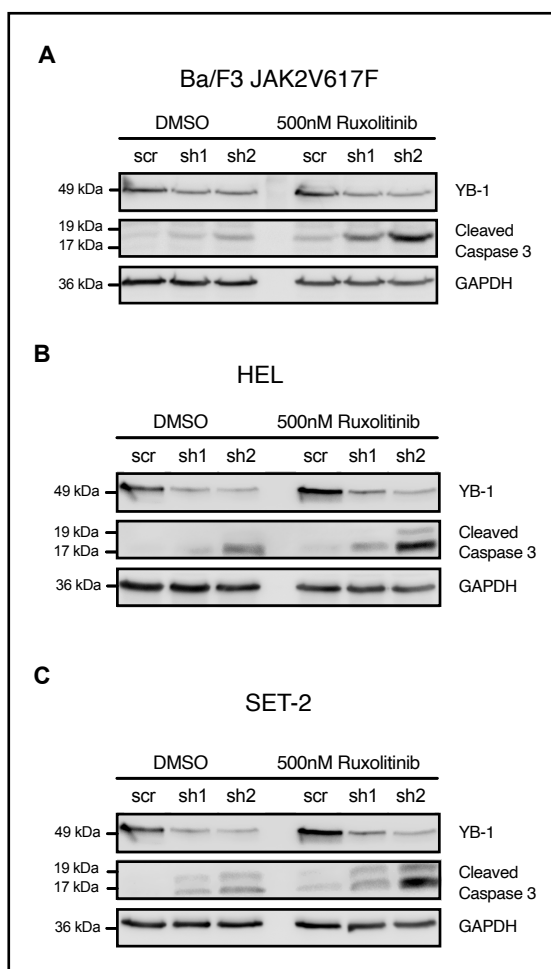


Abbildung 10. Nachweis von Spaltprodukten der Caspase 3 nach Knock-down von YB-1 und Behandlung mit Ruxolitinib. Zur Gewinnung der Proteinlysate wurden die Zellen in einer Dichte von $1 \times 10^6/\text{ml}$ in einer 6-Well-Platte ausgesät und für fünf Stunden mit 500nM Ruxolitinib oder 1:1000 DMSO behandelt. Die Western Blots zeigen das YB-1-Proteinlevel und die Spaltprodukte der Caspase 3 als Zeichen der Apoptoseinduktion in JAK2V617F-überexprimierenden (A) Ba/F3-, (B) HEL- und (C) SET-2-Zellen. GAPDH diente als Ladekontrolle.

3.3. Unmutierte hämatopoetische Zellen zeigen eine geringere Apoptoserate nach *Knock-down* von YB-1 und Behandlung mit Ruxolitinib

Da sich in den vorhergehenden Experimenten gezeigt hat, dass eine kombinierte YB-1- und JAK1/2-Inhibition zu einer Steigerung der Apoptoserate JAK2V617F-mutierter Zellen gegenüber der alleinigen JAK-Inhibition führt, stellte sich die Frage, ob für die Kombinationsbehandlung ein therapeutischer Index existiert, welcher eine Validierung der bisherigen Ergebnisse in vivo zulässt. Voraussetzung für die Implementierung einer antineoplastischen Therapie hämatologischer Erkrankungen ist dabei die möglichst geringfügige Affektion der normalen Hämatopoese.

Wie oben gezeigt, ist YB-1 in JAK2-Wildtyp-Zellen weniger stark exprimiert als in JAK2V617F-mutierten Zellen, sodass eine geringere Abhängigkeit der Zellen von YB-1 angenommen wurde.

Es wurde ein sh-RNA-mediiertes *Knock-down* in parental Ba/F3-Zellen durchgeführt und eine Behandlung mit DMSO und 500nM Ruxolitinib vorgenommen. (Abbildung 11) Unter Behandlung

mit DMSO zeigte sich kein relevanter Anstieg der Apoptoserate der YB-1-depletierten Zellen nach 24 Stunden. Bei kombinierter Behandlung konnte im Fall der sh2 ein deutlicher Anstieg der Apoptoserate sowohl im Vergleich zum alleinigen *Knock-down*, als auch zur alleinigen Ruxolitinib-Behandlung festgestellt werden, welcher formal jedoch keine Signifikanz erreichte. ($p = 0,055$ bzw. $0,075$) Dennoch zeigt sich auch in diesen Zellen ein synergistischer Effekt, welcher sich für die sh2 auf 7,5% belief.

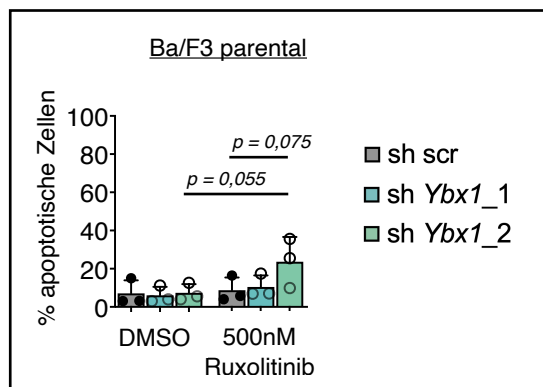


Abbildung 11. Durchflusszytometrische Bestimmung der Apoptoserate parentaler Ba/F3-Zellen nach *Knock-down* von YB-1 und Behandlung mit Ruxolitinib. Unmutierte Ba/F3-Zellen wurden mit zwei verschiedenen shRNA-Konstrukten (sh Ybx1_1, sh Ybx1_2) und einer ungerichteten shRNA (sh scr) transfiziert und die Apoptoserate nach 24-stündiger Behandlung mit DMSO oder 500nM Ruxolitinib überprüft. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert mit Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten. Analysiert wurden die Daten mit einem einseitigen t-Test.

Es ist zwar von einer geringeren Beeinträchtigung der unmutierten gegenüber den JAK2V617F-mutierten Zellen auszugehen, dennoch bleiben aufgrund des modellhaften Charakters unserer Experimente die Wirkung auf die Langzeit-Hämatopoese und die Rate hämatologischer Nebenwirkungen weiterhin Gegenstand künftiger Untersuchungen.

3.4. Im Xenotransplantationsmodell zeigt sich ein Überlebensvorteil unter Therapie mit Ruxolitinib und *Knock-down* von YB-1

Um weiterführend die Umsetzbarkeit einer zusätzlichen YB-1-Inhibition unter Therapie mit Ruxolitinib zu eruieren, untersuchten wir die funktionellen Konsequenzen *in vivo*. Während sich unsere konditionelle YB-1-*Knock-out*-Maus in Entwicklung befand, entschieden wir uns zunächst für ein Xenotransplantationsmodell, in dessen Rahmen JAK2V617F-mutierte HEL-Zellen eine Erythroleukämie in NOD/SCID IL2R γ -defizienten Mäusen, welche humanes SCF, GM-CSF und IL-3 produzieren (NSGS), auslöste. Dabei wurde der Einfluss eines YB-1-*Knock-downs* in den humanen Zellen auf die Überlebensdauer der Tiere analysiert, welche mit Ruxolitinib oder der Trägerlösung NaCl 0,9% (im Folgenden auch als Vehikel bezeichnet) behandelt wurden.

Die HEL-Zellen wurden mit shRNA-Konstrukten gegen humane YB-1-mRNA bzw. einer ungerichteten shRNA mittels lentiviraler Vektoren infiziert. 72 Stunden nach Infektion wurden 1×10^6 Zellen über die Schwanzvene in zuvor mit 2 Gy bestrahlte NSGS-Mäuse injiziert. Über die Expression von CD45 auf der Oberfläche von HEL-Zellen, konnte mittels Durchflusszytometrie die Expansion der humanen Zellen im peripheren Blut der Mäuse überprüft werden. Die Behandlung wurde an den Tagen 10-15 nach Injektion durchgeführt und über eine orale Gavagierung der

NSGS-Mäuse vorgenommen.

Ruxolitinib wurde zweimal täglich in einer Dosierung von 90 mg/kg/d verabreicht. (Abbildung 12)

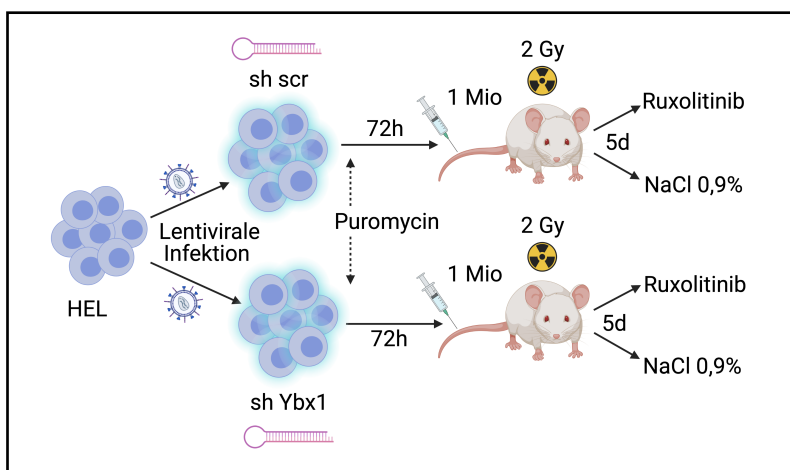


Abbildung 12: Schematische Darstellung des Xenotransplantationsexperiments. HEL-Zellen wurden mit sh-RNA-Konstrukten gegen YB-1 oder der ungerichteten sh scr transfiziert und anschließend mit $1,5 \mu\text{g/ml}$ Puromycin selektiert. 72 Stunden nach Infektion wurden je 1×10^6 in die Schwanzvene von mit 2 Gy bestrahlten NSGS-Mäusen injiziert. Am 5.-10. Tag nach der Injektion wurde die Behandlung mit Ruxolitinib oder der Trägerlösung NaCl 0,9% durchgeführt, welche über eine zweimal tägliche orale Gavagierung der Tiere erfolgte. Es wurde dabei eine Dosis von 90 mg/kg/d Ruxolitinib eingesetzt. Anschließend wurden die Überlebensraten der Tiere verglichen.

Die genannte Dosis wurde in der Vergangenheit in einem Mausmodell mit MPLW515L-Hintergrund validiert. Dabei konnte eine Reduktion der Phosphorylierung von STAT3 erzielt und ein klinisches und hämatologisches Ansprechen detektiert werden [157].

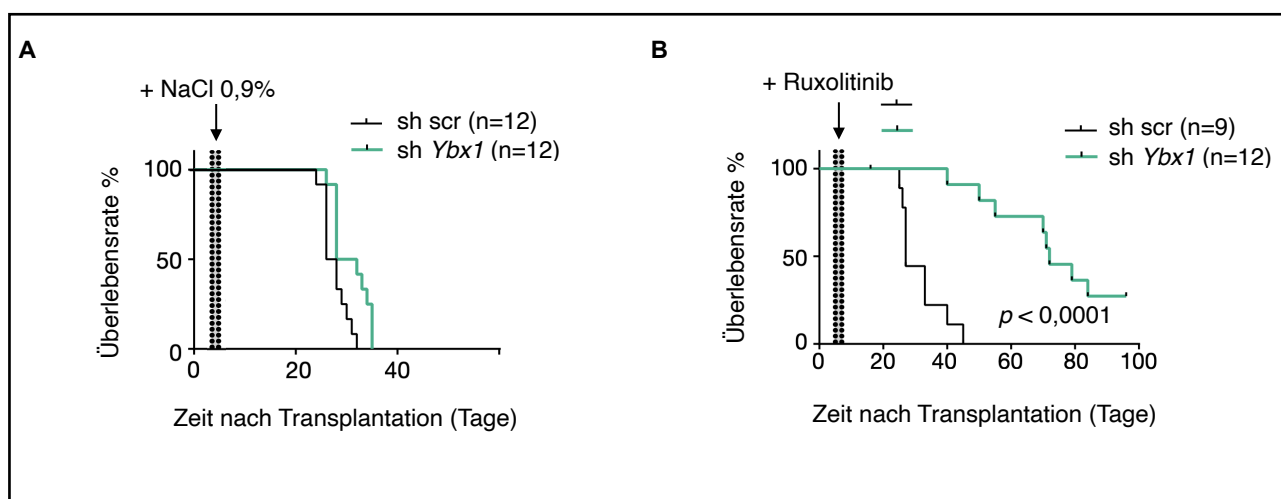


Abbildung 13: Kaplan-Meier-Überlebenskurven der NSGS-Mäuse nach Transplantation mit transfizierten HEL-Zellen. Die transplantierten NSGS-Mäuse wurden ab Tag 5 nach Transplantation für 5 aufeinanderfolgende Tage jeweils mit (A) NaCl 0,9% oder (B) 90 mg/kg/d Ruxolitinib behandelt. Grün dargestellt sind die Überlebenskurven der Tiere, welche YB-1-depletierte HEL-Zellen erhielten (sh Ybx1), während die schwarzen Kurven die Tiere repräsentieren, welchen HEL-Zellen injiziert wurden, die weiterhin YB-1 exprimierten (sh scr). In der mit Trägerlösung behandelten Kohorte befanden sich insgesamt 24 Tiere mit $n=12$ für sh scr und $n=12$ für sh Ybx1. Die mit Ruxolitinib behandelte Kohorte umfasste 21 Tiere mit $n=9$ für sh scr und $n=12$ für sh Ybx1. Der Beobachtungszeitraum betrug 100 Tage. Gezeigt sind hier die Daten von insgesamt drei untersuchten Kohorten. Die erste Kohorte wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht. Zur statistischen Auswertung wurde der Log-rank-Test verwendet. (Daten publiziert in Jayavelu *et al.*, 2020)

Der singuläre YB-1-*Knock-down* konnte nicht zu einer Verlangsamung der Krankheitsprogression beitragen. (Abbildung 13A) Ebenfalls konnte das Gesamtüberleben durch die alleinige Behandlung mit Ruxolitinib lediglich von 27 (sh scr + Vehikel) auf 30 Tage (sh scr + Ruxolitinib) gesteigert werden. Wurden jedoch *Knock-down* von YB-1 und Ruxolitinibbehandlung kombiniert, konnte eine signifikante Steigerung der Gesamtüberlebensrate ($p < 0,0001$) auf 72 Tage beobachtet werden. (Abbildung 13B)

Es kann somit geschlussfolgert werden, dass die Persistenz JAK2-mutierter Klone unter JAK-inhibierender Therapie durch die zusätzliche Ausschaltung von YB-1 unterbunden werden kann, was zu einer Verlängerung der Überlebensrate unter Therapie beiträgt.

3.5. Phosphorylierung und Expression von YB-1 werden durch JAK-Kinasen beeinflusst

Koppikar *et al.* konnten zeigen, dass die chronische Inhibition von JAK2 in JAK2V617F-mutierten Zelllinien und Granulozyten von MPN-Patienten zu einer Heterodimerisation von JAK2 mit den Tyrosinkinase JAK1 und Tyk 2 und somit zu einer anhaltenden Signaltransduktion über den JAK/STAT-Signalweg führt. Weiterhin erhöht sich in SET-2-Zellen die Stabilität des JAK2-Proteins unter Inhibitorbehandlung und epigenetische Veränderungen tragen zu einer verstärkten Transkription des JAK2-Gens bei.

Diese Mechanismen führen schließlich zur Persistenz behandelter Zellen unter JAK-Inhibitor-Therapie, wobei eine Resensitivierung der Zellen durch eine Unterbrechung der Behandlung erzielt werden kann [276].

Unsere Ergebnisse konnten jedoch eine Sensitivierung der Zellen gegenüber Ruxolitinib nach *Knock-down* von YB-1 zeigen. Da YB-1 in diverse onkogene Signalwege eingebunden ist und bereits eine Interaktion mit dem JAK/STAT-Signalweg beschrieben wurde [271, 272], sollte weiterführend überprüft werden, ob YB-1 *downstream* von JAK2 agiert und dessen Inhibition zu einer Unterbrechung der fortwährenden Signaltransduktion führen kann.

Dazu wurden die zuvor verwendeten Zelllinien mit Ruxolitinib behandelt und die Gesamt- und Phospho-Protein-Level von YB-1 und bekannter *downstream* von JAK2 gelegener Signalmoleküle im Western Blot überprüft. YB-1 besitzt insgesamt 32 Phosphorylierungsstellen [277]. Im Rahmen dieser Arbeit fokussierten wir uns auf die Phosphorylierung an Serin 102, welche dafür bekannt ist zur nukleären Translokation von YB-1 beizutragen [217, 218].

Da Ruxolitinib *in vitro* ab einer Konzentration von 100 nM bei einer Behandlung von 2,5 Stunden zu einer suffizienten Inhibition seiner *downstream* gelegenen Signalmoleküle in HEL- und Ba/F3 JAK2V617F-Zellen führt [273], entschieden wir uns für eine zweistündige Behandlung von JAK2V617F-mutierten Ba/F3-, HEL- und SET-2-Zellen mit DMSO oder 500nM Ruxolitinib. In der DMSO-Kontrolle konnte für die Ba/F3 JAK2V617F-Zellen die konstitutive Aktivierung der JAK2 nachgeschalteten Signalmoleküle STAT5, STAT3, ERK und AKT bzw. im Fall der HEL- und SET-2-

Zellen von STAT5 und ERK nachgewiesen werden. Ebenfalls zeigte sich in allen Zelllinien ein kräftiges Signal für phospho-YB-1 an Ser102, was eine ebenfalls vorhandene konstitutive Aktivierung von YB-1 in JAK2V617F-mutierten Zellen nahelegt. Ein Vergleich zu unmutierten Zellen wurde an dieser Stelle jedoch nicht vorgenommen.

Die Behandlung mit Ruxolitinib konnte hier bei einer Expositionsdauer von zwei Stunden zu einer Reduktion des Signals von pSTAT5, pSTAT3, pERK und pAKT führen. Zudem konnte die Phosphorylierung von YB-1 an Ser102 unterbrochen werden. In allen Fällen ist außerdem eine leichte Reduktion des YB-1-Gesamtproteinlevels zu beobachten. (Abbildung 14) Demgegenüber steht eine Zunahme der JAK2-Phosphorylierung unter Einfluss von Ruxolitinib. Eine Aktivierung von JAK2 durch Heterodimerisation mit anderen Tyrosinkinasen ist nur für die chronische Ruxolitinibexposition beschrieben, es konnte jedoch gezeigt werden, dass Ruxolitinib in einer humanen Erythroleukämiezelllinie auch nach kurzzeitiger Behandlung die Dephosphorylierung und die Ubiquitinierung und somit den Abbau von pJAK2 verhindert, was zu einer gesteigerten Phosphorylierung trotz unterbundener Kinaseaktivität führt [278].

Aufgrund der unspezifischen Wirkung von Ruxolitinib mit Einfluss auf die JAK1- und JAK2-Signaltransduktion wurde im Weiteren ein shRNA-medierter *Knock-down* der JAK2-Kinase in murinen JAK2V617F-überexprimierenden Ba/F3-Zellen durchgeführt.

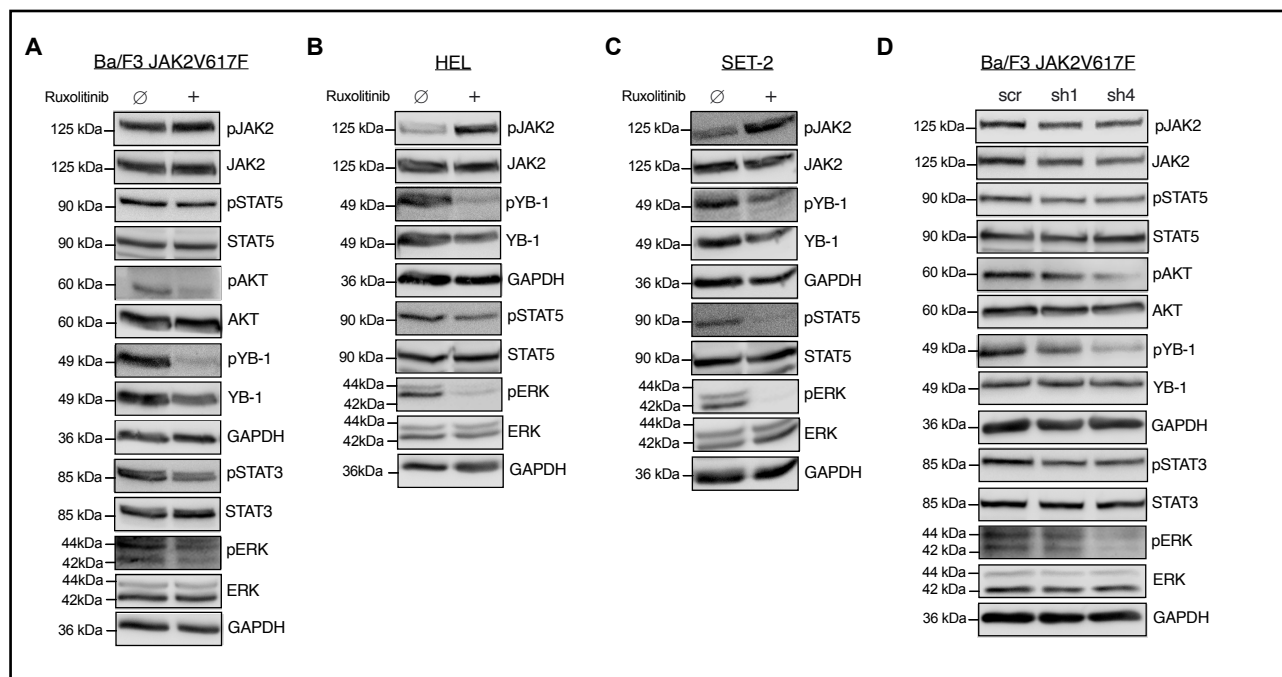


Abbildung 14. Reduktion der YB-1-Phosphorylierung in murinen und humanen JAK2V617F-mutierten Zellen unter Inhibition von JAK2 mittels Ruxolitinib bzw. RNA-Interferenz (A) Ba/F3 EpoR JAK2V617F-, (B) HEL- und (C) SET-2-Zellen wurden zu jeweils 5×10^6 Zellen in einer 6-Well-Platte für 2 Stunden mit DMSO oder 500nM Ruxolitinib behandelt. (D) JAK2V617F-überexprimierende Ba/F3-Zellen wurden mit zwei verschiedenen shRNA-Konstrukten, die sich gegen die JAK2-mRNA richten (sh1, sh4) und einer ungerichteten shRNA (sh scr) als Negativkontrolle transfiziert. Die Proteinlysate wurden 96h nach Transfektion erstellt. Gezeigt sind die Phospho- und Gesamtprotein-Level für die bekannten *downstream* von JAK2 gelegenen Signalmoleküle STAT5 (pTyr694/699), STAT3 (pSer727), ERK (pThr202/Tyr204) und AKT (pSer473) sowie von YB-1 (pSer102). GAPDH diente als Ladekontrolle.

Es konnte bei suffizientem *Knock-down* mit zwei verschiedenen shRNAs eine Reduktion der Phosphorylierung der bekannten Protagonisten in der JAK2-Signalkaskade sowie von YB-1 nachvollzogen werden. Dabei konnte in diesem Fall auch 96 Stunden nach Transfektion keine Änderung des Gesamtprotein-Levels festgestellt werden. (Abbildung 14D)

Da jedoch in JAK2V617F-mutierten PBMCs eine vermehrte mRNA-Expression von YB-1 festgestellt werden konnte, sollte nun überprüft werden, ob eine JAK-inhibierende Behandlung von Patienten mit Ruxolitinib gleichermaßen in der Lage ist zu einer Suppression der mRNA von YB-1 zu führen.

Von 8 Patienten aus unserem Kollektiv mit diagnostizierter PMF, Post-PV-MF oder Post-ET-MF und nachgewiesener JAK2V617F- oder MPLW515L-Mutation konnten Proben vor und nach Therapieinitiierung gewonnen werden. Dabei wurde Ruxolitinib in Einzeldosen von 10-20 mg zweimal täglich verabreicht und bei zwei Patienten mit dem Inhibitor des *Hedgehog*-Signalwegs Sonidegib bzw. bei vier Patienten mit dem Histondeacetylasehemmer Panobinostat kombiniert. Im Median konnte eine Reduktion der mRNA-Expression von YB-1 von 32% beobachtet werden. ($p = 0,004$) Außerdem wird gezeigt, dass die Reduktion sowohl bei der alleinigen Anwendung von Ruxolitinib, als auch bei Kombination eintritt. (Abbildung 15)

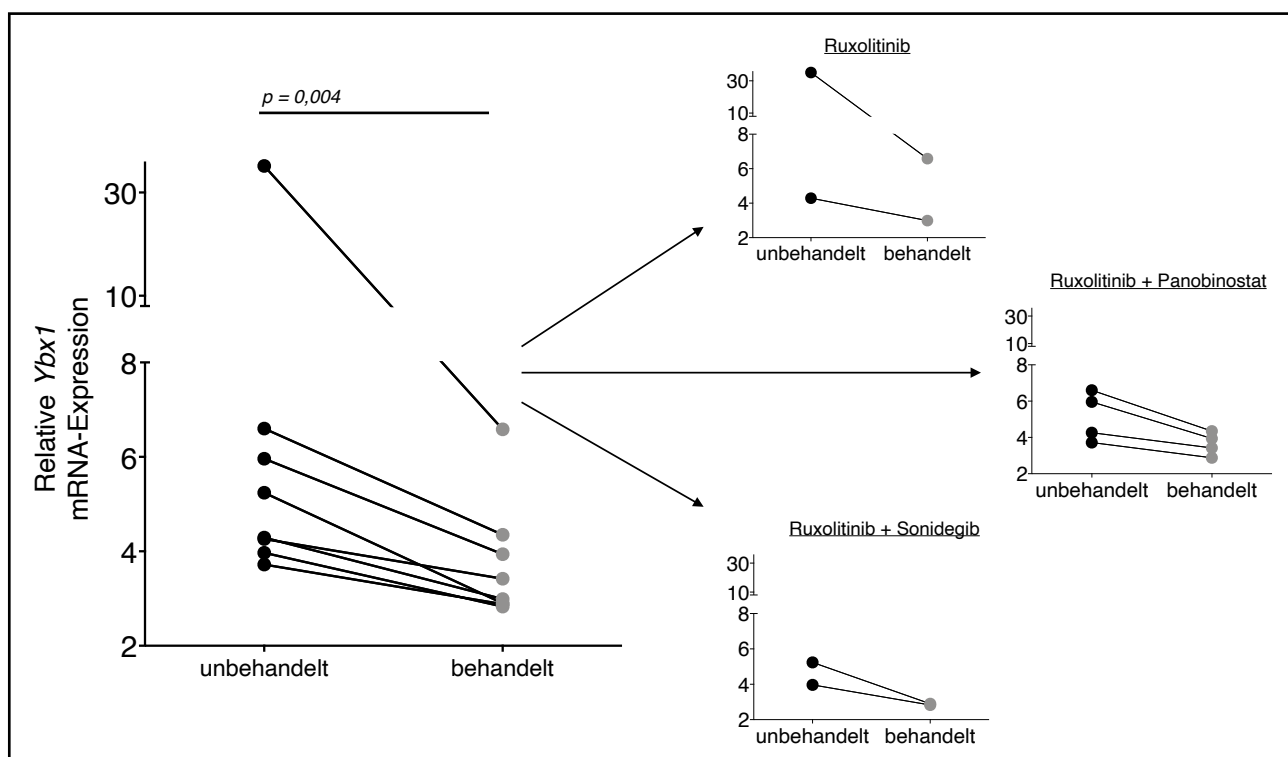


Abbildung 15. Expression der mRNA von YB-1 in PBMCs von MPN-Patienten unter Einfluss einer oralen Behandlung mit Ruxolitinib sowie der Kombination mit Sonidegib und Panobinostat. Der Vergleich der mRNA-Expression von YB-1 erfolgte in PBMCs von Patienten mit diagnostizierter PMF, Post-PV-MF und Post-ET-MF. Bei einer Patientin wurde die MPLW515L-Mutation nachgewiesen, sieben Patienten waren Träger der JAK2V617F-Mutation. Ruxolitinib wurde in Dosierungen von 10-20mg 2xtätiglich verabreicht und als Monotherapie oder in Kombination mit Sonidegib 400mg 1x täglich oder Panobinostat 10-25mg 1xtätiglich, 3x wöchentlich angewendet. In der linken Abbildung wurden alle Therapieoptionen berücksichtigt, während rechts der Einfluss der einzelnen Therapievarianten auf die mRNA-Expression von YB-1 dargestellt ist. Zur statistischen Auswertung wurde ein einseitiger Wilcoxon-Test verwendet.

Wie einleitend beschrieben, ist somit eine Regulation von YB-1 durch den JAK/STAT, MAPK- oder PI3K-Weg auch in JAK2V617F-mutierten Zellen als wahrscheinlich anzusehen. Dabei ist hauptsächlich von einer Regulation durch Änderung des Phosphorylierungszustands auszugehen, während sich allerdings auch Hinweise auf eine Regulation auf transkriptioneller Ebene ergeben.

3.6. Der *Knock-down* von YB-1 führt in MPL-mutierten Zellen zu verstärkter Apoptose

Ruxolitinib ist auch für myeloproliferative Neoplasien mit Wildtyp-JAK2 zugelassen und führte in der COMFORT-I-Studie zu einem klinischen Ansprechen unabhängig vom Mutationsstatus [134]. In MPLW515L-mutierten Ba/F3-Zellen führt die chronische Exposition gegenüber Ruxolitinib ebenfalls zu einer Persistenz der Zellen in Gegenwart des Wirkstoffs, welche durch die Assoziation von JAK2 mit anderen Tyrosinkinase bedingt ist und zu einer fortdauernden Aktivierung des JAK/STAT-Signalwegs führt [276]. Somit sollte nun überprüft werden, ob auch die konstitutive Aktivierung der Wildtyp-Kinase zu einer vermehrten Phosphorylierung von YB-1 führt und dessen *Knock-down* ebenfalls eine Sensitivierung der Zellen gegenüber einer JAK-inhibierenden Behandlung erwirken kann.

Dazu wurden Ba/F3-Zellen generiert, welche den an der Position 515 mutierten MPL-Rezeptor überexprimierten. Dieser Aminosäureaustausch führt zu einer konstitutiven Aktivierung des Rezeptors, sodass ebenfalls von einer dauerhaften Aktivierung der rezeptorassoziierten JAK2 auszugehen ist [43].

Um zu überprüfen, ob die YB-1-Phosphorylierung gleichermaßen von der Aktivierung der nicht-mutierten Kinase abhängt, wurden die transfizierten Zellen mit DMSO und 500nM Ruxolitinib behandelt und die Phosphorylierung der bekannten *downstream* von JAK2 gelegenen Zielstrukturen und YB-1 mittels Western Blot überprüft. (Abbildung 16)

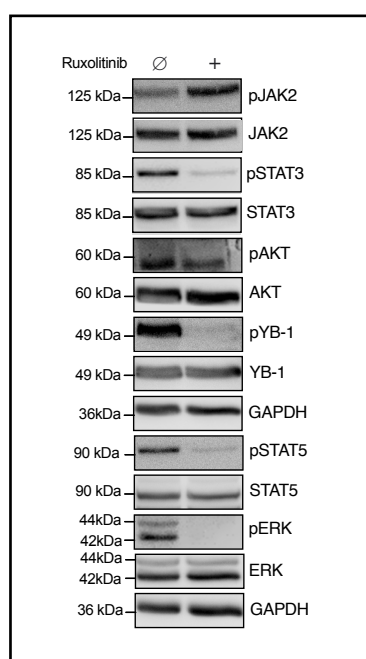


Abbildung 16. Reduktion der YB-1-Phosphorylierung in Ba/F3 MPLW515L-Zellen unter Einfluss von Ruxolitinib im Western Blot. Ba/F3 MPLW515L-Zellen wurden zu 5×10^6 Zellen in der 6-Well-Platte für 2 Stunden mit DMSO oder 500nM Ruxolitinib behandelt und im Anschluss die Proteinlysate gewonnen. Gezeigt sind die Phospho- und Gesamtprotein-Level für die bekannten *downstream* von JAK2 gelegenen Signalmoleküle STAT5 (pTyr694/699), STAT3 (pSer727), ERK (pThr202/Tyr204) und AKT (pSer473) sowie von YB-1 (pSer102). GAPDH diente als Ladekontrolle.

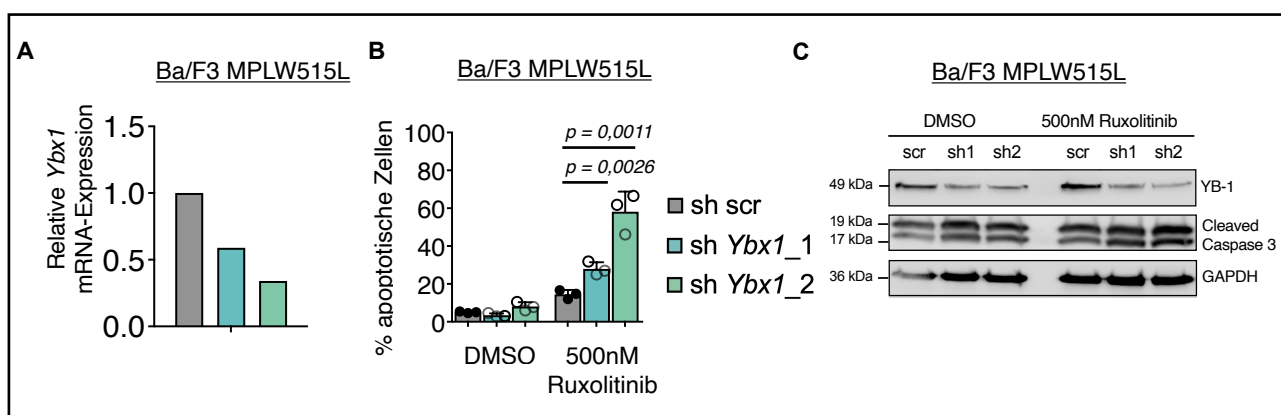


Abbildung 17. Apoptoseverhalten von MPLW515L-mutierten Ba/F3- Zellen nach YB-1-Knock-down und Behandlung mit Ruxolitinib. (A) MPLW515L-mutierte Ba/F3- Zellen wurden mit zwei verschiedenen shRNA-Konstrukten, die sich gegen die mRNA von YB-1 richten (sh Ybx1_1, sh Ybx1_2) und einer ungerichteten shRNA (sh scr) als Negativkontrolle transfiziert und der erzielte Knock-down nach Selektion mit Puromycin mittels qPCR überprüft. Die mRNA wurde am fünften Tag nach Transfektion gewonnen.

(B) Das Apoptoseverhalten MPL-mutierten Ba/F3- Zellen mit Knock-down YB-1 wurde nach Behandlung mit DMSO als Kontrollsubstanz oder 500nM Ruxolitinib für 24h durchflusszytometrisch überprüft. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert mit Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten. Zur statistischen Analyse der Daten diente ein einseitiger t-Test.

(C) Zur Gewinnung der Proteinlysate wurden die Zellen in einer Dichte von 1×10^6 /ml in einer 6-Well-Platte ausgesät und für fünf Stunden mit 500nM Ruxolitinib oder 1:1000 DMSO behandelt. Die Western Blots zeigen das YB-1-Proteinlevel unter Einwirkung der shRNAs und die Spaltprodukte der Caspase 3 als Zeichen der Apoptoseinduktion in MPLW515L-überexprimierenden Ba/F3- Zellen. GAPDH diente als Ladekontrolle.

Wie bereits bei Vorliegen der JAK2-Mutation zeigte sich auch in den MPLW515L-mutierten Zellen eine konstitutive Phosphorylierung von YB-1 an Ser102, welche nach einer Behandlung mit Ruxolitinib, ebenso wie die der bekannten JAK2-nachgeschalteten Signalmoleküle, abnahm.

Weiterführend wurde äquivalent zu den zuvor durchgeführten Experimenten ein shRNA-mediierter Knock-down von YB-1 in murinen Ba/F3-Zellen, welche zur Überexpression des konstitutiv aktivierten Thrombopoietin-Rezeptors (MPL) angeregt wurden, durchgeführt. Die Effizienz des Knock-downs wurde nach Selektion mit Puromycin mittels qPCR und Western Blot überprüft. (Abbildung 17 A,C)

Anschließend wurden 1×10^6 Zellen in eine 6-Well-Platte ausgesät und mit 500nM Ruxolitinib behandelt. Die Ruxolitinibbehandlung allein konnte nur in maximal 14,5% der mutierten Ba/F3-Zellen die Apoptose induzieren. (Abbildung 17 B) Der shRNA-medierte Knock-down von YB-1 konnte jedoch in beiden Fällen eine signifikante Steigerung der Apoptoserate gegenüber der alleinigen Behandlung mit Ruxolitinib erwirken. ($p = 0,0026$ für sh1 bzw. $p = 0,0011$ für sh2)

Darüber hinaus zeigt sich, dass die JAK-Inhibition in Kombination mit einem Knock-down von YB-1 der alleinigen Herabregulation der YB-1-Expression in Hinblick auf die Apoptoserate überlegen ist, sodass sich ein Vorteil für die Kombination beider Maßnahmen ergibt, welcher sich in einem additiven Effekt von 9,9% bzw. 35,5% für beide Ba/F3-Zelllinien mit Knock-down von YB-1 äußert.

Nachdem die Steigerung der Apoptoserate nach Knock-down von YB-1 und Ruxolitinibbehandlung durchflusszytometrisch nachgewiesen werden konnte, sollte die Initiierung der Apoptose auch im Western Blot über den Nachweis von Spaltprodukten der Caspase 3 demonstriert werden. Die mutierten Ba/F3-Zellen zeigten bereits bei alleiniger Ruxolitinibbehandlung und nach isoliertem

Knock-down von YB-1 einen deutlichen Anstieg der Spaltprodukte im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Wurden Zellen mit reduzierter YB-1-Expression zusätzlich mit 500nM Ruxolitinib behandelt, konnte nochmals eine Steigerung der Caspase 3-Spaltung erzielt werden. (*Abbildung 17 C*)

Es kann somit gezeigt werden, dass die Auswirkung von Ruxolitinib auf das Apoptoseverhalten MPL-mutierter Zellen ebenfalls abhängig von der YB-1-Expression der Zellen ist. In Kombination mit einer Ruxolitinibbehandlung führt der *Knock-down* von YB-1 zu einer Sensitivierung der Zellen gegenüber dem JAK1/2-Inhibitor Ruxolitinib. Demnach kann eine zusätzliche Inhibition von YB-1 in Ergänzung zur JAK-Inhibitor-Therapie unabhängig vom Mutationsstatus zur Reduktion des malignen Klons in myeloproliferativen Neoplasien beitragen.

4. Diskussion

4.1. Vorbetrachtung

Januskinasen spielen eine wichtige Rolle bei der Signaltransduktion von Zytokinrezeptoren. Sie phosphorylieren Tyrosinreste in der zytoplasmatischen Region des Rezeptors, welche daraufhin als Bindestelle für Adapter- und Effektorproteine fungieren. Auf diesem Weg führen sie zur Aktivierung des JAK/STAT-, MAPK- und PI3K-Signalwegs und beeinflussen damit die Zellproliferation, Differenzierung und den Zelltod. Diese Prozesse tragen im Fall einer Deregulation zur malignen Transformation von Zellen bei. In der Vergangenheit konnte bereits eine konstitutive Aktivierung des JAK/STAT-Signalwegs in verschiedenen Tumorentitäten nachgewiesen werden [279-282]. Die aktivierende JAK2V617F-Mutation wird dabei vor allem in hämatologischen Erkrankungen angetroffen und stellt eines der am häufigsten mutierten Genloci als Auslöser für eine klonale Hämatopoese und in hämatologischen Neoplasien dar [283-285].

Eine besondere Bedeutung kommt ihr dabei in myeloproliferativen Neoplasien zu. Die Mutation ist vor allem mit dem Auftreten der PV assoziiert. Mit der Einführung des JAK1/2-Inhibitors Ruxolitinib stand damit die erste zielgerichtete Therapieoption zur Verfügung. Inzwischen ist Ruxolitinib für Myelofibrose- und Polycythaemie-Patienten zugelassen. Die Behandlung führt in vielen Fällen zu einer adäquaten Symptomkontrolle, eine vollständige molekulare Remission ließ sich unter einer Monotherapie jedoch nur in wenigen Fällen beobachten [144, 286-288]. In präklinischen Daten war Ruxolitinib in der Lage Proliferation und Kolonieformation von Progenitorzellen einzuschränken [273]. Aufgrund des unzureichenden molekularen Ansprechens *in vivo* ist jedoch davon auszugehen, dass bestimmte Faktoren unter der Therapie zur Persistenz des krankheitserhaltenden Klons führen. Es ist bekannt, dass die Heterodimerisation von JAK2 mit den Januskinasen JAK1 und Tyk2 sowie epigenetische Effekte und eine erhöhte Proteininstabilität bei dauerhafter Exposition gegenüber Ruxolitinib zu einer gesteigerten Phosphorylierung und Gesamtproteinleveln von JAK2 führen, sodass ein geringeres Therapieansprechen resultiert [276]. Dementsprechend könnte die zusätzliche Degradierung von JAK2 oder die Beeinträchtigung der JAK2-abhängigen Signalwege zu einer Resensitivierung der Zellen und folglich zu einem erhöhten Therapieerfolg und einer Dezimierung des malignen Klons führen.

Anknüpfend daran wurde im Rahmen dieser Arbeit nach einer Zielstruktur gesucht, welche in myeloproliferativen Neoplasien in die onkogenen Signalwege *downstream* von JAK2 eingebunden ist und sich potentiell als Zielstruktur für eine Inhibitortherapie in Kombination mit Ruxolitinib eignet, um der Persistenz des malignen Klons entgegenzuwirken.

4.2. Zusammenfassung und kritische Betrachtung

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass das Kälteschockprotein YB-1 in JAK2V617F-mutierten MPN-Zellen überexprimiert ist und dass die Suppression seiner Expression in JAK2V617F- und MPLW515L-mutierten Zelllinien zu einer Sensitivierung gegenüber dem JAK1/2-Inhibitor Ruxolitinib führen kann.

Die verstärkte Expression konnte in murinen JAK2V617-mutierten Ba/F3-Zellen und primären mononukleären Zellen von MPN-Patienten mit nachgewiesener JAK2V617F-Mutation mittels qPCR demonstriert werden. Während Ruxolitinib allein zu einer geringen bis moderaten Apoptoseinduktion in murinen und humanen JAK2-mutierten Zelllinien führte, konnte der shRNA-medierte *Knock-down* von YB-1 zu einer relevanten Steigerung der Apoptoserate beitragen. Ähnliche Ergebnisse ließen sich in murinen MPLW515L-mutierten Zellen nachvollziehen.

In vivo führte der *Knock-down* darüber hinaus im Rahmen eines Xenotransplantationsmodells zu einem Überlebensvorteil der mit HEL-Zellen transplantierten NSGS-Mäuse.

Da die Behandlung mit Ruxolitinib in JAK2-mutierten Zellen zu einer reduzierten Aktivierung und Expression von YB-1 führte, ist von einer Einbindung von YB-1 in die JAK2-regulierten Signalwege auszugehen, wobei dessen Überexpression zu antiapoptotischen Signalen während einer JAK-Inhibition zu führen scheint.

4.2.1. Verstärkte Aktivierung und Überexpression von YB-1 in MPN

Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass YB-1 auf mRNA-Ebene in murinen JAK2V617F-mutierten Zelllinien im Vergleich zu Zellen, welche die Wildtyp-Kinase exprimieren, überexprimiert ist. Um die Ergebnisse aus der Zellkultur zu validieren, wurde das Expressionslevel ebenfalls in primären Zellen von MPN-Patienten untersucht. Die Analyse fand in mononukleären Zellen (Lymphozyten und Monozyten) statt. In MPNs tragen insbesondere Erythrozyten, Granulozyten, Thrombozyten und Monozyten zur Entstehung von Krankheitssymptomen bei, sodass die klinisch relevante Zellreihe der Granulozyten hier nicht betrachtet wurde [289-291]. Zwar können auch T- und B-Lymphozyten in MPNs klonalen Ursprungs sein, dennoch weist nur ein Teil der JAK2V617F-positiv getesteten MPN-Patienten die Mutation auch in Lymphozyten auf [292-295]. Zudem nimmt das Expressionslevel von YB-1 physiologisch im Verlauf der Differenzierung von der Progenitorzelle zu reifen Granulozyten im Mausmodell ab [296], sodass sich periphere Blutzellen generell nur bedingt für unsere Fragestellung eignen. Allerdings bildeten diese Daten die Grundlage für weiterführende immunhistochemische Untersuchungen an Knochenmarksbiopsien von MPN-Patienten durch unsere Arbeitsgruppe, auf die im Folgenden eingegangen werden soll. Weiterhin kann jedoch die Frage nicht beantwortet werden, ob die YB-1-Expression in relevanten Zelltypen mit der JAK2V617F-Allellast korreliert. Interessant wäre hier auch die Klärung der Frage,

ob eine Korrelation zwischen der JAK2-Allellast und nukleär lokalisiertem YB-1 vorliegt. Da wir zeigen konnten, dass der Phosphorylierungsstatus von YB-1, welcher über die Lokalisation in der Zelle entscheidet, vom Aktivierungsgrad der Januskinase abhängt, wäre ein Zusammenhang naheliegend. Einschränkend zu unseren Ergebnissen im Western Blot muss erwähnt werden, dass mit dieser Methode lediglich eine vermeintlich relevante Phosphorylierungsstelle von YB-1 betrachtet wurde. Eine massenspektrometrische Phosphoproteomanalyse unserer Arbeitsgruppe konnte dagegen aufzeigen, dass Ser102 in murinen JAK2V617F-mutierten Zellen im Vergleich zum Wildtyp nicht differenziell phosphoryliert ist und sich das Ausmaß der Phosphorylierung durch die Behandlung mit einem JAK-Inhibitor nicht relevant beeinflussen lässt. Dagegen konnte eine Beeinflussung mehrerer anderer Phosphorylierungsstellen von YB-1 durch die Januskinase festgestellt werden, für die im Gegensatz zu Ser102 zudem eine funktionelle Bedeutung bei der Persistenz unter JAK-inhibierender Therapie nachgewiesen wurde [297]. Auf Details soll nachfolgend weiter eingegangen werden. (siehe Abschnitt 4.3)

In einem nächsten Schritt könnte zudem überprüft werden, ob die nukleäre Lokalisation von YB-1 mit der Persistenz V617F-mutierter Zellen während einer JAK-Inhibitor-Behandlung einhergeht. Dies ließe sich im Rahmen eines Transplantationsassays im Mausmodell überprüfen, wobei die nukleäre Lokalisation von YB-1 immunhistochemisch am Knochenmark analysiert und die Persistenz bzw. Abnahme JAK2-mutierter Zellen im peripheren Blut verfolgt werden könnte. Sollte hier eine Relation beider Parameter bestätigt werden können, würde dies unsere These weiter stützen, dass die Suppression der YB-1-Expression bzw. die Verhinderung seines *Shuttelings* in den Nukleus klinisch relevant ist.

Für die Beurteilung der YB-1-Expression vor dem Hintergrund einer MPL- oder Calreticulin-Expression konnte aktuell keine ausreichende Anzahl an Proben gewonnen werden.

Da in diesen Fällen ebenfalls eine konstitutive Aktivierung der *downstream* von JAK2 gelegenen Signalwege eintritt (*Abbildung 2*), wäre jedoch a priori eine gleichermaßen ausgeprägte Überexpression von YB-1 zu erwarten.

Um aufzuklären, ob es in JAK2V617F-mutierten Zellen nicht nur zu einer Überexpression, sondern auch zu einer Überaktivierung von YB-1 kommt, war nach Abschluss dieser Arbeit zudem ein Vergleich der Phosphorylierungslevel von YB-1 in Wildtyp- und V617F-mutierten Zellen ausstehend. In der durch unsere Arbeitsgruppe durchgeführten Phosphoproteomanalyse konnte die konstitutive Aktivierung jedoch bestätigt werden. Über den Mechanismus der YB-1 Aktivierung in JAK2V617F-mutierten Zellen soll in Abschnitt 4.3. berichtet werden.

Wie genau darüber hinaus nicht nur die Aktivierung von YB-1, sondern auch die Expression in MPN-Zellen reguliert wird, bleibt momentan ungeklärt. Hierzu fehlen Daten aus einem ChIP- oder Reporteragen-Assay.

4.2.2. Limitationen des shRNA-medierte*n* *Knock-downs* und Möglichkeiten der Inhibition von YB-1 *in vivo*

In dieser Arbeit erfolgte die Inaktivierung von YB-1 mit Hilfe von shRNAs. Zum Zeitpunkt der Datenerhebung stellte die lentivirale Infektion mit shRNAs die Methode der Wahl zur Erzielung eines *Knock-downs* in der Zellkultur dar. Dabei konnte in allen Zelllinien ein suffizienter *Knock-down* auf mRNA-Ebene erzielt werden. Generell kann jedoch das Ausmaß des *Knock-downs* vor Infektion nicht prognostiziert werden und es kommt nie zu einer kompletten Repression des Zielgens. Aktuell sind bereits neuere Methoden, wie das CRISPR/Cas-System etabliert. Das CRISPR/Cas-System ist als Teil des adaptiven Immunsystems von Prokaryonten bekannt. Dabei werden kurze Sequenzen eingedrungener Virus-Nukleinsäuren in die CRISPR-Sequenzen des bakteriellen Genoms integriert. Anschließend werden diese Abschnitte in die sogenannte CRISPR-RNA umgeschrieben, welche in Verbindung mit der tracr-RNA an die Endonuklease Cas9 binden. Über die komplementäre Bindung der CRISPR-RNA an virale Gensequenzen werden diese von Cas9 abgebaut. Im Jahr 2012 konnte durch E. Charpentier und J. Doudna gezeigt werden, dass sich diese Strategie im Sinne der Genom-Editierung auf die DNA von eukaryontischen Zellen anwenden lässt, um beliebige Gene auszuschalten [298]. Damit lässt sich zum einen ein vollständiger *Knock-out* realisieren und die mit der RNA-Interferenz assoziierten *Off-target*-Effekte reduzieren. *In vivo* kommt die CRISPR/Cas9-Methode im Rahmen von Studien bereits bei einigen Erbkrankheiten und im Rahmen der Immuntherapie bei Tumorerkrankungen zum Einsatz. Ebenfalls hat mit dem medikamentösen Einsatz von siRNAs die RNA-Interferenz den Eingang in den klinischen Alltag gefunden. Die klinische Umsetzbarkeit der Genomeditierung im Sinne unserer Fragestellung gestaltet sich jedoch aufgrund der im Knochenmark lokalisierten Zellen und limitierten Möglichkeiten einer expliziten Adressierung der malignen Zellen schwierig. Dahingehend könnte zunächst auf derzeit bereits verfügbare YB-1-Inhibitoren zurückgegriffen werden.

Aktuell sind drei mögliche Substanzen untersucht worden, welche in der Zellkultur oder im Mausmodell eine tumorsuppressive Wirkung auf Mamma-Carcinom-, Prostata-Carcinom- und hepatocelluläre Carcinom-Zellen gezeigt haben [245, 299, 300]. Dabei wird die Wirkung über die Unterbrechung des nukleären Transports von YB-1 erreicht.

In Bezug auf unsere Daten ließe sich so die Umsetzbarkeit einer medikamentösen Inhibition von YB-1 im Mausmodell überprüfen. Am Menschen ist momentan dennoch keine Substanz erprobt.

4.2.3. Aus den in vitro-Daten lässt sich nicht auf einen therapeutischen Index einer YB-1-inhibierenden Behandlung schließen

Aus unseren Daten in der Zellkultur geht hervor, dass es in unmutierten hämatopoetischen Zelllinien zu einer geringeren Apoptoseinduktion bedingt durch den *Knock-down* von YB-1 und eine gleichzeitige JAK-inhibierende Therapie als in JAK2- und MPL-mutierten Zellen kommt. Für die Untersuchungen in der Zellkultur wurden hier lymphoide Ba/F3-Zellen verwendet. Die Arbeit mit Ba/F3-Zellen stellt eine lange etablierte und anerkannte Methode zur Untersuchung onkogener Signalwege dar. Dennoch handelt es sich dabei um ein artifizielles System mit weit differenzierten Zellen und Rückschlüsse auf die Prozesse in vivo können nur mit Vorsicht gezogen werden. In unserem Fall bleiben dabei die Beeinträchtigung der Stammzellfunktion und die Rate hämatologischer Nebenwirkungen, welche die Umsetzbarkeit in vivo beeinflussen könnten, ungewiss.

Da sich YB-1 in murinem Knochenmark in Stamm- und Progenitorzellen hoch exprimiert zeigt, während das Expressionslevel mit zunehmender Differenzierung der Zellen nachlässt, ist eine Bedeutung zum Aufrechterhalt der Stammzellfunktion anzunehmen [301]. Vordaten unserer Arbeitsgruppe demonstrierten jedoch, dass hämatopoetische Stammzellen von heterozygoten YB-1-*Knock-out*-Mäusen nicht in ihrer Langzeit-Repopulationskapazität beeinträchtigt wurden.

Um sicher einen Einfluss der YB-1-Expression auf die Funktion der hämatopoetischen Stammzellen ausschließen zu können, wurden im Rahmen dieses Projekts serielle Transplantationen mit YB-1-defizienten Zellen durchgeführt. Auf die Ergebnisse soll im Abschnitt 4.3. weiter eingegangen werden.

Die Toleranz der kombinierten Inhibition in vivo bedarf allerdings noch weiterführender Untersuchungen im Tiermodell.

4.2.4. Im Xenotransplantationsmodell zeigt sich ein Überlebensvorteil durch die Inhibition von YB-1 bei der Behandlung JAK2V617F-mutierter MPN mit einem JAK-Inhibitor.

Der Einfluss des YB-1-*Knock-downs* in vivo wurde hier anhand eines Xenotransplantationsmodells überprüft, bei dem HEL-Zellen mit normalem bzw. reduziertem YB-1-Level in NSGS-Mäuse transplantiert wurden, welche daraufhin einer Behandlung mit Ruxolitinib zugeführt wurden. Bei den HEL-Zellen handelt es sich um JAK2V617F-mutierte, leukämisch transformierte Zellen, sodass in diesem Fall keine MPN, sondern eine Form der akuten Leukämie in den NSGS-Mäusen ausgelöst wird. Da YB-1-defiziente HEL-Zellen in vitro bereits bei geringer Ruxolitinibdosierung eine stärkere Apoptoserate aufwiesen (unpräzentierte Daten) als die murinen MPN-Zelllinien, ist von einer größeren Abhängigkeit der Leukämie-Zellen von YB-1 auszugehen und der Überlebensvorteil, welcher sich durch den *Knock-down* von YB-1 auch in den weiterführenden

Daten unserer Arbeitsgruppe im Rahmen von Xenotransplantationen ergibt, könnte folglich überschätzt sein. Allerdings erfolgte die Behandlung mit Ruxolitinib nur über fünf aufeinanderfolgende Tage, sodass nicht von einer konsequenten JAK-Inhibition während des gesamten Beobachtungszeitraums ausgegangen werden kann.

Um diese Fehlerquellen zu umgehen, wurde durch unsere Arbeitsgruppe jedoch der Einfluss einer Ausschaltung von YB-1 im MPN-Mausmodell überprüft, wobei die Tiere hier kontinuierlich zweimal täglich mit 90mg/kg Ruxolitinib behandelt wurden. Auf die Ergebnisse soll im Abschnitt 4.3. weiter eingegangen werden.

4.3. Weiterführende Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe

In inzwischen publizierten Daten unserer Arbeitsgruppe konnten die molekularen Zusammenhänge der erhobenen funktionellen Daten weiter untersucht werden.

Während sich die Überexpressionsanalyse in dieser Arbeit auf die mononukleären Zellen beschränkte und lediglich die mRNA-Level untersucht wurden, konnte die Überexpression von YB-1 immunhistochemisch in Knochenmarksbiopsien von 74 Patienten mit nachgewiesener JAK2V617F-Mutation detektiert werden.

Funktionell konnte der shRNA-mediierte *Knock-down* von YB-1 in JAK2V617F-mutierten Ba/F3-Zellen im Proliferations-Assay zu einer Verschiebung der IC50 von Ruxolitinib von 1000nM auf 275nM führen, was für eine Sensitivierung gegenüber Ruxolitinib, bedingt durch die Inaktivierung von YB-1, spricht.

Da es sich bei den hier durchgeführten Xenotransplantationen um ein sehr artifizielles Modell handelt, bei dem zum einen eine Form der Leukämie ausgelöst wird und die genetischen Veränderungen in den Zellen nicht erst im Verlauf akquiriert werden, wurde zur weiterführenden Untersuchung der Wirkung einer YB-1-Inaktivierung *in vivo* eine Maus generiert, welche über die Poly I:C-induzierte Expression einer Cre-Rekombinase in der Lage war zu einem *Knock-in* der JAK2V617F-Mutation zu führen und gleichzeitig das Exon 3 im *Ybx1*-Genlocus exzidierte. In kompetitiven Transplantationsexperimenten führte die YB-1-Defizienz nach Behandlung der transplantierten Tiere mit Ruxolitinib zu einer signifikanten Reduktion und teilweise zu einem Verlust des malignen Klons.

Die konditionelle YB-1-*Knock-out*-Maus wurde anschließend genutzt, um die Auswirkung der Deletion auf die Hämatopoese *in vivo* zu überprüfen. Nach Injektion von Poly I:C konnte keine Beeinträchtigung des Differenzierungspotentials festgestellt werden. Zudem bestätigten serielle Transplantationen die fehlende Beeinträchtigung der Langzeit-Hämatopoese durch die Suppression von YB-1. Da bereits durch die im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Daten gezeigt werden konnte, dass YB-1 in MPN-Zellen in die Signaltransduktion *downstream* von JAK2 eingebunden ist, sollte nun untersucht werden, über welche Interaktionen YB-1 in der Lage ist eine

Apoptoseresistenz zu vermitteln. Eine Kollokalisierung von JAK2 und YB-1 in JAK2V617F-mutierten Ba/F3-Zellen sowie in Stamm- und Progenitorzellen JAK2V617F-mutierter Mäuse konnte mit Hilfe der Immunfluoreszenzmikroskopie nachgewiesen werden.

Aufgrund der im Western Blot nachgewiesenen konstitutiven Phosphorylierung von YB-1 in murinen und humanen MPN-Zellen wurde eine massenspektrometrische Phosphoproteomanalyse in Ba/F3 JAK2V617F-Zellen angeschlossen. Multiple *Phospho-Sites* des YB-1-Proteins wiesen dabei in mutierten Zellen eine Phosphorylierung auf, welche in Wildtyp-Zellen nicht vorhanden war. Ruxolitinib konnte diesen Effekt aufheben. Die zuvor im Western Blot untersuchte Ser102 zeigte sich nicht differenziell phosphoryliert. Nachfolgend wurden die Zellen mit Inhibitoren verschiedener JAK2 nachgeschalteter Signalmoleküle behandelt. Eine signifikante Reduktion der YB-1-Phosphorylierung konnte dabei an den zwei Phosphorylierungsstellen Ser30 und Ser34 durch eine MEK/ERK-Inhibition mit PD0325901 hervorgerufen werden, sodass von einer Aktivierung von YB-1 durch den MAP-Kinase-Signalweg in JAK2-mutierten Zellen auszugehen ist. Damit verbunden war eine reduzierte Translokation von YB-1 in den Nukleus, welche unter einer Behandlung mit Ruxolitinib allein nicht erzielt wurde, zu beobachten.

Anschließend konnte nachgewiesen werden, dass YB-1 in JAK2V617F-mutierten Ba/F3-Zellen nach nukleärer Translokation an *Splicing*-Prozessen beteiligt ist. Somit scheinen Ser30 und Ser34 für die Funktion von YB-1 als *Splice*-Faktor von Relevanz zu sein, während Ser102 eher eine untergeordnete Rolle spielt.

Der *Knock-down* von YB-1 in den genannten Zellen führte zu einer veränderten mRNA-Prozessierung mit einer Zunahme der Intronretention im gesamten Transkriptom, welche bekanntermaßen zu einer Initiierung der Translation, einer Stabilisierung der mRNA, aber auch zu einem Abbau der mRNA führen kann. Da wir zuvor zeigen konnten, dass YB-1 nach Phosphorylierung durch den ERK-Signalweg in den Nukleus transloziert, wurde untersucht, ob Zielstrukturen des ERK-Signalwegs von der Intronretention betroffen waren. Diese ließ sich für die Genprodukte Araf, Braf und Mknk1 nachweisen und führte zu einer reduzierten Expression der mRNA und des Proteins von Mknk1 in murinen und humanen JAK2-mutierten Zelllinien.

Die Inaktivierung von YB-1 führte darüber hinaus zu einer reduzierten Phosphorylierung von ERK, welche sich nach genetischer Inaktivierung von Mknk1 ebenfalls nachvollziehen ließ. Darüber hinaus führte diese unter gleichzeitiger Anwendung von Ruxolitinib zu einem ebenfalls starken Anstieg der Apoptoserate, sodass geschlussfolgert werden kann, dass die YB-1-abhängige Expression von Mknk1 essenziell für die ERK-Signaltransduktion in JAK2V617F-mutierten Zellen und deren Überleben ist. Eine Verbindung zur Apoptosemaschinerie erfolgt schließlich über das antiapoptotische Protein Mcl-1, welches nach *Knock-down* von YB-1 weniger stark exprimiert wird. Zusammenfassend ist demnach davon auszugehen, dass die YB-1-Phosphorylierung und nukleäre Lokalisation in JAK2V617F-mutierten Zellen über alternative *Splicing*-Prozesse zu einer vermehrten Translation von Effektoren des ERK-Signalwegs führt, sodass Überlebenssignale für

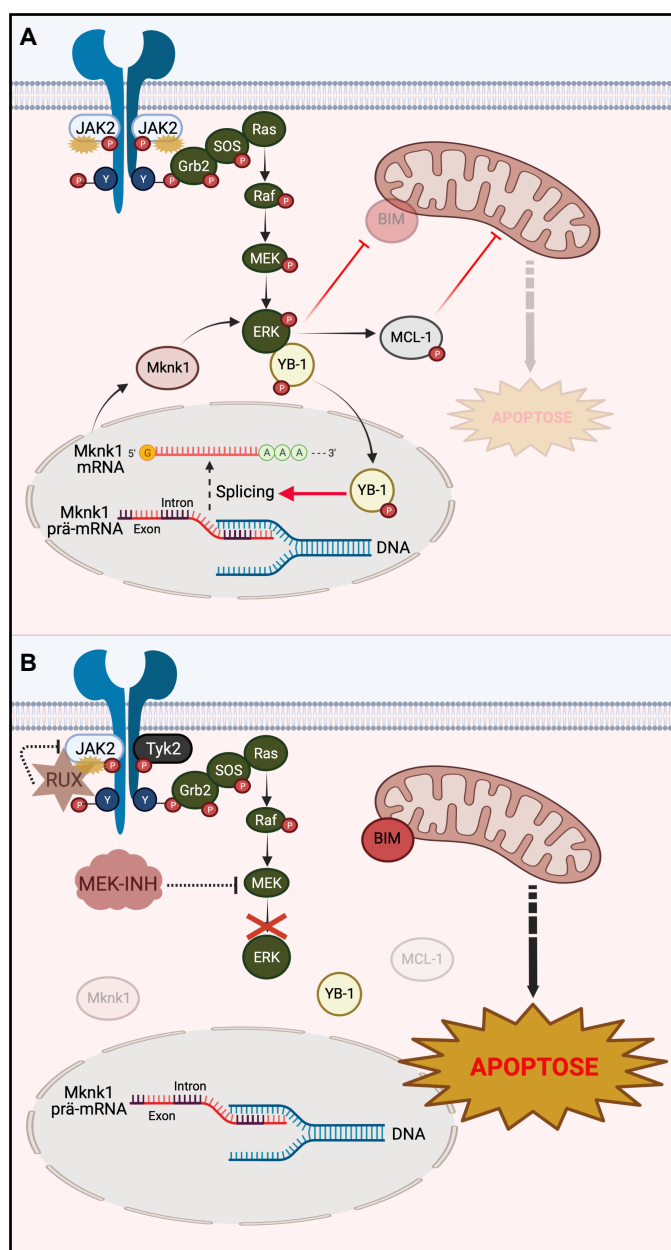


Abbildung 18. Schematische Darstellung der Einbindung von YB-1 in die Signaltransduktion der JAK2V617F-mutierten Zelle.

(A) Die Mutation der Tyrosinkinase JAK2 führt zur konstitutiven Aktivierung des Typ I-Zytokinrezeptors. Die daraufhin angestoßene Signaltransduktion über den MEK/ERK-Signalweg führt über ERK zur Phosphorylierung von YB-1. Das phosphorylierte YB-1 ist sodann in der Lage in den Nucleus zu translozieren und als *Splicing*-Faktor die mRNA-Prozessierung von Mknk1 zu beeinflussen, welches daraufhin verstärkt translatiert wird und wiederum zu einer Aktivierung von ERK führt. Über diese Signalschleife kommt es schließlich zu einer verstärkten Expression und Phosphorylierung des antiapoptotisch wirkenden Proteins Mcl-1 und einer Suppression der Expression des proapoptotischen Proteins BIM, sodass es zu einer Umgehung des programmierten Zelltods kommt.

(B) Durch die Bindung an die katalytische Domäne der Tyrosinkinase hemmt Ruxolitinib die Aktivität der Januskinasen. Die chronische Exposition führt jedoch unter anderem über Heterodimerisation von JAK2 mit anderen Januskinasen (exemplarisch Tyk2 illustriert) zur fortgesetzten Signaltransduktion über den MEK/ERK-Signalweg. MEK-Inhibitoren unterbinden die Aktivierung und Kinaseaktivität von MEK 1/2. Die Phosphorylierung von YB-1 bleibt aus, sodass es im Zytoplasma verbleibt. Mknk1 wird weniger translatiert und die ausbleibende Wirkung auf die Aktivierung sowie die Expression der apoptoseregulierenden Proteine der Bcl-2-Familie führt zu einer Verschiebung des Gleichgewichts hin zu proapoptotischen Signalen.

(adaptiert nach Jayavelu *et al.*, 2020)

die Zelle generiert werden, welche auch unter einer JAK-Inhibition aufrecht erhalten werden und somit zur Persistenz der Zellen unter Therapie führen [297]. Schematisch kann die Einbindung von YB-1 in die Signaltransduktion der JAK2V617F-mutierten Zelle in *Abbildung 18* nachvollzogen werden.

Da somit gezeigt werden konnte, dass die Aktivierung des ERK-Pathways unter einer JAK-inhibierenden Therapie entscheidend zur Persistenz der mutierten Zellen beiträgt, wurde Ruxolitinib nachfolgend mit dem bereits klinisch beim malignen Melanom angewendeten MEK-Inhibitor Trametinib kombiniert. In vitro führte die Kombination zur Apoptoseinduktion in JAK2V617F-mutierten CD34⁺ Zellen, während unmutierte Zellen nicht beeinträchtigt wurden. In einem Xenotransplantationsexperiment mit CD3-depletierten Knochenmarkszellen JAK2V617F-mutierter Patienten konnte darüber hinaus eine deutliche Suppression der humanen Zellen durch die kombinierte Behandlung im Vergleich zu Ruxolitinib allein erzielt werden, welche in zwei von fünf behandelten Mäusen zur vollständigen Eliminierung der humanen Zellen führte.

4.4. Fazit und Ausblick

Unsere Daten demonstrieren, dass die Aufrechterhaltung des ERK-Signalings während einer JAK-inhibierenden Behandlung über den *Splicing*-Faktor YB-1 und die Kinase Mknk1 zur Persistenz der Zellen gegenüber der Behandlung führt und dass die zusätzliche Ausschaltung der genannten Glieder in dieser Signalkette zur vermehrten Apoptoseinduktion bis hin zum Verlust des malignen Klons im Tiermodell führen kann.

Nachfolgend soll nun beleuchtet werden, welchen Stellenwert unsere Erkenntnisse in Hinblick auf eine mögliche klinische Anwendung haben und welche Fragen auch zukünftig noch zu beantworten bleiben.

4.4.1. Wie wird die Expression von YB-1 in JAK2V617F-mutierten Zellen reguliert?

YB-1 wird in JAK2V617F-mutierten Zellen über den ERK-Signalweg konstitutiv aktiviert und trägt als *Splicing*-Faktor zum Aufrechterhalt des ERK-Signalings unter JAK-inhibierender Therapie bei. Über welche Vorgänge jedoch die von uns beobachtete verstärkte Expression von YB-1 in der Zelle erreicht wird, bleibt momentan ungeklärt.

Wie zuvor beschrieben, kann das unzureichende Ansprechen auf eine JAK-inhibierende Therapie über zellintrinsische Mechanismen, welche zum Aufrechterhalt der *downstream* von JAK2 gelegenen Signaltransduktion führen, erklärt werden. Stivala *et al.* konnten zeigen, dass in JAK2V617F- und MPLW515L-mutierten Mäusen im Gegensatz zu humanen JAK2V617F-mutierten Zelllinien keine Suppression der ERK-Aktivierung während einer JAK-inhibierenden Behandlung erzielt werden konnte. Wurden aus der Milz der Mäuse entnommene Zellen jedoch *ex vivo* kultiviert und mit einem JAK-Inhibitor behandelt, konnte das ERK-Signaling unterbunden werden. Daher ist davon auszugehen, dass neben zellintrinsischen Resistenzmechanismen ebenfalls extrinsische Faktoren, welche die Aufrechterhaltung der ERK-Signaltransduktion begünstigen eine Rolle spielen [302]. In der genannten Arbeit konnte die Signaltransduktion über den PDGF-Rezeptor α für die persistierende ERK-Aktivierung verantwortlich gemacht werden. In einem Glomerulonephritismodell zeigte sich YB-1 in die Signaltransduktion von PDGF β , welcher ebenfalls an den PDGF-Rezeptor α bindet, involviert und die Rezeptoraktivierung über PDGF führte zu einer verstärkten Expression von YB-1 [303]. Somit könnte die verstärkte YB-1-Expression auch in unserem Modell über den PDGF-Rezeptor reguliert sein. Jedoch ist auch eine Regulation über weitere zellextrinsische Signale denkbar. In Mammakarzinomzellen konnte eine verstärkte Expression und Phosphorylierung von YB-1 durch Einwirkung des proinflammatorischen Zytokins IL-6 beschrieben werden [304]. Zudem wurde in HeLa- und HEK293T-Zellen eine Hochregulierung der Translation von YB-1 über mTOR beobachtet [305], sodass auch die Aktivierung des PI3K/AKT-Signalwegs zur vermehrten Expression von YB-1 beitragen kann. Damit

kommen potentiell auch weitere proinflammatorische Zytokine, welche den PI3K-Signalweg ansteuern, wie TNF- α als Regulatoren der YB-1-Expression in Betracht.

Es kann somit die Hypothese aufgestellt werden, dass es in myeloproliferativen Neoplasien über die vermehrte Zirkulation proinflammatorischer Zytokine zu einer verstärkten Expression von YB-1 kommt, welches durch eine persistierende JAK2-Signaltransduktion unter JAK-Inhibition darüber hinaus verstärkt aktiviert wird und es somit über den genannten Mechanismus zu einer Aufrechterhaltung der ERK-Signaltransduktion unter JAK-Inhibitor-Therapie kommt. Ob sich die Regulationsmechanismen aus anderen Zellmodellen jedoch auch auf MPN-Zellen übertragen lassen, bleibt zu untersuchen.

4.4.2. Welcher Mehrwert lässt sich durch eine Kombinationstherapie von Ruxolitinib mit einem MEK-Inhibitor erwarten?

Unsere Daten demonstrieren dennoch, dass die MEK-Inhibition in Kombination mit einer Ruxolitinibbehandlung in der Lage ist, zumindest temporär die Allelast zu supprimieren. Da eine höhere JAK2-Allellast mit einem höheren Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse [306, 307] und einem höheren Fibrosegrad assoziiert ist [308-311], könnte somit schon durch eine Reduktion der Allellast, eine Minimierung der Symptomlast und eine Verlangsamung der Krankheitsprogression erreicht werden, auch wenn eine Eradikation des malignen Klons womöglich nicht erzielt wird. Im Rahmen der oben genannten ADORE-Studie, welche sich momentan in der Rekrutierungsphase befindet, wird der RAF und ERK1/2-Inhibitor Rineterkib in Kombination mit Ruxolitinib bei Myelofibrose untersucht. Für die ET ist Ruxolitinib aktuell nicht zugelassen. Die ET verläuft jedoch häufig asymptomatisch und weist im Vergleich zur PV und der präfibrotischen PMF ein geringes Risiko für den Übergang in eine manifeste Myelofibrose auf. In einer multizentrischen Studie von Barbui *et al.*, bei der 891 ET-Patienten beobachtet wurden, konnte zudem kein Unterschied der Überlebensraten der ET-Patienten zur europäischen Vergleichspopulation festgestellt werden [9]. In diesem Fall wäre somit die Einführung eines neuen Therapieansatzes, welcher über die Symptomkontrolle hinausgeht, jedoch mit einem höheren Anteil unerwünschter Wirkungen verbunden ist, nicht zielführend.

4.4.3. Kann die Kombination von Ruxolitinib mit einem MEK-Inhibitor zur dauerhaften molekularen Remission führen?

In den Xenotransplantationen unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass die Kombinationstherapie aus einem JAK- und MEK-Inhibitor in der Lage ist zu einem Verlust des malignen Klons bei einem Teil der behandelten Tiere zu führen. Die untersuchte Stichprobe umfasste hier nur eine geringe Anzahl an Versuchstieren, jedoch konnte bereits zuvor beschrieben werden, dass die Kombinationstherapie aus Ruxolitinib und dem MEK-Inhibitor Binimetinib im JAK2V617F- und MPL-mutierten Mausmodell zu einer ausgeprägteren ERK-Inhibition als die jeweilige Monotherapie führt und damit ein verbessertes Ansprechen hinsichtlich der Allellast und mehreren klinischen Parametern einhergeht [302].

Beim malignen Melanom wird der MEK-Inhibitor Trametinib in Kombination mit einem BRAF-Inhibitor bereits regelhaft angewendet. Dennoch kommt es bei einem Drittel der behandelten Patienten nach 6 Monaten zum Progress. Dabei lässt sich in den meisten Fällen eine Re-Aktivierung des MAP-Kinase-Signalwegs beobachten, welche stärker ausgeprägt ist, als nach einer Monotherapie mit einem BRAF-Inhibitor und durch Genamplifikationen oder Mutationen der Zielstrukturen erklärt werden kann [312]. Bezugnehmend auf unsere Modellvorstellung (*Abbildung 18*) mit YB-1 als Vermittler der ERK-Signalübertragung könnte die Unterbrechung dieser Signalkette andere Mechanismen aktivieren, welche weiterhin zu einer Phosphorylierung und nukleären Translokation von YB-1 führen. Da auch die Proteinkinase B (AKT) zu einer Phosphorylierung von YB-1 führt [225, 313], könnte unter dem Selektionsdruck, den eine MEK-Inhibitor-Therapie auslöst somit eine verstärkte Aktivierung des PI3K/AKT-Signalwegs weiterhin zur nukleären Translokation von YB-1 und damit zur Persistenz der Zellen auch unter kombinierter Inhibitortherapie beitragen. Für eine genaue Beurteilung fehlen uns Langzeit-Daten zur kombinierten Inhibitortherapie in vivo. Allerdings lässt sich antizipieren, dass die Kombination eines JAK- mit einem MEK-Inhibitor nicht in der Lage sein wird eine dauerhafte molekulare Remission herbeizuführen. Es wird somit deutlich, dass zur Optimierung der JAK-inhibierenden Therapie in MPN die Kombination mit einem MEK-Inhibitor zwar eine attraktive Option darstellt, die pharmakologische Ausschaltung weiter *downstream* gelegener Zielstrukturen wie YB-1 jedoch erstrebenswert ist.

4.4.4. Welche Effekte einer Kombinationstherapie sind in MPN mit Wildtyp-JAK2 zu erwarten?

Unsere Daten zur Kombinationstherapie mit einem JAK- und MEK-Inhibitor wurden in einem JAK2V617F-mutierten Modell erhoben. Die Effizienz dieser Therapieoption in MPL- und Calreticulin-mutierten MPN mit Wildtyp-JAK2 bleibt momentan offen.

In Ba/F3-Zellen mit Überexpression des TPO-Rezeptors trägt das Vorhandensein der Calreticulinmutation zu einer gesteigerten Sensitivität gegenüber Ruxolitinib im Vergleich zu Zellen mit Wildtyp-Calreticulin bei. Zudem konnte eine Synergie mit verschiedenen MEK/ERK-Inhibitoren und für die del52-Mutation mit dem mTOR-Inhibitor Temsirolimus beobachtet werden [314].

Im MPLW515L-mutierten Mausmodell, welches phänotypisch zu einer Myelofibrose führt, ließ sich ebenfalls eine Erhöhung der Therapieeffizienz bei Kombination der JAK-Inhibition mit einem MEK/ERK-Inhibitor im Vergleich zur Monotherapie mit Ruxolitinib nachweisen. Die Administration von Ruxolitinib und Binimetinib bzw. Selumetinib führte dabei zu einer stärkeren ERK-Inhibition und einer Reduktion der Milzgröße. Unter der Kombination von Ruxolitinib und Binimetinib konnte darüber hinaus ein ausgeprägteres hämatologisches Ansprechen und ein Rückgang der Knochenmarksfibrose verzeichnet werden [302].

Obwohl für Calreticulin-mutierte MPN aktuell keine in vivo-Daten vorliegen, zeigt sich, dass durch die Kombinationstherapie auch in MPL- und Calreticulin-mutierten MPN eine gesteigerte Therapieeffizienz durch die Kombination von Ruxolitinib mit einem MEK-Inhibitor zu erwarten ist.

5. Zusammenfassung

Wir konnten zeigen, dass YB-1 in JAK2V617F-mutierten Zelllinien und mononukleären Zellen von MPN-Patienten verstärkt exprimiert ist. Dabei konnte kein Zusammenhang zwischen dem Expressionslevel von YB-1 und der JAK2V617F-Allellast, dem Risiko-Score sowie weiteren demographischen Merkmalen hergestellt werden.

Zur Untersuchung der funktionellen Bedeutung von YB-1 in JAK2V617F-mutierten Zellen wurde ein shRNA-medierter *Knock-down* vorgenommen und die Wirkung auf die Apoptoserate der Zellen unter simultaner Behandlung mit dem JAK1/2-Inhibitor Ruxolitinib betrachtet. Der *Knock-down* in Kombination mit einer JAK-Inhibition führte in der Durchflusszytometrie zu einem Anstieg der Apoptoserate, welcher eine Sensitivierung der Zellen gegenüber Ruxolitinib nahelegte. In murinen Zellen konnte durch die kombinierte Inhibition ein synergistischer Effekt erzielt werden. Die Ergebnisse wurden im Western Blot über den Nachweis von Spaltprodukten der Caspase 3 bestätigt. Zum Ausschluss einer gleichermaßen ausgeprägten Wirkung des *Knock-downs* von YB-1 in Kombination mit einer JAK-Inhibition auf unmutierte Zellen untersuchten wir die durchflusszytometrische Apoptoserate von parentalen murinen Zelllinien. Dabei ließ sich eine geringere Beeinträchtigung im Vergleich zu mutierten Zellen nachweisen, dennoch war auch hier ein synergistischer Effekt zu beobachten. Zur Untersuchung der Umsetzbarkeit *in vivo*, wurden NSGS-Mäuse mit YB-1-depletierten HEL-Zellen transplantiert und anschließend mit Ruxolitinib behandelt. Dabei führte die kombinierte Inhibition zu einer Verlängerung der Überlebenszeit der Mäuse. Schließlich sollte aufgrund der beobachteten Synergieeffekte untersucht werden, ob YB-1 in die durch JAK2 gesteuerten Signalwege eingebunden ist. In den verwendeten murinen und humanen Zelllinien waren die Behandlung mit dem JAK-Inhibitor Ruxolitinib sowie der shRNA-mediierte *Knock-down* von JAK2 in Ba/F3 JAK2V617F-mutierten Zellen in der Lage zu einer reduzierten Phosphorylierung von YB-1 zu führen. Eine Reproduktion der Ergebnisse konnte zudem in murinen MPLW515L-mutierten Zelllinien gelingen. Auch hier konnte der *Knock-down* von YB-1 zu einer Sensitivierung gegenüber Ruxolitinib führen.

Unsere Ergebnisse deuten auf die Einbindung von YB-1 in die JAK2-gesteuerten Signalwege in MPN-Zelllinien hin. Die zusätzliche Ausschaltung von YB-1 während einer JAK-inhibierenden Therapie in MPN könnte zu einer Steigerung der Therapieeffizienz und einer Eradikation des malignen Klons führen.

Bibliografie

1. Dameshek, W., Some Speculations on the Myeloproliferative Syndromes. *Blood*, 1951.
2. Arber, D.A., et al., International Consensus Classification of Myeloid Neoplasms and Acute Leukemias: integrating morphologic, clinical, and genomic data. *Blood*, 2022. **140**(11): p. 1200-1228.
3. Jeryczynski, G., et al., Pre-fibrotic/early primary myelofibrosis vs. WHO-defined essential thrombocythemia: The impact of minor clinical diagnostic criteria on the outcome of the disease. *American Journal of Hematology*, 2017. **92**(9): p. 885-891.
4. Moulard, O., et al., Epidemiology of myelofibrosis, essential thrombocythemia, and polycythemia vera in the European Union. *Eur J Haematol*, 2014. **92**(4): p. 289-97.
5. Srour, S.A., et al., Incidence and patient survival of myeloproliferative neoplasms and myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms in the United States, 2001-12. *Br J Haematol*, 2016. **174**(3): p. 382-96.
6. Wolanskyj, A.P., et al., Essential thrombocythemia beyond the first decade: life expectancy, long-term complication rates, and prognostic factors. *Mayo Clin Proc*, 2006. **81**(2): p. 159-66.
7. Passamonti, F., et al., A prognostic model to predict survival in 867 World Health Organization–defined essential thrombocythemia at diagnosis: a study by the International Working Group on Myelofibrosis Research and Treatment. *Blood*, 2012. **120**(6): p. 1197-1201.
8. Tefferi, A., et al., Survival and prognosis among 1545 patients with contemporary polycythemia vera: an international study. *Leukemia*, 2013. **27**(9): p. 1874-1881.
9. Barbui, T., et al., Survival and disease progression in essential thrombocythemia are significantly influenced by accurate morphologic diagnosis: an international study. *J Clin Oncol*, 2011. **29**(23): p. 3179-84.
10. Barbui, T., et al., Masked polycythemia vera (mPV): results of an international study. *Am J Hematol*, 2014. **89**(1): p. 52-4.
11. Rumi, E., et al., JAK2 or CALR mutation status defines subtypes of essential thrombocythemia with substantially different clinical course and outcomes. *Blood*, 2014. **123**(10): p. 1544-51.
12. Tiong, I.S., et al., Masked polycythaemia vera is genetically intermediate between JAK2V617F mutated essential thrombocythaemia and overt polycythaemia vera. *Blood Cancer Journal*, 2016. **6**(8): p. e459-e459.
13. Li, J., et al., JAK2V617F homozygosity drives a phenotypic switch in myeloproliferative neoplasms, but is insufficient to sustain disease. *Blood*, 2014. **123**(20): p. 3139-3151.
14. Harrison, C.N., et al., The impact of myeloproliferative neoplasms (MPNs) on patient quality of life and productivity: results from the international MPN Landmark survey. *Annals of Hematology*, 2017. **96**(10): p. 1653-1665.
15. Siegel, F.P., J. Tauscher, and P.E. Petrides, Aquagenic pruritus in polycythemia vera: Characteristics and influence on quality of life in 441 patients. *American Journal of Hematology*, 2013. **88**(8): p. 665-669.
16. Carobbio, A., et al., Thrombocytosis and leukocytosis interaction in vascular complications of essential thrombocythemia. *Blood*, 2008. **112**(8): p. 3135-3137.
17. Rungjirajittranon, T., et al., A systematic review and meta-analysis of the prevalence of thrombosis and bleeding at diagnosis of Philadelphia-negative myeloproliferative neoplasms. *BMC Cancer*, 2019. **19**(1): p. 184.

18. Marchioli, R., et al., Vascular and neoplastic risk in a large cohort of patients with polycythemia vera. *J Clin Oncol*, 2005. **23**(10): p. 2224-32.
19. Thatipelli, M.R., et al., Survival and recurrence in patients with splanchnic vein thromboses. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2010. **8**(2): p. 200-5.
20. HOEKSTRA, J., et al., Long-term follow-up of patients with portal vein thrombosis and myeloproliferative neoplasms. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 2011. **9**(11): p. 2208-2214.
21. Smalberg, J.H., et al., Myeloproliferative neoplasms in Budd-Chiari syndrome and portal vein thrombosis: a meta-analysis. *Blood*, 2012. **120**(25): p. 4921-8.
22. Finazzi, G., et al., Incidence and risk factors for bleeding in 1104 patients with essential thrombocythemia or prefibrotic myelofibrosis diagnosed according to the 2008 WHO criteria. *Leukemia*, 2012. **26**(4): p. 716-9.
23. Landtblom, A.R., et al., Risk of infections in patients with myeloproliferative neoplasms—a population-based cohort study of 8363 patients. *Leukemia*, 2020.
24. Hultcrantz, M., et al., Risk and Cause of Death in Patients Diagnosed With Myeloproliferative Neoplasms in Sweden Between 1973 and 2005: A Population-Based Study. *J Clin Oncol*, 2015. **33**(20): p. 2288-95.
25. Tefferi, A., et al., Long-term survival and blast transformation in molecularly annotated essential thrombocythemia, polycythemia vera, and myelofibrosis. *Blood*, 2014. **124**(16): p. 2507-2513.
26. Barbui, T., et al., Survival and Disease Progression in Essential Thrombocythemia Are Significantly Influenced by Accurate Morphologic Diagnosis: An International Study. *Journal of Clinical Oncology*, 2011. **29**(23): p. 3179-3184.
27. Baxter, E.J., et al., Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet*, 2005. **365**(9464): p. 1054-61.
28. James, C., et al., A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature*, 2005. **434**(7037): p. 1144-8.
29. Kralovics, R., et al., A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N Engl J Med*, 2005. **352**(17): p. 1779-90.
30. Levine, R.L., et al., Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer Cell*, 2005. **7**(4): p. 387-97.
31. Zhao, R., et al., Identification of an acquired JAK2 mutation in polycythemia vera. *J Biol Chem*, 2005. **280**(24): p. 22788-92.
32. Witthuhn, B.A., et al., JAK2 associates with the erythropoietin receptor and is tyrosine phosphorylated and activated following stimulation with erythropoietin. *Cell*, 1993. **74**(2): p. 227-36.
33. Miura, O., et al., Erythropoietin induces association of the JAK2 protein tyrosine kinase with the erythropoietin receptor in vivo. *Blood*, 1994. **84**(5): p. 1501-7.
34. Watowich, S.S., et al., Homodimerization and constitutive activation of the erythropoietin receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1992. **89**(6): p. 2140-4.
35. Feng, J., et al., Activation of Jak2 catalytic activity requires phosphorylation of Y1007 in the kinase activation loop. *Mol Cell Biol*, 1997. **17**(5): p. 2497-501.
36. Damen, J.E., et al., Phosphatidylinositol 3-kinase associates, via its Src homology 2 domains, with the activated erythropoietin receptor. *Blood*, 1993. **81**(12): p. 3204-10.

37. Klingmuller, U., et al., Multiple tyrosine residues in the cytosolic domain of the erythropoietin receptor promote activation of STAT5. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996. **93**(16): p. 8324-8.
38. Lu, X., et al., Expression of a homodimeric type I cytokine receptor is required for JAK2V617F-mediated transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. **102**(52): p. 18962-7.
39. Levine, R.L., et al., Role of JAK2 in the pathogenesis and therapy of myeloproliferative disorders. *Nat Rev Cancer*, 2007. **7**(9): p. 673-83.
40. Saharinen, P., M. Vihinen, and O. Silvennoinen, Autoinhibition of Jak2 tyrosine kinase is dependent on specific regions in its pseudokinase domain. *Mol Biol Cell*, 2003. **14**(4): p. 1448-59.
41. Horn, T., et al., Detection of the Activating JAK2 V617F Mutation in Paraffin-Embedded Trepine Bone Marrow Biopsies of Patients with Chronic Myeloproliferative Diseases. *The Journal of Molecular Diagnostics*, 2006. **8**(3): p. 299-304.
42. Scott, L.M., et al., JAK2 Exon 12 Mutations in Polycythemia Vera and Idiopathic Erythrocytosis. *New England Journal of Medicine*, 2007. **356**(5): p. 459-468.
43. Pikman, Y., et al., MPLW515L is a novel somatic activating mutation in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *PLoS Med*, 2006. **3**(7): p. e270.
44. Vannucchi, A.M., et al., Characteristics and clinical correlates of MPL 515W>L/K mutation in essential thrombocythemia. *Blood*, 2008. **112**(3): p. 844-847.
45. Rumi, E., et al., Acquired copy-neutral loss of heterozygosity of chromosome 1p as a molecular event associated with marrow fibrosis in MPL-mutated myeloproliferative neoplasms. *Blood*, 2013. **121**(21): p. 4388-4395.
46. Ding, J., et al., Familial essential thrombocythemia associated with a dominant-positive activating mutation of the c-MPL gene, which encodes for the receptor for thrombopoietin. *Blood*, 2004. **103**(11): p. 4198-200.
47. Teofili, L., et al., Hereditary thrombocytosis caused by MPLSer505Asn is associated with a high thrombotic risk, splenomegaly and progression to bone marrow fibrosis. *Haematologica*, 2010. **95**(1): p. 65-70.
48. Varghese, L.N., et al., The Thrombopoietin Receptor: Structural Basis of Traffic and Activation by Ligand, Mutations, Agonists, and Mutated Calreticulin. *Frontiers in endocrinology*, 2017. **8**: p. 59-59.
49. Klampfl, T., et al., Somatic Mutations of Calreticulin in Myeloproliferative Neoplasms. *New England Journal of Medicine*, 2013. **369**(25): p. 2379-2390.
50. Nangalia, J., et al., Somatic CALR Mutations in Myeloproliferative Neoplasms with Nonmutated JAK2. *New England Journal of Medicine*, 2013. **369**(25): p. 2391-2405.
51. Araki, M., et al., Activation of the thrombopoietin receptor by mutant calreticulin in CALR-mutant myeloproliferative neoplasms. *Blood*, 2016.
52. Chachoua, I., et al., Thrombopoietin receptor activation by myeloproliferative neoplasm associated calreticulin mutants. *Blood*, 2016. **127**(10): p. 1325-35.
53. Marty, C., et al., Calreticulin mutants in mice induce an MPL-dependent thrombocytosis with frequent progression to myelofibrosis. *Blood*, 2016. **127**(10): p. 1317-1324.
54. Masubuchi, N., et al., Mutant calreticulin interacts with MPL in the secretion pathway for activation on the cell surface. *Leukemia*, 2020. **34**(2): p. 499-509.
55. Carla Ai, A., et al., Analysis of phenotype and outcome in essential thrombocythemia with CALR or JAK2 mutations. *Haematologica*, 2015. **100**(7): p. 893-897.

56. Nangalia, J. and A.R. Green, Myeloproliferative neoplasms: from origins to outcomes. *Blood*, 2017. **130**(23): p. 2475-2483.
57. Villeval, J.L., et al., High thrombopoietin production by hematopoietic cells induces a fatal myeloproliferative syndrome in mice. *Blood*, 1997. **90**(11): p. 4369-83.
58. Elf, S., et al., Mutant Calreticulin Requires Both Its Mutant C-terminus and the Thrombopoietin Receptor for Oncogenic Transformation. *Cancer Discov*, 2016. **6**(4): p. 368-81.
59. Yao, H., et al., Activating JAK2 mutants reveal cytokine receptor coupling differences that impact outcomes in myeloproliferative neoplasm. *Leukemia*, 2017. **31**(10): p. 2122-2131.
60. Tiedt, R., et al., Ratio of mutant JAK2-V617F to wild-type Jak2 determines the MPD phenotypes in transgenic mice. *Blood*, 2008. **111**(8): p. 3931-3940.
61. Akada, H., et al., Loss of wild-type Jak2 allele enhances myeloid cell expansion and accelerates myelofibrosis in Jak2V617F knock-in mice. *Leukemia*, 2014. **28**(8): p. 1627-1635.
62. Godfrey, A.L., et al., JAK2V617F homozygosity arises commonly and recurrently in PV and ET, but PV is characterized by expansion of a dominant homozygous subclone. *Blood*, 2012. **120**(13): p. 2704-2707.
63. Jamieson, C.H., et al., The JAK2 V617F mutation occurs in hematopoietic stem cells in polycythemia vera and predisposes toward erythroid differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006. **103**(16): p. 6224-9.
64. Delhommeau, F., et al., Evidence that the JAK2 G1849T (V617F) mutation occurs in a lymphomyeloid progenitor in polycythemia vera and idiopathic myelofibrosis. *Blood*, 2007. **109**(1): p. 71-7.
65. Mullally, A., et al., Distinct roles for long-term hematopoietic stem cells and erythroid precursor cells in a murine model of Jak2V617F-mediated polycythemia vera. *Blood*, 2012. **120**(1): p. 166-72.
66. Lundberg, P., et al., Myeloproliferative neoplasms can be initiated from a single hematopoietic stem cell expressing JAK2-V617F. *J Exp Med*, 2014. **211**(11): p. 2213-30.
67. Ortmann, C.A., et al., Effect of Mutation Order on Myeloproliferative Neoplasms. *New England Journal of Medicine*, 2015. **372**(7): p. 601-612.
68. Vannucchi, A.M., et al., Mutations and prognosis in primary myelofibrosis. *Leukemia*, 2013. **27**(9): p. 1861-9.
69. Landgren, O., et al., Increased risks of polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myelofibrosis among 24 577 first-degree relatives of 11 039 patients with myeloproliferative neoplasms in Sweden. *Blood*, 2008. **112**(6): p. 2199-2204.
70. Jones, A.V., et al., JAK2 haplotype is a major risk factor for the development of myeloproliferative neoplasms. *Nat Genet*, 2009. **41**(4): p. 446-9.
71. Kilpivaara, O., et al., A germline JAK2 SNP is associated with predisposition to the development of JAK2(V617F)-positive myeloproliferative neoplasms. *Nat Genet*, 2009. **41**(4): p. 455-9.
72. Olcaydu, D., et al., A common JAK2 haplotype confers susceptibility to myeloproliferative neoplasms. *Nat Genet*, 2009. **41**(4): p. 450-4.
73. Hinds, D.A., et al., Germ line variants predispose to both JAK2 V617F clonal hematopoiesis and myeloproliferative neoplasms. *Blood*, 2016. **128**(8): p. 1121-8.

74. Pang, W.W., S.L. Schrier, and I.L. Weissman, Age-associated changes in human hematopoietic stem cells. *Semin Hematol*, 2017. **54**(1): p. 39-42.
75. Méndez-Ferrer, S., et al., Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. *Nature*, 2010. **466**(7308): p. 829-34.
76. Chitteti, B.R., et al., Impact of interactions of cellular components of the bone marrow microenvironment on hematopoietic stem and progenitor cell function. *Blood*, 2010. **115**(16): p. 3239-3248.
77. Omatsu, Y., et al., The Essential Functions of Adipo-osteogenic Progenitors as the Hematopoietic Stem and Progenitor Cell Niche. *Immunity*, 2010. **33**(3): p. 387-399.
78. Ding, L., et al., Endothelial and perivascular cells maintain haematopoietic stem cells. *Nature*, 2012. **481**(7382): p. 457-462.
79. Butler, J.M., et al., Endothelial Cells Are Essential for the Self-Renewal and Repopulation of Notch-Dependent Hematopoietic Stem Cells. *Cell Stem Cell*, 2010. **6**(3): p. 251-264.
80. Yamazaki, S., et al., TGF- β as a candidate bone marrow niche signal to induce hematopoietic stem cell hibernation. *Blood*, 2009. **113**(6): p. 1250-1256.
81. Schepers, K., et al., Myeloproliferative neoplasia remodels the endosteal bone marrow niche into a self-reinforcing leukemic niche. *Cell Stem Cell*, 2013. **13**(3): p. 285-99.
82. Lane, S.W., et al., Differential niche and Wnt requirements during acute myeloid leukemia progression. *Blood*, 2011. **118**(10): p. 2849-56.
83. Greenbaum, A., et al., CXCL12 in early mesenchymal progenitors is required for haematopoietic stem-cell maintenance. *Nature*, 2013. **495**(7440): p. 227-30.
84. Arranz, L., et al., Neuropathy of haematopoietic stem cell niche is essential for myeloproliferative neoplasms. *Nature*, 2014. **512**(7512): p. 78-81.
85. Decker, M., et al., Leptin-receptor-expressing bone marrow stromal cells are myofibroblasts in primary myelofibrosis. *Nature Cell Biology*, 2017. **19**(6): p. 677-688.
86. Lin, C.H.S., K. Kaushansky, and H. Zhan, JAK2V617F-mutant vascular niche contributes to JAK2V617F clonal expansion in myeloproliferative neoplasms. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, 2016. **62**: p. 42-48.
87. Tefferi, A., et al., Circulating interleukin (IL)-8, IL-2R, IL-12, and IL-15 levels are independently prognostic in primary myelofibrosis: a comprehensive cytokine profiling study. *J Clin Oncol*, 2011. **29**(10): p. 1356-63.
88. Vaidya, R., et al., Plasma cytokines in polycythemia vera: Phenotypic correlates, prognostic relevance, and comparison with myelofibrosis. *American Journal of Hematology*, 2012. **87**(11): p. 1003-1005.
89. Pourcelot, E., et al., Cytokine profiles in polycythemia vera and essential thrombocythemia patients: clinical implications. *Exp Hematol*, 2014. **42**(5): p. 360-8.
90. Barbui, T., et al., Inflammation and thrombosis in essential thrombocythemia and polycythemia vera: different role of C-reactive protein and pentraxin 3. *Haematologica*, 2011. **96**(2): p. 315-8.
91. Fleischman, A.G., et al., TNFalpha facilitates clonal expansion of JAK2V617F positive cells in myeloproliferative neoplasms. *Blood*, 2011. **118**(24): p. 6392-8.
92. Emadi, S., et al., IL-8 and its CXCR1 and CXCR2 receptors participate in the control of megakaryocytic proliferation, differentiation, and ploidy in myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Blood*, 2005. **105**(2): p. 464-73.

93. Wickenhauser, C., et al., Polycythemia vera megakaryocytes but not megakaryocytes from normal controls and patients with smokers polyglobuly spontaneously express IL-6 and IL-6R and secrete IL-6. *Leukemia*, 1999. **13**(3): p. 327-34.
94. Chagraoui, H., et al., Prominent role of TGF-beta 1 in thrombopoietin-induced myelofibrosis in mice. *Blood*, 2002. **100**(10): p. 3495-503.
95. Ozono, Y., et al., Neoplastic fibrocytes play an essential role in bone marrow fibrosis in Jak2V617F-induced primary myelofibrosis mice. *Leukemia*, 2021. **35**(2): p. 454-467.
96. Gleitz, H.F.E., et al., Increased CXCL4 expression in hematopoietic cells links inflammation and progression of bone marrow fibrosis in MPN. *Blood*, 2020. **136**(18): p. 2051-2064.
97. Wang, J.C., et al., Osteosclerosis in idiopathic myelofibrosis is related to the overproduction of osteoprotegerin (OPG). *Exp Hematol*, 2004. **32**(10): p. 905-10.
98. Veletic, I., et al., Myelofibrosis osteoclasts are clonal and functionally impaired. *Blood*, 2019. **133**(21): p. 2320-2324.
99. Herlihy, N., C.N. Harrison, and D.P. McLornan, Exploitation of the neural-hematopoietic stem cell niche axis to treat myeloproliferative neoplasms. *Haematologica*, 2019. **104**(4): p. 639-641.
100. Manshour, T., et al., Bone marrow stroma-secreted cytokines protect JAK2(V617F)-mutated cells from the effects of a JAK2 inhibitor. *Cancer Res*, 2011. **71**(11): p. 3831-40.
101. Vannucchi, A.M., et al., Development of myelofibrosis in mice genetically impaired for GATA-1 expression (GATA-1^{low} mice). *Blood*, 2002. **100**(4): p. 1123-1132.
102. Wen, Q.J., et al., Targeting megakaryocytic-induced fibrosis in myeloproliferative neoplasms by AURKA inhibition. *Nat Med*, 2015. **21**(12): p. 1473-80.
103. Gangat, N., et al., Aurora Kinase A Inhibition Provides Clinical Benefit, Normalizes Megakaryocytes, and Reduces Bone Marrow Fibrosis in Patients with Myelofibrosis: A Phase I Trial. *Clinical Cancer Research*, 2019. **25**(16): p. 4898-4906.
104. Bruns, I., et al., Megakaryocytes regulate hematopoietic stem cell quiescence through CXCL4 secretion. *Nature Medicine*, 2014. **20**(11): p. 1315-1320.
105. Barbui, T., et al., Philadelphia-negative classical myeloproliferative neoplasms: critical concepts and management recommendations from European LeukemiaNet. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 2011. **29**(6): p. 761-770.
106. Passamonti, F., et al., A dynamic prognostic model to predict survival in primary myelofibrosis: a study by the IWG-MRT (International Working Group for Myeloproliferative Neoplasms Research and Treatment). *Blood*, 2010. **115**(9): p. 1703-8.
107. Gangat, N., et al., DIPSS plus: a refined Dynamic International Prognostic Scoring System for primary myelofibrosis that incorporates prognostic information from karyotype, platelet count, and transfusion status. *J Clin Oncol*, 2011. **29**(4): p. 392-7.
108. Guglielmelli, P., et al., MIPSS70: Mutation-Enhanced International Prognostic Score System for Transplantation-Age Patients With Primary Myelofibrosis. *J Clin Oncol*, 2018. **36**(4): p. 310-318.
109. Tefferi, A., et al., MIPSS70+ Version 2.0: Mutation and Karyotype-Enhanced International Prognostic Scoring System for Primary Myelofibrosis. *J Clin Oncol*, 2018. **36**(17): p. 1769-1770.

110. Barbui, T., et al., Development and validation of an International Prognostic Score of thrombosis in World Health Organization-essential thrombocythemia (IPSET-thrombosis). *Blood*, 2012. **120**(26): p. 5128-33; quiz 5252.
111. Rumi, E., et al., Clinical effect of driver mutations of JAK2, CALR, or MPL in primary myelofibrosis. *Blood*, 2014. **124**(7): p. 1062-9.
112. Marchioli, R., et al., Cardiovascular Events and Intensity of Treatment in Polycythemia Vera. *New England Journal of Medicine*, 2012. **368**(1): p. 22-33.
113. Berk, P.D., et al., Increased incidence of acute leukemia in polycythemia vera associated with chlorambucil therapy. *N Engl J Med*, 1981. **304**(8): p. 441-7.
114. Landolfi, R., et al., Efficacy and safety of low-dose aspirin in polycythemia vera. *N Engl J Med*, 2004. **350**(2): p. 114-24.
115. Alvarez-Larran, A., et al., Frequency and prognostic value of resistance/intolerance to hydroxycarbamide in 890 patients with polycythaemia vera. *Br J Haematol*, 2016. **172**(5): p. 786-93.
116. Essers, M.A., et al., IFNalpha activates dormant haematopoietic stem cells in vivo. *Nature*, 2009. **458**(7240): p. 904-8.
117. Mullally, A., et al., Depletion of Jak2V617F myeloproliferative neoplasm-propagating stem cells by interferon-alpha in a murine model of polycythemia vera. *Blood*, 2013. **121**(18): p. 3692-702.
118. Gisslinger, H., et al., Ropoginterferon alfa-2b versus standard therapy for polycythaemia vera (PROUD-PV and CONTINUATION-PV): a randomised, non-inferiority, phase 3 trial and its extension study. *Lancet Haematol*, 2020. **7**(3): p. e196-e208.
119. Vannucchi, A.M., et al., Ruxolitinib versus Standard Therapy for the Treatment of Polycythemia Vera. *New England Journal of Medicine*, 2015. **372**(5): p. 426-435.
120. Passamonti, F., et al., Ruxolitinib for the treatment of inadequately controlled polycythaemia vera without splenomegaly (RESPONSE-2): a randomised, open-label, phase 3b study. *Lancet Oncol*, 2017. **18**(1): p. 88-99.
121. Mesa, R., et al., The efficacy and safety of continued hydroxycarbamide therapy versus switching to ruxolitinib in patients with polycythaemia vera: a randomized, double-blind, double-dummy, symptom study (RELIEF). *British Journal of Haematology*, 2017. **176**(1): p. 76-85.
122. Masciulli, A., et al., Ruxolitinib for the prevention of thrombosis in polycythemia vera: a systematic review and meta-analysis. *Blood Advances*, 2020. **4**(2): p. 380-386.
123. Alvarez-Larrán, A., et al., Observation versus antiplatelet therapy as primary prophylaxis for thrombosis in low-risk essential thrombocythemia. *Blood*, 2010. **116**(8): p. 1205-1210.
124. Ruggeri, M., et al., No treatment for low-risk thrombocythaemia: results from a prospective study. *Br J Haematol*, 1998. **103**(3): p. 772-7.
125. Cortelazzo, S., et al., Hydroxyurea for Patients with Essential Thrombocythemia and a High Risk of Thrombosis. *New England Journal of Medicine*, 1995. **332**(17): p. 1132-1137.
126. Solberg, L.A., Jr., et al., The effects of anagrelide on human megakaryocytopoiesis. *Br J Haematol*, 1997. **99**(1): p. 174-80.
127. Harrison, C.N., et al., Hydroxyurea compared with anagrelide in high-risk essential thrombocythemia. *N Engl J Med*, 2005. **353**(1): p. 33-45.

128. Cervantes, F., et al., Erythropoietin treatment of the anaemia of myelofibrosis with myeloid metaplasia: results in 20 patients and review of the literature. *British Journal of Haematology*, 2004. **127**(4): p. 399-403.
129. Cervantes, F., et al., Efficacy and tolerability of danazol as a treatment for the anaemia of myelofibrosis with myeloid metaplasia: long-term results in 30 patients. *British Journal of Haematology*, 2005. **129**(6): p. 771-775.
130. Tefferi, A., et al., Lenalidomide therapy in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Blood*, 2006. **108**(4): p. 1158-1164.
131. Shimoda, K., et al., The effect of anabolic steroids on anemia in myelofibrosis with myeloid metaplasia: retrospective analysis of 39 patients in Japan. *Int J Hematol*, 2007. **85**(4): p. 338-43.
132. Schlenk, R.F., et al., Pomalidomide in myeloproliferative neoplasm-associated myelofibrosis. *Leukemia*, 2017. **31**(4): p. 889-895.
133. Tefferi, A., et al., Lenalidomide therapy in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Blood*, 2006. **108**(4): p. 1158-64.
134. Verstovsek, S., et al., A double-blind, placebo-controlled trial of ruxolitinib for myelofibrosis. *N Engl J Med*, 2012. **366**(9): p. 799-807.
135. Mesa, R.A., et al., Effect of ruxolitinib therapy on myelofibrosis-related symptoms and other patient-reported outcomes in COMFORT-I: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *J Clin Oncol*, 2013. **31**(10): p. 1285-92.
136. Verstovsek, S., et al., Efficacy, safety, and survival with ruxolitinib in patients with myelofibrosis: results of a median 3-year follow-up of COMFORT-I. *Haematologica*, 2015. **100**(4): p. 479-88.
137. Harrison, C., et al., JAK inhibition with ruxolitinib versus best available therapy for myelofibrosis. *N Engl J Med*, 2012. **366**(9): p. 787-98.
138. Kvasnicka, H.M., et al., Long-term effects of ruxolitinib versus best available therapy on bone marrow fibrosis in patients with myelofibrosis. *J Hematol Oncol*, 2018. **11**(1): p. 42.
139. Verstovsek, S., et al., Long-term survival in patients treated with ruxolitinib for myelofibrosis: COMFORT-I and -II pooled analyses. *J Hematol Oncol*, 2017. **10**(1): p. 156.
140. Kröger, N., et al., Monitoring of the JAK2-V617F mutation by highly sensitive quantitative real-time PCR after allogeneic stem cell transplantation in patients with myelofibrosis. *Blood*, 2007. **109**(3): p. 1316-1321.
141. Ballen, K.K., et al., Outcome of transplantation for myelofibrosis. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2010. **16**(3): p. 358-67.
142. Kröger, N.M., et al., Indication and management of allogeneic stem cell transplantation in primary myelofibrosis: a consensus process by an EBMT/ELN international working group. *Leukemia*, 2015. **29**(11): p. 2126-33.
143. Cervantes, F., et al., Three-year efficacy, safety, and survival findings from COMFORT-II, a phase 3 study comparing ruxolitinib with best available therapy for myelofibrosis. *Blood*, 2013. **122**(25): p. 4047-53.
144. Deininger, M., et al., The effect of long-term ruxolitinib treatment on JAK2p.V617F allele burden in patients with myelofibrosis. *Blood*, 2015. **126**(13): p. 1551-4.
145. Pardanani, A., et al., A phase 2 randomized dose-ranging study of the JAK2-selective inhibitor fedratinib (SAR302503) in patients with myelofibrosis. *Blood Cancer Journal*, 2015. **5**(8): p. e335-e335.

146. Pardanani, A., et al., Updated results of the placebo-controlled, phase III JAKARTA trial of fedratinib in patients with intermediate-2 or high-risk myelofibrosis. *Br J Haematol*, 2021. **195**(2): p. 244-248.
147. Harrison, C.N., et al., Fedratinib in patients with myelofibrosis previously treated with ruxolitinib: An updated analysis of the JAKARTA2 study using stringent criteria for ruxolitinib failure. *Am J Hematol*, 2020. **95**(6): p. 594-603.
148. Mascarenhas, J., et al., Results of the Persist-2 Phase 3 Study of Pacritinib (PAC) Versus Best Available Therapy (BAT), Including Ruxolitinib (RUX), in Patients (pts) with Myelofibrosis (MF) and Platelet Counts $<lt;100,000/\mu\text{l}$. *Blood*, 2016. **128**(22): p. LBA-5-LBA-5.
149. Mesa, R.A., et al., Pacritinib versus best available therapy for the treatment of myelofibrosis irrespective of baseline cytopenias (PERSIST-1): an international, randomised, phase 3 trial. *The Lancet Haematology*, 2017. **4**(5): p. e225-e236.
150. Tefferi, A., et al., Momelotinib therapy for myelofibrosis: a 7-year follow-up. *Blood Cancer J*, 2018. **8**(3): p. 29.
151. Zhang, Y., et al., Results from a Phase 2 Study of a Novel Janus Kinase Inhibitor in Treatment of Patients with Myelofibrosis. *Blood*, 2021. **138**: p. 387.
152. Jean-Christophe, I., et al., Benefits and pitfalls of pegylated interferon- α 2a therapy in patients with myeloproliferative neoplasm-associated myelofibrosis: a French Intergroup of Myeloproliferative neoplasms (FIM) study. *Haematologica*, 2018. **103**(3): p. 438-446.
153. Baerlocher, G.M., et al., Telomerase Inhibitor Imetelstat in Patients with Essential Thrombocythemia. *New England Journal of Medicine*, 2015. **373**(10): p. 920-928.
154. Florena, A.M., et al., Different immunophenotypical apoptotic profiles characterise megakaryocytes of essential thrombocythaemia and primary myelofibrosis. *J Clin Pathol*, 2009. **62**(4): p. 331-8.
155. Tefferi, A., et al., A Pilot Study of the Telomerase Inhibitor Imetelstat for Myelofibrosis. *New England Journal of Medicine*, 2015. **373**(10): p. 908-919.
156. Kaelin, W.G., The Concept of Synthetic Lethality in the Context of Anticancer Therapy. *Nature Reviews Cancer*, 2005. **5**(9): p. 689-698.
157. Bhagwat, N., et al., Improved targeting of JAK2 leads to increased therapeutic efficacy in myeloproliferative neoplasms. *Blood*, 2014. **123**(13): p. 2075-2083.
158. Gupta, V., et al., Safety and efficacy of the combination of sonidegib and ruxolitinib in myelofibrosis: a phase 1b/2 dose-finding study. *Blood Advances*, 2020. **4**(13): p. 3063-3071.
159. Wang, J.C., et al., Enhanced histone deacetylase enzyme activity in primary myelofibrosis. *Leukemia & Lymphoma*, 2008. **49**(12): p. 2321-2327.
160. Evrot, E., et al., JAK1/2 and Pan-Deacetylase Inhibitor Combination Therapy Yields Improved Efficacy in Preclinical Mouse Models of JAK2^{V617F}-Driven Disease. *Clinical Cancer Research*, 2013. **19**(22): p. 6230-6241.
161. Verstovsek, S., et al., Disease-Modifying Potential of BET Inhibitor Pelabresib (CPI-0610) As Demonstrated By Improvements in Bone Marrow Function and Clinical Activity in Patients with Myelofibrosis - Preliminary Data. *Blood*, 2021. **138**: p. 2568.
162. Yacoub, A., et al., Abstract CT162: Addition of pascalisib (INCB050465), a PI3K δ inhibitor, in patients with suboptimal response to ruxolitinib: A phase 2 study in patients with myelofibrosis. *Cancer Research*, 2021. **81**(13_Supplement): p. CT162-CT162.

163. Harrison, C.N., et al., Addition of Navitoclax to Ongoing Ruxolitinib Therapy for Patients With Myelofibrosis With Progression or Suboptimal Response: Phase II Safety and Efficacy. *J Clin Oncol*, 2022. **40**(15): p. 1671-1680.
164. Wistow, G., Cold shock and DNA binding. *Nature*, 1990. **344**(6269): p. 823-4.
165. Lindquist, J.A., et al., The role of cold shock domain proteins in inflammatory diseases. *J Mol Med (Berl)*, 2014. **92**(3): p. 207-16.
166. Tafuri, S.R. and A.P. Wolffe, Xenopus Y-box transcription factors: molecular cloning, functional analysis and developmental regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1990. **87**(22): p. 9028-32.
167. Ranjan, M., S.R. Tafuri, and A.P. Wolffe, *Masking mRNA from translation in somatic cells*. *Genes Dev*, 1993. **7**(9): p. 1725-36.
168. Tafuri, S.R., M. Familiari, and A.P. Wolffe, A mouse Y box protein, MSY1, is associated with paternal mRNA in spermatocytes. *J Biol Chem*, 1993. **268**(16): p. 12213-20.
169. Tafuri, S.R. and A.P. Wolffe, Selective recruitment of masked maternal mRNA from messenger ribonucleoprotein particles containing FRGY2 (mRNP4). *J Biol Chem*, 1993. **268**(32): p. 24255-61.
170. Viswanathan, S.R., et al., Lin28 promotes transformation and is associated with advanced human malignancies. *Nat Genet*, 2009. **41**(7): p. 843-8.
171. Wang, G.R., et al., Upregulation of human DNA binding protein A (dbpA) in gastric cancer cells. *Acta Pharmacol Sin*, 2009. **30**(10): p. 1436-42.
172. Sears, D., et al., Functional phosphoproteomic analysis reveals cold-shock domain protein A to be a Bcr-Abl effector-regulating proliferation and transformation in chronic myeloid leukemia. *Cell Death Dis*, 2010. **1**: p. e93.
173. Lv, K., et al., Lin28 mediates paclitaxel resistance by modulating p21, Rb and Let-7a miRNA in breast cancer cells. *PLoS One*, 2012. **7**(7): p. e40008.
174. Wurth, L., et al., UNR/CSDE1 Drives a Post-transcriptional Program to Promote Melanoma Invasion and Metastasis. *Cancer Cell*, 2016. **30**(5): p. 694-707.
175. Eliseeva, I.A., et al., Y-box-binding protein 1 (YB-1) and its functions. *Biochemistry (Mosc)*, 2011. **76**(13): p. 1402-33.
176. Alkrekshi, A., et al., A comprehensive review of the functions of YB-1 in cancer stemness, metastasis and drug resistance. *Cell Signal*, 2021. **85**: p. 110073.
177. Didier, D.K., et al., Characterization of the cDNA encoding a protein binding to the major histocompatibility complex class II Y box. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1988. **85**(19): p. 7322-6.
178. Hiroshi, S., et al., Two human genes isolated by a novel method encode DNA-binding proteins containing a common region of homology. *Gene*, 1988. **73**(2): p. 499-507.
179. Zasedateleva, O.A., et al., Specificity of Mammalian Y-box Binding Protein p50 in Interaction with ss and ds DNA Analyzed with Generic Oligonucleotide Microchip. *Journal of Molecular Biology*, 2002. **324**(1): p. 73-87.
180. Dolfini, D. and R. Mantovani, Targeting the Y/CCAAT box in cancer: YB-1 (YBX1) or NF-Y? *Cell Death Differ*, 2013. **20**(5): p. 676-85.
181. Hasegawa, S.L., et al., DNA binding properties of YB-1 and dbpA: binding to double-stranded, single-stranded, and abasic site containing DNAs. *Nucleic Acids Res*, 1991. **19**(18): p. 4915-20.

182. Grant, C.E. and R.G. Deeley, Cloning and characterization of chicken YB-1: regulation of expression in the liver. *Mol Cell Biol*, 1993. **13**(7): p. 4186-96.
183. Ise, T., et al., Transcription factor Y-box binding protein 1 binds preferentially to cisplatin-modified DNA and interacts with proliferating cell nuclear antigen. *Cancer Res*, 1999. **59**(2): p. 342-6.
184. Izumi, H., et al., Y box-binding protein-1 binds preferentially to single-stranded nucleic acids and exhibits 3'→5' exonuclease activity. *Nucleic Acids Research*, 2001. **29**(5): p. 1200-1207.
185. Kljashtorny, V., et al., The Cold Shock Domain of YB-1 Segregates RNA from DNA by Non-Bonded Interactions. *PLoS One*, 2015. **10**(7): p. e0130318.
186. Landsman, D., RNP-1, an RNA-binding motif is conserved in the DNA-binding cold shock domain. *Nucleic Acids Res*, 1992. **20**(11): p. 2861-4.
187. Bouvet, P., K. Matsumoto, and A.P. Wolffe, Sequence-specific RNA recognition by the *Xenopus* Y-box proteins. An essential role for the cold shock domain. *J Biol Chem*, 1995. **270**(47): p. 28297-303.
188. Das, S., et al., Stimulation of NEIL2-mediated oxidized base excision repair via YB-1 interaction during oxidative stress. *J Biol Chem*, 2007. **282**(39): p. 28474-28484.
189. Guay, D., et al., The human endonuclease III enzyme is a relevant target to potentiate cisplatin cytotoxicity in Y-box-binding protein-1 overexpressing tumor cells. *Cancer Sci*, 2008. **99**(4): p. 762-9.
190. Ohga, T., et al., Role of the human Y box-binding protein YB-1 in cellular sensitivity to the DNA-damaging agents cisplatin, mitomycin C, and ultraviolet light. *Cancer Res*, 1996. **56**(18): p. 4224-8.
191. Chang, Y.W., et al., YB-1 disrupts mismatch repair complex formation, interferes with MutSα recruitment on mismatch and inhibits mismatch repair through interacting with PCNA. *Oncogene*, 2014. **33**(43): p. 5065-77.
192. En-Nia, A., et al., Transcription factor YB-1 mediates DNA polymerase alpha gene expression. *J Biol Chem*, 2005. **280**(9): p. 7702-11.
193. Minich, W.B. and L.P. Ovchinnikov, Role of cytoplasmic mRNP proteins in translation. *Biochimie*, 1992. **74**(5): p. 477-83.
194. Evdokimova, V., et al., The major mRNA-associated protein YB-1 is a potent 5' cap-dependent mRNA stabilizer. *The EMBO Journal*, 2001. **20**(19): p. 5491-5502.
195. Anastasiadou, E., L.S. Jacob, and F.J. Slack, *Non-coding RNA networks in cancer*. *Nature Reviews Cancer*, 2018. **18**(1): p. 5-18.
196. Zhang, E., et al., A novel long noncoding RNA HOXC-AS3 mediates tumorigenesis of gastric cancer by binding to YBX1. *Genome Biology*, 2018. **19**(1): p. 154.
197. Liu, Y., et al., lncRNA GAS5 enhances G1 cell cycle arrest via binding to YBX1 to regulate p21 expression in stomach cancer. *Scientific Reports*, 2015. **5**(1): p. 10159.
198. Blenkiron, C., et al., Links between the oncoprotein YB-1 and small non-coding RNAs in breast cancer. *PLoS One*, 2013. **8**(11): p. e80171.
199. Maute, R.L., et al., tRNA-derived microRNA modulates proliferation and the DNA damage response and is down-regulated in B cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013. **110**(4): p. 1404-9.
200. Goodarzi, H., et al., Endogenous tRNA-Derived Fragments Suppress Breast Cancer Progression via YBX1 Displacement. *Cell*, 2015. **161**(4): p. 790-802.

201. Pekarsky, Y., et al., Dysregulation of a family of short noncoding RNAs, tsRNAs, in human cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2016. **113**(18): p. 5071-5076.
202. Luo, C., et al., miR-137 inhibits the invasion of melanoma cells through downregulation of multiple oncogenic target genes. *J Invest Dermatol*, 2013. **133**(3): p. 768-775.
203. Johnson, T.G., et al., Dysregulated Expression of the MicroRNA miR-137 and Its Target YBX1 Contribute to the Invasive Characteristics of Malignant Pleural Mesothelioma. *Journal of Thoracic Oncology*, 2018. **13**(2): p. 258-272.
204. Su, H., et al., YBX1 regulated by Runx3-miR-148a-3p axis facilitates non-small-cell lung cancer progression. *Cellular Signalling*, 2021. **85**: p. 110049.
205. Wu, S.-L., et al., Genome-wide analysis of YB-1-RNA interactions reveals a novel role of YB-1 in miRNA processing in glioblastoma multiforme. *Nucleic Acids Research*, 2015. **43**(17): p. 8516-8528.
206. Gao, D., et al., Y-Box Binding Protein 1 Regulates Angiogenesis in Bladder Cancer via miR-29b-3p-VEGFA Pathway. *J Oncol*, 2021. **2021**: p. 9913015.
207. Skabkin, M.A., et al., The major messenger ribonucleoprotein particle protein p50 (YB-1) promotes nucleic acid strand annealing. *J Biol Chem*, 2001. **276**(48): p. 44841-7.
208. Stickeler, E., et al., The RNA binding protein YB-1 binds A/C-rich exon enhancers and stimulates splicing of the CD44 alternative exon v4. *Embo j*, 2001. **20**(14): p. 3821-30.
209. Hartmuth, K., et al., Protein composition of human prespliceosomes isolated by a tobramycin affinity-selection method. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2002. **99**(26): p. 16719-16724.
210. Ruzanov, P.V., et al., Interaction of the universal mRNA-binding protein, p50, with actin: a possible link between mRNA and microfilaments. *J Cell Sci*, 1999. **112 (Pt 20)**: p. 3487-96.
211. Fukuda, T., et al., Characterization of the 5'-untranslated region of YB-1 mRNA and autoregulation of translation by YB-1 protein. *Nucleic Acids Res*, 2004. **32**(2): p. 611-22.
212. Skabkina, O.V., et al., YB-1 autoregulates translation of its own mRNA at or prior to the step of 40S ribosomal subunit joining. *Mol Cell Biol*, 2005. **25**(8): p. 3317-23.
213. Koike, K., et al., Nuclear translocation of the Y-box binding protein by ultraviolet irradiation. *FEBS Lett*, 1997. **417**(3): p. 390-4.
214. Stenina, O.I., K.M. Shaneyfelt, and P.E. DiCorleto, Thrombin induces the release of the Y-box protein dbpB from mRNA: a mechanism of transcriptional activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. **98**(13): p. 7277-82.
215. Sorokin, A.V., et al., Proteasome-mediated cleavage of the Y-box-binding protein 1 is linked to DNA-damage stress response. *Embo j*, 2005. **24**(20): p. 3602-12.
216. Coles, L.S., et al., Phosphorylation of cold shock domain/Y-box proteins by ERK2 and GSK3beta and repression of the human VEGF promoter. *FEBS Lett*, 2005. **579**(24): p. 5372-8.
217. Sutherland, B.W., et al., Akt phosphorylates the Y-box binding protein 1 at Ser102 located in the cold shock domain and affects the anchorage-independent growth of breast cancer cells. *Oncogene*, 2005. **24**(26): p. 4281-92.
218. Basaki, Y., et al., Akt-dependent nuclear localization of Y-box-binding protein 1 in acquisition of malignant characteristics by human ovarian cancer cells. *Oncogene*, 2007. **26**(19): p. 2736-46.

219. Stratford, A.L., et al., Y-box binding protein-1 serine 102 is a downstream target of p90 ribosomal S6 kinase in basal-like breast cancer cells. *Breast cancer research : BCR*, 2008. **10**(6): p. R99-R99.
220. Gieseler-Halbach, S., et al., RSK-mediated nuclear accumulation of the cold-shock Y-box protein-1 controls proliferation of T cells and T-ALL blasts. *Cell Death & Differentiation*, 2017. **24**(2): p. 371-383.
221. Sinnberg, T., et al., MAPK and PI3K/AKT mediated YB-1 activation promotes melanoma cell proliferation which is counteracted by an autoregulatory loop. *Exp Dermatol*, 2012. **21**(4): p. 265-70.
222. Jurchott, K., et al., Identification of Y-box binding protein 1 as a core regulator of MEK/ERK pathway-dependent gene signatures in colorectal cancer cells. *PLoS Genet*, 2010. **6**(12): p. e1001231.
223. Prabhu, L., et al., Critical role of phosphorylation of serine 165 of YBX1 on the activation of NF- κ B in colon cancer. *Oncotarget*, 2015. **6**(30): p. 29396-29412.
224. Martin, M., et al., Novel Serine 176 Phosphorylation of YBX1 Activates NF- κ B in Colon Cancer. *J Biol Chem*, 2017. **292**(8): p. 3433-3444.
225. Evdokimova, V., et al., Akt-mediated YB-1 phosphorylation activates translation of silent mRNA species. *Mol Cell Biol*, 2006. **26**(1): p. 277-92.
226. Frye, B.C., et al., Y-box protein-1 is actively secreted through a non-classical pathway and acts as an extracellular mitogen. *EMBO reports*, 2009. **10**(7): p. 783-789.
227. Kosnopfel, C., et al., Tumour Progression Stage-Dependent Secretion of YB-1 Stimulates Melanoma Cell Migration and Invasion. *Cancers*, 2020. **12**(8).
228. Jurchott, K., et al., YB-1 as a cell cycle-regulated transcription factor facilitating cyclin A and cyclin B1 gene expression. *J Biol Chem*, 2003. **278**(30): p. 27988-96.
229. Kotake, Y., et al., YB1 binds to and represses the p16 tumor suppressor gene. *Genes Cells*, 2013. **18**(11): p. 999-1006.
230. Harada, M., et al., YB-1 promotes transcription of cyclin D1 in human non-small-cell lung cancers. *Genes Cells*, 2014. **19**(6): p. 504-16.
231. Miao, X., et al., Y-box-binding protein-1 (YB-1) promotes cell proliferation, adhesion and drug resistance in diffuse large B-cell lymphoma. *Exp Cell Res*, 2016. **346**(2): p. 157-66.
232. Lasham, A., et al., Regulation of the human fas promoter by YB-1, Puralpha and AP-1 transcription factors. *Gene*, 2000. **252**(1-2): p. 1-13.
233. Lasham, A., et al., The Y-box-binding protein, YB1, is a potential negative regulator of the p53 tumor suppressor. *J Biol Chem*, 2003. **278**(37): p. 35516-23.
234. Homer, C., et al., Y-box factor YB1 controls p53 apoptotic function. *Oncogene*, 2005. **24**(56): p. 8314-25.
235. Setoguchi, K., et al., Antisense Oligonucleotides Targeting Y-Box Binding Protein-1 Inhibit Tumor Angiogenesis by Downregulating Bcl-xL-VEGFR2/-Tie Axes. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2017. **9**: p. 170-181.
236. Shibao, K., et al., Enhanced coexpression of YB-1 and DNA topoisomerase II alpha genes in human colorectal carcinomas. *Int J Cancer*, 1999. **83**(6): p. 732-7.
237. Shibahara, K., et al., Nuclear expression of the Y-box binding protein, YB-1, as a novel marker of disease progression in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res*, 2001. **7**(10): p. 3151-5.

238. Chatterjee, M., et al., The Y-box binding protein YB-1 is associated with progressive disease and mediates survival and drug resistance in multiple myeloma. *Blood*, 2008. **111**(7): p. 3714-22.
239. Zhang, Y., et al., The expression level and prognostic value of Y-box binding protein-1 in rectal cancer. *PLoS One*, 2015. **10**(3): p. e0119385.
240. Pang, T., et al., Y Box-Binding Protein 1 Promotes Epithelial-Mesenchymal Transition, Invasion, and Metastasis of Cervical Cancer via Enhancing the Expressions of Snail. *Int J Gynecol Cancer*, 2017. **27**(8): p. 1753-1760.
241. Yahata, H., et al., Increased nuclear localization of transcription factor YB-1 in acquired cisplatin-resistant ovarian cancer. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 2002. **128**(11): p. 621-626.
242. Tacke, F., et al., High prevalence of Y-box protein-1/p18 fragment in plasma of patients with malignancies of different origin. *BMC Cancer*, 2014. **14**: p. 33.
243. Dahl, E., et al., Nuclear detection of Y-box protein-1 (YB-1) closely associates with progesterone receptor negativity and is a strong adverse survival factor in human breast cancer. *BMC Cancer*, 2009. **9**: p. 410.
244. Gluz, O., et al., Y-box-binding protein YB-1 identifies high-risk patients with primary breast cancer benefiting from rapidly cycled tandem high-dose adjuvant chemotherapy. *J Clin Oncol*, 2009. **27**(36): p. 6144-51.
245. Khan, M.I., et al., YB-1 expression promotes epithelial-to-mesenchymal transition in prostate cancer that is inhibited by a small molecule fisetin. *Oncotarget*, 2014. **5**(9): p. 2462-74.
246. Guo, T., et al., YB-1 regulates tumor growth by promoting MACC1/c-Met pathway in human lung adenocarcinoma. *Oncotarget*, 2017. **8**(29): p. 48110-48125.
247. Lovett, D.H., et al., YB-1 alters MT1-MMP trafficking and stimulates MCF-7 breast tumor invasion and metastasis. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010. **398**(3): p. 482-8.
248. Guo, T., et al., Y-box binding protein 1 is correlated with lymph node metastasis in intestinal-type gastric cancer. *Histopathology*, 2015. **66**(4): p. 491-9.
249. Lu, J., et al., YB-1 expression promotes pancreatic cancer metastasis that is inhibited by microRNA-216a. *Exp Cell Res*, 2017. **359**(2): p. 319-326.
250. El-Naggar, A.M., et al., Translational Activation of HIF1alpha by YB-1 Promotes Sarcoma Metastasis. *Cancer Cell*, 2015. **27**(5): p. 682-97.
251. Zhou, L.L., et al., High YBX1 expression indicates poor prognosis and promotes cell migration and invasion in nasopharyngeal carcinoma. *Exp Cell Res*, 2017. **361**(1): p. 126-134.
252. Janz, M., et al., Y-box factor YB-1 predicts drug resistance and patient outcome in breast cancer independent of clinically relevant tumor biologic factors HER2, uPA and PAI-1. *Int J Cancer*, 2002. **97**(3): p. 278-82.
253. Tay, W.L., et al., Y-Box-binding protein-1 is a promising predictive marker of radioresistance and chemoradioresistance in nasopharyngeal cancer. *Mod Pathol*, 2009. **22**(2): p. 282-90.
254. Bargou, R.C., et al., Nuclear localization and increased levels of transcription factor YB-1 in primary human breast cancers are associated with intrinsic MDR1 gene expression. *Nature Medicine*, 1997. **3**(4): p. 447-450.
255. Uchiumi, T., et al., Enhanced expression of the human multidrug resistance 1 gene in response to UV light irradiation. *Cell Growth Differ*, 1993. **4**(3): p. 147-57.

256. Asakuno, K., et al., Involvement of a DNA binding protein, MDR-NF1/YB-1, in human MDR1 gene expression by actinomycin D. *Biochem Biophys Res Commun*, 1994. **199**(3): p. 1428-35.
257. Stein, U., et al., Hyperthermia-induced nuclear translocation of transcription factor YB-1 leads to enhanced expression of multidrug resistance-related ABC transporters. *J Biol Chem*, 2001. **276**(30): p. 28562-9.
258. Toulany, M., et al., Impact of oncogenic K-RAS on YB-1 phosphorylation induced by ionizing radiation. *Breast Cancer Res*, 2011. **13**(2): p. R28.
259. Shiota, M., et al., Targeting ribosomal S6 kinases/Y-box binding protein-1 signaling improves cellular sensitivity to taxane in prostate cancer. *Prostate*, 2014. **74**(8): p. 829-38.
260. Maier, E., et al., Dual Targeting of Y-Box Binding Protein-1 and Akt Inhibits Proliferation and Enhances the Chemosensitivity of Colorectal Cancer Cells. *Cancers*, 2019. **11**(4): p. 562.
261. Lasham, A., et al., YB-1, the E2F Pathway, and Regulation of Tumor Cell Growth. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 2011. **104**(2): p. 133-146.
262. Janz, M., et al., Y-box factor YB-1 predicts drug resistance and patient outcome in breast cancer independent of clinically relevant tumor biologic factors HER2, uPA and PAI-1. *Int J Cancer*, 2002. **97**(3): p. 278-82.
263. SHIRAIWA, S., et al., Nuclear Y-Box-binding Protein-1 Expression Predicts Poor Clinical Outcome in Stage III Colorectal Cancer. *Anticancer Research*, 2016. **36**(7): p. 3781-3788.
264. Evdokimova, V., et al., Translational activation of snail1 and other developmentally regulated transcription factors by YB-1 promotes an epithelial-mesenchymal transition. *Cancer Cell*, 2009. **15**(5): p. 402-15.
265. Ha, B., et al., YB-1 overexpression promotes a TGF-beta1-induced epithelial-mesenchymal transition via Akt activation. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015. **458**(2): p. 347-51.
266. Kong, X., et al., A novel long non-coding RNA AC073352.1 promotes metastasis and angiogenesis via interacting with YBX1 in breast cancer. *Cell Death & Disease*, 2021. **12**(7): p. 670.
267. Chomczynski, P., A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *Biotechniques*, 1993. **15**(3): p. 532-4, 536-7.
268. Kohno, Y., et al., Expression of Y-box-binding protein dbpC/contrin, a potentially new cancer/testis antigen. *Br J Cancer*, 2006. **94**(5): p. 710-6.
269. Castiglia, D., et al., PIPPIn, a putative RNA-binding protein specifically expressed in the rat brain. *Biochem Biophys Res Commun*, 1996. **218**(1): p. 390-4.
270. Yang, D.-H. and E.G. Moss, Temporally regulated expression of Lin-28 in diverse tissues of the developing mouse. *Gene Expression Patterns*, 2003. **3**(6): p. 719-726.
271. Chua, P.J., et al., Y-box binding protein-1 and STAT3 independently regulate ATP-binding cassette transporters in the chemoresistance of gastric cancer cells. *Int J Oncol*, 2018. **53**(6): p. 2579-2589.
272. Lee, C., et al., Targeting YB-1 in HER-2 Overexpressing Breast Cancer Cells Induces Apoptosis via the mTOR/STAT3 Pathway and Suppresses Tumor Growth in Mice. *Cancer Research*, 2008. **68**(21): p. 8661-8666.
273. Quintas-Cardama, A., et al., Preclinical characterization of the selective JAK1/2 inhibitor INCB018424: therapeutic implications for the treatment of myeloproliferative neoplasms. *Blood*, 2010. **115**(15): p. 3109-17.

274. Shi, J.G., et al., The pharmacokinetics, pharmacodynamics, and safety of orally dosed INCB018424 phosphate in healthy volunteers. *J Clin Pharmacol*, 2011. **51**(12): p. 1644-54.
275. Chen, X., et al., Pharmacokinetics and pharmacodynamics of orally administered ruxolitinib (INCB018424 phosphate) in renal and hepatic impairment patients. *Clinical Pharmacology in Drug Development*, 2014. **3**(1): p. 34-42.
276. Koppikar, P., et al., Heterodimeric JAK-STAT activation as a mechanism of persistence to JAK2 inhibitor therapy. *Nature*, 2012. **489**(7414): p. 155-9.
277. Technology, C.S. *Y-box-binding protein 1*. [cited 2022 06/07]; Available from: <https://www.phosphosite.org/proteinAction?id=2629&showAllSites=true>.
278. Tvorogov, D., et al., Accumulation of JAK activation loop phosphorylation is linked to type I JAK inhibitor withdrawal syndrome in myelofibrosis. *Sci Adv*, 2018. **4**(11): p. eaat3834.
279. Verma, A., et al., Jak family of kinases in cancer. *Cancer Metastasis Rev*, 2003. **22**(4): p. 423-34.
280. Haura, E.B., J. Turkson, and R. Jove, Mechanisms of disease: Insights into the emerging role of signal transducers and activators of transcription in cancer. *Nat Clin Pract Oncol*, 2005. **2**(6): p. 315-24.
281. Chen, E., L.M. Staudt, and A.R. Green, Janus kinase deregulation in leukemia and lymphoma. *Immunity*, 2012. **36**(4): p. 529-41.
282. Thomas, S.J., et al., The role of JAK/STAT signalling in the pathogenesis, prognosis and treatment of solid tumours. *Br J Cancer*, 2015. **113**(3): p. 365-71.
283. Forbes, S.A., et al., COSMIC: mining complete cancer genomes in the Catalogue of Somatic Mutations in Cancer. *Nucleic Acids Res*, 2011. **39**(Database issue): p. D945-50.
284. Genovese, G., et al., Clonal Hematopoiesis and Blood-Cancer Risk Inferred from Blood DNA Sequence. *New England Journal of Medicine*, 2014. **371**(26): p. 2477-2487.
285. Jaiswal, S., et al., Age-Related Clonal Hematopoiesis Associated with Adverse Outcomes. *New England Journal of Medicine*, 2014. **371**(26): p. 2488-2498.
286. Verstovsek, S., et al., A phase 2 study of ruxolitinib, an oral JAK1 and JAK2 Inhibitor, in patients with advanced polycythemia vera who are refractory or intolerant to hydroxyurea. *Cancer*, 2014. **120**(4): p. 513-20.
287. Pieri, L., et al., JAK2V617F complete molecular remission in polycythemia vera/essential thrombocythemia patients treated with ruxolitinib. *Blood*, 2015. **125**(21): p. 3352-3.
288. Harrison, C.N., et al., Long-term findings from COMFORT-II, a phase 3 study of ruxolitinib vs best available therapy for myelofibrosis. *Leukemia*, 2016. **30**(8): p. 1701-7.
289. Falanga, A., et al., Polymorphonuclear leukocyte activation and hemostasis in patients with essential thrombocythemia and polycythemia vera. *Blood*, 2000. **96**(13): p. 4261-4266.
290. Wautier, M.-P., et al., Increased adhesion to endothelial cells of erythrocytes from patients with polycythemia vera is mediated by laminin α 5 chain and Lu/BCAM. *Blood*, 2007. **110**(3): p. 894-901.
291. Arellano-Rodrigo, E., et al., Platelet turnover, coagulation factors, and soluble markers of platelet and endothelial activation in essential thrombocythemia: relationship with thrombosis occurrence and JAK2 V617F allele burden. *Am J Hematol*, 2009. **84**(2): p. 102-8.
292. Raskind, W.H., et al., Evidence for the involvement of B lymphoid cells in polycythemia vera and essential thrombocythemia. *The Journal of Clinical Investigation*, 1985. **75**(4): p. 1388-1390.

293. Reeder, T.L., et al., Both B and T lymphocytes may be clonally involved in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Blood*, 2003. **101**(5): p. 1981-3.
294. Ishii, T., et al., Involvement of various hematopoietic-cell lineages by the JAK2V617F mutation in polycythemia vera. *Blood*, 2006. **108**(9): p. 3128-34.
295. Larsen, T.S., et al., The JAK2 V617F mutation involves B- and T-lymphocyte lineages in a subgroup of patients with Philadelphia-chromosome negative chronic myeloproliferative disorders. *Br J Haematol*, 2007. **136**(5): p. 745-51.
296. Bhullar, J. and V.E. Sollars, YBX1 expression and function in early hematopoiesis and leukemic cells. *Immunogenetics*, 2011. **63**(6): p. 337-50.
297. Jayavelu, A.K., et al., Splicing factor YBX1 mediates persistence of JAK2-mutated neoplasms. *Nature*, 2020.
298. Jinek, M., et al., A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, 2012. **337**(6096): p. 816-21.
299. Gunasekaran, V.P., et al., Identification of 2,4-dihydroxy-5-pyrimidinyl imidothiocarbamate as a novel inhibitor to Y box binding protein-1 (YB-1) and its therapeutic actions against breast cancer. *Eur J Pharm Sci*, 2017.
300. Tanaka, T., et al., 7-Hydroxyindirubin is capable of specifically inhibiting anticancer drug-induced YB-1 nuclear translocation without showing cytotoxicity in HepG2 hepatocellular carcinoma cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2021. **544**: p. 15-21.
301. Bhullar, J. and V.E. Sollars, YBX1 expression and function in early hematopoiesis and leukemic cells. *Immunogenetics*, 2011. **63**(6): p. 337-350.
302. Stivala, S., et al., Targeting compensatory MEK/ERK activation increases JAK inhibitor efficacy in myeloproliferative neoplasms. *J Clin Invest*, 2019. **129**(4): p. 1596-1611.
303. van Roeyen, C.R.C., et al., Y-Box Protein 1 Mediates *PDGF-B* Effects in Mesangioproliferative Glomerular Disease. *Journal of the American Society of Nephrology*, 2005. **16**(10): p. 2985-2996.
304. Castellana, B., et al., Interplay between YB-1 and IL-6 promotes the metastatic phenotype in breast cancer cells. *Oncotarget*, 2015. **6**(35): p. 38239-56.
305. Lyabin, D.N., I.A. Eliseeva, and L.P. Ovchinnikov, *YB-1 synthesis is regulated by mTOR signaling pathway*. *PloS one*, 2012. **7**(12): p. e52527-e52527.
306. Vannucchi, A.M., et al., Prospective identification of high-risk polycythemia vera patients based on JAK2(V617F) allele burden. *Leukemia*, 2007. **21**(9): p. 1952-9.
307. Borowczyk, M., et al., The JAK2 V617F mutational status and allele burden may be related with the risk of venous thromboembolic events in patients with Philadelphia-negative myeloproliferative neoplasms. *Thromb Res*, 2015. **135**(2): p. 272-80.
308. Alvarez-Larran, A., et al., Postpolycythaemic myelofibrosis: frequency and risk factors for this complication in 116 patients. *Br J Haematol*, 2009. **146**(5): p. 504-9.
309. Silver, R.T., et al., JAK2(V617F) allele burden in polycythemia vera correlates with grade of myelofibrosis, but is not substantially affected by therapy. *Leuk Res*, 2011. **35**(2): p. 177-82.
310. Koren-Michowitz, M., et al., JAK2V617F allele burden is associated with transformation to myelofibrosis. *Leuk Lymphoma*, 2012. **53**(11): p. 2210-3.
311. Shirane, S., et al., Consequences of the JAK2V617F allele burden for the prediction of transformation into myelofibrosis from polycythemia vera and essential thrombocythemia. *Int J Hematol*, 2015. **101**(2): p. 148-53.

312. Long, G.V., et al., Increased MAPK reactivation in early resistance to dabrafenib/trametinib combination therapy of BRAF-mutant metastatic melanoma. *Nature Communications*, 2014. **5**(1): p. 5694.
313. Bader, A.G. and P.K. Vogt, Phosphorylation by Akt disables the anti-oncogenic activity of YB-1. *Oncogene*, 2008. **27**(8): p. 1179-82.
314. Chachoua, I., et al., Thrombopoietin receptor activation by myeloproliferative neoplasm associated calreticulin mutants. *Blood*, 2016. **127**(10): p. 1325-1335.

Danksagung

Die Danksagung ist aus Datenschutzgründen in dieser Version nicht enthalten.

Lebenslauf

Der Lebenslauf ist aus Datenschutzgründen in dieser Version nicht enthalten.

Der Lebenslauf ist aus Datenschutzgründen in dieser Version nicht enthalten.

Ehrenerklärung

Ich erkläre, dass ich die der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel:

YB-1-Überexpression in Myeloproliferativen Neoplasien führt zur Therapieresistenz gegenüber JAK-Inhibitoren

in der Klinik für Hämatologie & Onkologie am Zentrum für Innere Medizin der medizinischen Fakultät der Otto-von Guericke Universität Magdeburg

mit Unterstützung durch Prof. Dr. med. Florian H. Heidel

ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe. Bei der Abfassung der Dissertation sind Rechte Dritter nicht verletzt worden. Ich habe diese Dissertation bisher an keiner in- oder ausländischen Hochschule zur Promotion eingereicht. Ich übertrage der Medizinischen Fakultät das Recht, weitere Kopien meiner Dissertation herzustellen und zu vertreiben.

Magdeburg, 15.11.2022

Carolin Herzog

Erklärung zur strafrechtlichen Verurteilung

Ich erkläre hiermit, nicht wegen einer Straftat verurteilt worden zu sein, die Wissenschaftsbezug hat.

Magdeburg, 15.11.2022

Carolin Herzog