

Aus dem Zentrum für Innere Medizin
Klinik für Hämatologie & Onkologie
der Medizinischen Fakultät
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

Einfluss von ABC-Transportern auf die Sensitivität von T-Zellen gegenüber dem Janus-Kinase-Inhibitor Ruxolitinib.

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des Doktorgrades

Dr. med.

(doctor medicinae)

an der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

vorgelegt von Caroline Ebert

geboren am 31.01.1991 in Suhl

Magdeburg, Dezember 2015

Dokumentationsblatt

Bibliographische Beschreibung:

Ebert, Caroline:

Einfluss von ABC-Transportern auf die Sensitivität von T-Zellen gegenüber dem Janus-Kinase-Inhibitor Ruxolitinib. 2015. - 69 Bl., 15 Abb., 11 Tab., 0 Anl.

Kurzreferat

Ruxolitinib ist ein Inhibitor der Janus-Kinase 1 und 2, der in der Behandlung myeloproliferativer Neoplasien klinisch zur Anwendung kommt. Das immunsuppressive Potential von Ruxolitinib ist inzwischen klinisch und experimentell gut dokumentiert. In Voruntersuchungen aus unserer Gruppe konnte gezeigt werden, dass die intrazelluläre Konzentration von ‚small molecule‘ Kinase-Inhibitoren deren Effektivität stark beeinflusst. Hieraus generierten wir die Hypothese, dass die Expression von ABC-Transporterproteinen, die Hemmung von T-Zellen durch den JAK-Inhibitor Ruxolitinib beeinflusst. In durchflusszytometrischen Messungen fanden wir eine Korrelation der ABC-Transporter Oberflächenexpression mit der Aktivierbarkeit von humanen T-Zellen unter Ruxolitinib Behandlung. Dies war in Proben von Patienten und gesunden Probanden nachweisbar. Durch genetische Inaktivierung des prädominant exprimierten Transporters ABCB1 mittels RNA Interferenz konnten wir darüber hinaus funktionell zeigen, dass dieser für die Ruxolitinib Sensitivität der Zellen eine Rolle spielt. Darüber hinaus führte die genetische Inaktivierung von ABCB1 in T-Zellen gesunder Probanden nach Behandlung mit Ruxolitinib zu einer verminderten Proliferation. Weiterhin konnten wir mithilfe einer ABCB1-Efflux Messung belegen, dass Ruxolitinib tatsächlich ein ABCB1 Substrat ist. Wir gehen aufgrund unserer Ergebnisse davon aus, dass eine niedrige ABC-Transporter Expression ein potentieller Prädiktor für eine erhöhte intrazelluläre Akkumulation von Ruxolitinib sein könnte und somit Patienten mit erhöhtem Risiko für infektiöse Komplikationen unter Ruxolitinib Therapie identifizieren könnte. Hieraus ergibt sich ein Ansatz für prospektive klinische Studien um die individuelle Risikokalkulation und Infektions-Prävention für Patienten unter Ruxolitinib Therapie zu verbessern.

Schlüsselwörter

ABC-Transporter, Ruxolitinib, Janus-Kinasen, Myeloproliferative Neoplasien, JAK2, ABCB1, ABCC1, ABCG2, Immunsuppression

Inhaltsverzeichnis

Schlüsselwörter	2
Inhaltsverzeichnis	3
Abbildungsverzeichnis	5
1. Einführung	7
1.1 Aktivierung von Immunzellen und die Rolle der Janus-Kinasen – Bedeutung für die Immunfunktion und inflammatorische Erkrankungen.	7
1.2 Klassifikation, Diagnostik und Therapie der Myeloproliferativen Neoplasien.....	8
1.3 JAK1/2 Inhibitoren hemmen die T-Zell-Aktivität mit einer großen Heterogenität zwischen verschiedenen Individuen.....	12
1.4 ABC-Transporter: Funktion, Bedeutung und bekannte Substrate	13
1.5 Zielsetzung der Arbeit.....	14
2 Material und Methoden	15
2.1 Material	15
2.2 Methoden.....	23
2.2.1 Zellkultur	23
2.2.1.1 Isolation und Zellkultur humaner mononukleärer Zellen.....	23
2.2.1.2 „Lineage Depletion“ zur Isolation humaner T-Zellen.....	23
2.2.1.3 Zellkulturbedingungen für Zelllinien und primäre T-Zellen.....	24
2.2.1.4 Kryokonservierung von Zellen.....	24
2.2.1.5 Ermittlung der Zellzahl.....	25
2.2.1.6 Transfektion von HEK-293T Zellen mit lentiviralen Partikeln.....	25
2.2.1.7 Infektion von Zellen mit lentiviralen Partikeln zum Knockdown von ABCB1	26
2.2.2 Molekularbiologie	27
2.2.2.1 Transformation von E.coli und Plasmidpräparation.....	27
2.2.3 Biochemische Analysen	27
2.2.3.1 Western Blot.....	27
2.2.3.2 Proliferationsmessung mittels MTS-Assay	28
2.2.4 Durchflusszytometrie	29
2.2.4.1 Allgemeines zur Methode.....	29
2.2.4.2 Messung der ABC-Transporter und CD69 Expression auf T-Zellen	29
2.2.4.3 Messung der Proliferation mittels CFSE-Assay	30
2.2.4.4 Messung von Apoptose bzw. Ausschluss toter Zellen	30
2.2.4.5 ABC-Transporter Efflux Assay (Rhodamin123/Hoechst33324).....	31
2.2.5 Software-Anwendungen und Statistik	31

3	Ergebnisse	32
3.1	Die Höhe der Expression von ABC-Transportern ist ein Marker für die Aktivierbarkeit von T-Zellen mit Ruxolitinib behandelter MPN Patienten.	32
3.2	Die Expression von ABC-Transportern korreliert mit der Empfindlichkeit gegenüber Ruxolitinib in CD8-positiven T-Zellen gesunder Probanden.....	36
3.3	Die Expression von ABCB1, ABCC1 und ABCG2 korrelieren auf humanen Zellen	41
3.4	Genetische Inaktivierung von <i>ABCB1</i> mittels RNAi in HEL Zellen	42
3.5	Einfluss des <i>ABCB1</i> Knockdown auf die Proliferation humaner T- Zellen	45
3.6	Der Einfluss der JAK/STAT, PI3K/AKT und MEK/ERK Signaltransduktion auf die Oberflächenexpression von ABCB1 in T-Zellen	47
3.7	Messung der Transportfunktion von ABCB1 und ABCG2 unter Ruxolitinib Behandlung ..	51
4	Diskussion	53
5	Zusammenfassung	58
6	Danksagung.....	59
7	Lebenslauf	60
8	Erklärung.....	62
9	Literaturverzeichnis.....	63

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
AKT	Protein Kinase B
CD	Cluster of Differentiation
CFSE	Carboxyfluorescein succinimidyl ester
CSF	Koloniestimulierender Faktor
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ERK	Extracellular-signal Regulated Kinase
ET	Essentielle Thrombozythämie
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FBS	Fetal bovine serum (Fetales Kälberserum)
FCS	Forward Scatter
HEL	Humane Erythro-Leukämie (Zelllinie)
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
INF	Interferon
ITAM	Immunoreceptor tyrosine-based activation motif
JAK	Janus Kinase
LAT	Linker for activation of t cells
LB	Luria Bertani

LCK	Light chain kinase
MAPK	Mitogen-activated protein kinases
MEK	Mitogen-activated protein kinase/ extracellular- signal regulated kinase-kinase
MF	Myelofibrose
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität
MPN	Myeloproliferative Neoplasien
MTS	(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium)
NBD	Nucleotide-binding domain
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cell (mononukleäre Zellen des peripheren Blutes)
PBS	Phosphate buffered saline (Phosphatgepufferte Salzlösung)
PHA	Phytohemagglutinin
PI3K	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase
PMF	Primäre Myelofibrose
PV	Polycythämia Vera
RA	Rheumatoide Arthritis
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	Ribonukleinsäure-Interferenz
S.O.C	Super optimal broth with catabolite repression
scr	Scrambled
shRNA	Small hairpin RNA
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
SSC	Side Scatter
STAT	Signal Transducers and Activators of Transcription
TBST	Tris-buffered saline + Tween 20
TCR	T-Zell Rezeptor
TMD	Transmembrane domain
TNF	Tumornekrosefaktor
ZAP 70	Zeta-chain-associated protein kinase 70

Abbildungsverzeichnis

Abbildungs-Nummer	Titel der Abbildung	Seite
1	Herstellung lentiviraler Partikel und Infektion von Zielzellen	26
2	Durchflusszytometrische Messung der Expression von ABC-Transportern und CD69 auf der Zellmembran von T-Zellen Ruxolitinib behandelter Patienten	33
3	Zusammenhang zwischen T-Zell Aktivierbarkeit und ABC-Transporter Expression in Proben aus MPN-Patienten unter Ruxolitinib Therapie	34

4	Variable klinische Einflussfaktoren haben keinen Einfluss auf die CD69 und ABCB1 Expression in T-Zellen mit Ruxolitinib behandelter MPN-Patienten	35
5	Ruxolitinib hemmt die Aktivierung und Proliferation in T-Zellen gesunder Spender	36
6	Durchflusszytometrische Bestimmung der ABC-Transporter Expression auf der Zellmembran von T-Zellen gesunder Probanden.	37
7	Korrelation der ABC-Transporter Oberflächenexpression mit der CD69 Reduktion durch Behandlung mit Ruxolitinib in Proben gesunder Probanden.	38
8	Korrelation der ABC-Transporter Oberflächenexpression mit der Proliferationsrate nach Behandlung mit Ruxolitinib in Proben gesunder Probanden	40
9	Korrelation der Oberflächenexpression von ABCB1 mit der Oberflächenexpression von ABCC1 und ABCG2 auf T-Zellen gesunder Probanden	41
10	<i>ABCB1</i> Knockdown in HEL Zellen	43
11	<i>ABCB1</i> Knockdown in T-Zellen gesunder Probanden	46
12	Einfluss des JAK/STAT Signalwegs auf die ABCB1 Expression	48
13	Einfluss des Ras/Mek/Erk und PI3K/Akt Signalweges auf die Expression von ABCB1	49
14	Modell der Funktion und Regulation von ABCB1 auf T-Zellen.	50
15	Ruxolitinib hemmt den Substrat-Efflux über ABCB1.	52

Tabellenverzeichnis

Titel der Tabelle	Seite
Verwendete Suspensions-Zelllinien	15
Verwendete adhärenzte Zelllinien	15
Bakterienstämme	15
Plasmide	15
Inhibitoren	16
Chemikalien und Fertiglösungen	16
Verwendete Zellkultur- und Reaktionsgefäße	18
Verwendete Geräte	18
Sonstige Materialien	19
Verwendete primäre Antikörper	19
Software	20

1. Einführung

1.1 Aktivierung von Immunzellen und die Rolle der Janus-Kinasen – Bedeutung für die Immunfunktion und inflammatorische Erkrankungen.

Die Zellen des Immunsystems benötigen zur Aktivierung ihrer Funktion verschiedenste Signale, die abhängig von Ort und Zeitpunkt der Exposition unterschiedliche Wirkungen haben können. Dabei haben neben den Antigen-Rezeptor vermittelten Signalen kostimulatorische Moleküle und Zytokin vermittelte Signale eine wichtige Funktion zur Modulation der Immun-Aktivierung.

In T-Zellen wird das Antigen vermittelte Signal über den T-Zell-Rezeptorkomplex generiert. Der T-Zell-Rezeptor (TCR) besteht aus einer α - und β - Untereinheit. Der TCR ist assoziiert mit zwei CD3 Transmembranproteinen bestehend aus verschiedenen Untereinheiten. Zur Generierung des TCR Signals werden zusätzlich die Moleküle CD4 bzw. CD8 benötigt, welche die „Light Chain Kinase“ (LCK) aktivieren. Die LCK phosphoryliert das „immunoreceptor tyrosine-based activation motif“ (ITAM), einen Teil des TCR Komplexes. Erst durch diese Phosphorylierung kann das TCR Signal durch die ITAMs auf die ZAP70 Kinase übertragen werden. Zur folgenden Aktivierung wichtiger zellulärer Signalwege wird ein weiteres assoziiertes Molekül, „The Linker for Activation of T cells“ (LAT) benötigt. LAT wird intrazellulär von ZAP70 phosphoryliert und aktiviert in der T-Zelle unter anderem den PI3K/AKT und den MAP-Kinase Signalweg. Zur physiologischen Aktivierung der T-Zelle ist außerdem eine Kostimulation über CD28 notwendig um z.B. eine effiziente T-Zell Proliferation auszulösen (Kannan et al. 2012; Scharl M et al. 2009).

Die Konsequenz einer TCR Stimulation für die Zelle ist jedoch stark abhängig von Zytokin vermittelten Signalen, die ebenfalls auf die Zelle wirken (Huang und August 2015). Zytokine sind Botenstoffe die Proliferation, Differenzierung und Migration von Immun-Zellen regulieren. Zu ihnen zählen unter anderem Interleukine (IL), Interferone (INF), Koloniestimulierende Faktoren (CSF) und Tumornekrosefaktoren (TNF). Zytokine spielen somit eine große Rolle in der Regulierung des Immunsystems und damit auch für viele Autoimmunerkrankungen wie z.B. Rheumatoide Arthritis (RA), Colitis ulcerosa, Psoriasis, Alopecia areata und Multiple Sklerose. Dabei sind vor allem IL-1, IL-6, IL-17, IL-23, TNF- α , INF- γ , ausschlaggebend für die Manifestation und den Verlauf der Erkrankungen (Islam et al. 2015; Pasquali et al. 2015; Ferreira et al. 2014; Xing et al. 2014; Tanemura et al. 2013; Strober und Fuss 2011; Nestle et al. 2009; Feldmann und Maini 2008; Ghoreschi et al. 2007) . Die

Vermittlung der Zytokin Signale erfolgt über Zytokinrezeptoren. Interleukine, Interferone, Kolonie stimulierende Faktoren, Erythropoetin, Thrombopoetin, und Wachstumshormone binden an Typ I und Typ II Zytokin Rezeptoren (Boulay et al. 2003; Drachman et al. 1999). Diese sind Transmembranproteine die durch eine Bindung des entsprechenden Zytokins Dimere bilden und über ihre zytoplasmatischen Domänen Signalkaskaden aktivieren. Janus-Kinasen sind intrazellulär mit vielen dieser Rezeptoren assoziiert. Nach Aktivierung des Zytokin-Rezeptors durch Bindung eines Liganden kommt es zur Phosphorylierung von JAKs welche dann u.a. die „Signal Transducers and Activators of Transcription“ (STATs) phosphorylieren und aktivieren. Die STATs dimerisieren nach Aktivierung und starten im Zellkern die Transkription ihrer Zielgene. Weiterhin findet unterhalb der JAKs eine Signaltransduktion über die "Mitogen-aktivierte Proteinkinase-Kaskade" (MAPK), sowie über den Proteinkinase B – Signalweg (PI3K/Akt) statt. Dadurch sind Zytokin-Rezeptoren unter anderem in der Lage Proliferation, Differenzierung und andere funktionelle Parameter von Zellen zu beeinflussen (Jang und Baik 2013; O'Shea und Murray 2008). Zytokinrezeptoren sind in der Lage unterschiedliche Typen von Janus Kinasen zu rekrutieren, welche wiederum verschiedene STAT- Proteine aktivieren. Zu der Familie der Janus-Kinasen (JAKs) gehören JAK1, JAK2, JAK3 und TYK2 (Yamaoka et al. 2004; Leonard und O'Shea 1998). Neben den schon erwähnten immunologischen Erkrankungen spielen JAKs eine wichtige Rolle in der Pathogenese myeloproliferativer Neoplasien (MPN). Bei dieser Gruppe von hämatologischen Erkrankungen kommt es zu einer verstärkten Proliferation einer oder mehrerer myeloischer Zellreihen, maßgeblich durch eine aktivierende Mutation im JAK2-Gen (Kralovics et al. 2005; Levine et al. 2005; Baxter et al. 2005; James et al. 2005). Interessanter Weise kommt es bei diesen Erkrankungen neben der Hyperproliferation zu einer verstärkten Produktion proinflammatorischer Zytokine (Pourcelot et al. 2014). Die JAKs sind aufgrund ihrer Beteiligung an verschiedensten Signalwegen proinflammatorischer Zytokine ein attraktives Ziel für eine therapeutische Intervention bei entzündlichen Erkrankungen (Ghoreschi und Gadina 2014). Bei der Therapie von myeloproliferativen Neoplasien führt der JAK Inhibitor Ruxolitinib zu einer deutliche Symptomreduktion im Vergleich zur Standardtherapie (Vannucchi 2015; Harrison et al. 2012), allerdings treten gehäuft infektiöse Nebenwirkungen auf (Caocci et al. 2014; Wysham et al. 2013; Goldberg et al. 2013; Colomba et al. 2012).

1.2 Klassifikation, Diagnostik und Therapie der Myeloproliferativen Neoplasien

Als Myeloproliferative Neoplasien (MPN) lassen sich eine Reihe von Syndromen zusammenfassen, bei denen es durch einen Stammzelldefekt zur abnormen Proliferation einer oder mehrerer hämatopoetischer Zellreihen kommt (Levine und Gilliland 2008; Braun und

Aries 2000; Adamson et al. 1976). Innerhalb der MPN unterscheidet man zwischen unterschiedlichen zugrunde liegenden Mutationen. Dabei wird vor allem die Philadelphia Chromosom-positive chronisch myeloische Leukämie (CML) von den Philadelphia negativen MPN abgegrenzt. Bei der CML kommt es durch eine Translokation von Teilen des Chromosoms 22 auf das Chromosom 9 (t[9;22]-Philadelphia-Chromosom) zur Entstehung eines *BCR-ABL-Fusionsgens*, welches als Protoonkogen für eine Tyrosinkinase kodiert. Durch konstitutive Aktivierung der Kinase kommt es zu einem überschießenden Wachstum hauptsächlich funktionstüchtiger Granulozyten mit unreifen Vorstufen der Granulopoese im peripheren Blut (Braun und Aries 2000). In diesen Patienten kann durch eine medikamentöse Hemmung der BCR-ABL Kinase eine Langzeit Remission der CML erreicht werden. Täglich eingenommen ermöglicht der Kinase-Inhibitor Imatinib CML Patienten ein 10-Jahres Überleben von ca. 86%. Zur Therapie Imatinib resistenter CML Patienten sind BCR-ABL-Inhibitoren der zweiten Generation wie Nilotinib sowie der Multikinase Inhibitor Dasatinib als Mittel der zweiten Wahl zugelassen (Baccarani et al. 2015).

Zu den Philadelphia Chromosom-negativen MPN zählen die Polycythämia Vera (PV), die Essentielle Thrombozythämie (ET) und die Myelofibrose (MF). Bei der Polycythämia Vera kommt es zu einer gesteigerten Proliferation hauptsächlich der erythroiden Zellreihe, wobei zusätzlich die Megakaryopoese und damit die Thrombopoese sowie die Granulopoese gesteigert sein können. Daraus resultieren eine erhöhte Viskosität des Blutes und damit eine verstärkte Thrombosegefahr. Allerdings kann es in einigen Fällen durch Dysfunktion von Thrombozyten auch zu einer erhöhten Blutungsneigung kommen (Lengfelder 2013; Braun und Aries 2000). Als Standardtherapie werden bei einem Hämatokrit über 45%, vor allem bei jüngeren Patienten, Aderlässe im Abstand von einer bis mehreren Wochen durchgeführt. Hydroxyurea ist das wichtigste Medikament für die zytoreduktive Therapie vor allem bei älteren Patienten. Aufgrund der möglichen Beeinträchtigung der Fruchtbarkeit und der toxischen Wirkung auf Haut und Schleimhaut vor allem bei Langzeitanwendung ist dieses Medikament bei jüngeren Patienten zurückhaltend einzusetzen. Für diese Patienten (jünger 60 Jahre) bleibt neben Aderlässen vor allem die Immuntherapie mit Interferon- α eine wichtige therapeutische Option (Lengfelder et al. 2006). In der Spätphase der Erkrankung kommt es bei ca. 25% der Patienten zu einer progredienten Knochenmark-Fibrose (Post-PV-Myelofibrose) und stark zunehmender Splenomegalie. Je nach Behandlung kann es bei 1,5-13% der Patienten zu einer Transformation in eine akute Leukämie kommen (Tefferi et al. 2013; Bonicelli et al. 2013).

Bei der Essentiellen Thrombozythämie (ET) kommt es zu einer massiv gesteigerten Thrombozytopoese. Die Patienten fallen nicht selten mit Thrombozytenzahlen über 1000/nl auf. Zur Reduktion der Thrombozyten wird Hydroxyurea als First-Line Therapie zur Zytoreduktion eingesetzt. Weiterhin zeigen Fallstudien eine gute Wirksamkeit von Interferon- α und Anagrelide, welches spezifisch die Thrombopoese hemmt (Braun und Aries 2000). Diese beiden therapeutischen Optionen sind sowohl für jüngere als auch für ältere Patienten geeignet. Auch die ET kann in eine Myelofibrose oder in eine Leukämie transformieren (Tefferi und Barbui 2015).

Bei der Myelofibrose kommt es zu einer Vermehrung von Retikulinfasern im Knochenmark und damit zu einer Verdrängung der Hämatopoese gefolgt von Knochenmarksinsuffizienz in späteren Stadien. Man unterscheidet die primäre Myelofibrose und die sekundäre Post- PV- oder Post- ET- Myelofibrose. Meist kommt es nach einem initialen Anstieg der Leuko- und Thrombozyten im Verlauf zu einer Panzytopenie. Für die Myelofibrose gilt die allogene Stammzelltransplantation als einziger kurativer Ansatz. Durch das oft schon vorgeschrittene Alter der Patienten ist diese oft mit schweren Komplikationen verbunden und bedarf damit einer sorgfältigen Risikoabwägung. Je nach Blutbild des Patienten können die bei PV und ET besprochenen Standardmedikamente zum Einsatz kommen.

Bei ca. 96% der PV-Patienten, und etwa 50% der ET- und PMF (Primäre Myelofibrose) – Patienten kann eine Punktmutation im JAK2 Gen nachgewiesen werden, die zu einer Aktivierung von JAK2 führt (JAK2V617F). Dabei kommt es zum Austausch von Guanin durch Thymin an der 2343. Nukleotid-Position im *JAK2-Gen* und dadurch zu einem Basentausch von Valin gegen Phenylalanin an der Aminosäureposition 617 des JAK2 Moleküls. Es resultiert eine unkontrolliert gesteigerte Kinaseaktivität und eine damit verbundene erhöhte Proliferationsrate (Kralovics et al. 2005; Levine et al. 2005; Baxter et al. 2005; James et al. 2005). Setzt man den Anteil des mutierten Allels in Beziehung zum Anteil des gesamten *JAK2 Allels* in der DNA aus Blutproben von Patienten zeigt sich typischerweise mit einem Fortschreiten der Erkrankung ein Anstieg der Mutationslast (allele burden) der Patienten. Damit einhergehend zeigen Patienten mit höherer Mutationslast einen schwereren Krankheitsverlauf (Takahashi et al. 2013; Silver et al. 2011; Larsen et al. 2007; Vannucchi et al. 2007). In der Mehrzahl der JAK2V617F negativen ET und PMF Patienten können Mutationen im *Calreticulin* oder *MPL-Gen* sowie in etwa 4% der JAK2V617F negativen PV Patienten eine *JAK2 Exon 12* Mutation gefunden werden. PV Patienten mit einer *JAK2 Exon 12* Mutation weisen zum Diagnosezeitpunkt oft ein jüngeres Erkrankungsalter, höhere Hämoglobin- und niedrigere Thrombozyten Werte auf als PV Patienten mit *JAK2V617F* Mutation (Scott et al.

2007). Eine Mutation im Thrombopoetin Rezeptor *MPL* (*MPL W515L* oder *W515K*) in PMF und ET Patienten führt zu einer Thrombopoetin unabhängigen Rezeptor Aktivierung (Pikman et al. 2006). Dadurch kommt es zu einer Steigerung der Megakaryopoese und Thrombopoese ohne eine zusätzlich gesteigerte Erythropoese wie bei vielen Patienten mit *JAK2V617F* Mutation (Beer et al. 2008). PMF Patienten, welche die *MPL* Mutationen tragen, weisen ein oft höheres Alter, höhere Thrombozytenwerte, niedrigere Hämoglobin Werte sowie eine geringere Knochenmarkszellularität auf und müssen häufiger transfundiert werden. Thrombotische Ereignisse treten nicht häufiger auf (Beer et al. 2008; Guglielmelli et al. 2007). *MPL* Mutationen finden sich bei ca. 7% aller PMF Patienten, bzw. in 15% der *JAK2V617F* negativen PMF-Patienten sowie bei 4,1 % aller ET -, bzw. 8,5 % aller *JAK2V617F* negativen ET-Patienten (Beer et al. 2008). Bei 70-84% der *JAK2V617F* negativen MPN Patienten kann eine Frame-Shift Mutation im *Calreticulin Gen* (*CALR*) gefunden werden (Nangalia et al. 2013). Dabei handelt es sich um ein Kalzium bindendes Protein, dass die Weitergabe fehlgefalteter Proteine vom Endoplasmatischen Retikulum zum Golgi-Apparat verhindert (Michalak et al. 2002). Patienten mit einer *CALR* Mutation weisen im Vergleich zu *JAK2V617F* positiven Patienten ein eher jüngeres Alter, eine stärker ausgeprägte Splenomegalie sowie höhere Thrombozytenwerte und einen niedrigeren Hämoglobin Wert auf (Sazawal et al. 2015; Michalak et al. 2002).

Neben den schon genannten Symptomen treten bei den MPN Patienten eine Erhöhung inflammatorischer Zytokine, eine teilweise enorme Splenomegalie, und unspezifische Symptome wie Fatigue, Schlafstörungen, Juckreiz, Nachtschweiß, Kopfschmerzen, Gewichtsverlust und Fieber gehäuft auf (Scherber et al. 2011). Diese Symptome sind bei Patienten mit *JAK2V617F* Mutation stärker ausgeprägt als bei *JAK2V617F* negativen Patienten. *JAK2V617F* positive PMF-Patienten weisen zudem höhere Leukozyten Werte, eine häufigere Notwendigkeit für zytoreduktive Therapien, höhere Raten an leukämischen Transformationen und eine dadurch erniedrigte Überlebenszeit auf (Barosi et al. 2007; Campbell et al. 2006). Durch die Inhibition von JAK2 und JAK1 durch Ruxolitinib kann eine drastische Verbesserung dieser inflammatorischen Symptome erzielt werden. Es kommt zu einer Größenabnahme der Milz, einem Abfall der inflammatorischen Zytokine im Serum und zu einem gesteigerten Wohlbefinden der Patienten (Verstovsek et al. 2013; Harrison et al. 2012; Tefferi et al. 2011; Verstovsek et al. 2010). Der Einsatz von Ruxolitinib hat die Therapiemöglichkeiten myeloproliferativer Neoplasien revolutioniert. Ruxolitinib zeigt eine gute Verträglichkeit mit wenigen Nebenwirkungen wie Kopfschmerzen, Schwindel, sowie einer transienten Anämie und Thrombopenie, die durch eine passagere Dosisreduktion

verbessert werden können (Galli et al. 2014). Der enorme Vorteil gegenüber der bisherigen Standardtherapie liegt in einer im Vergleich zu Hydroxyurea besseren Symptomkontrolle und der geringeren Toxizität (v.a. der Haut-Toxizität). Auch in PV Patienten konnte ein Vorteil der Ruxolitinib Therapie in Bezug auf Krankheitsprogress und inflammatorischer Symptomen gezeigt werden (Vannucchi et al. 2015). Auf Basis dieser Daten erfolgte in Deutschland im Mai 2015 die Zulassung für Ruxolitinib als Zweitlinien Therapie nach Hydroxyurea für PV. In Studien konnte gezeigt werden, dass Ruxolitinib die Differenzierung von dendritischen Zellen einschränkt und zu einer Verminderung der NK- und T-Zell Aktivierung führt (Parampalli Yajnanarayana et al. 2015; Schonberg et al. 2015; Heine et al. 2013b; Heine et al. 2013a). Auch in der Therapie der nach allogener Stammzelltransplantation auftretenden Graft-versus-Host Erkrankung zeigt Ruxolitinib eine gute Effizienz durch seine Hemmung zytotoxischer T-Zellen (Spoerl et al. 2014). Diese durch JAK Inhibition ausgelöste Immunmodulation und die damit verbundene reduzierte immunologische Kompetenz, führt jedoch bei einigen wenigen Patienten zum Auftreten infektiöser Komplikationen. In der Literatur finden sich Berichte über Herpes-Zoster und -Simplex Reaktivierungen, Retinale Toxoplasmose, Tuberkulose Reaktivierung, Cryptococcus neoformans Pneumonie und progressive multifokale Leukenzephalopathie assoziiert mit einer Ruxolitinib Behandlung (Keizer et al. 2015; Vannucchi et al. 2015; Caocci et al. 2014; Wysham et al. 2013; Goldberg et al. 2013; Wathes et al. 2013; Colomba et al. 2012).

1.3 JAK1/2 Inhibitoren hemmen die T-Zell-Aktivität mit einer großen Heterogenität zwischen verschiedenen Individuen.

Durch Daten aus der Literatur wissen wir, dass die Funktion und Differenzierung von T-Zellen in Patienten unter Ruxolitinib Therapie massiv gestört ist (Parampalli Yajnanarayana et al. 2015). In den Vorarbeiten unserer Gruppe zum Thema JAK-Inhibition in T-Zellen, haben wir uns mit der Bedeutung von JAK1 und JAK2 für die T-Zell Funktion beschäftigt. Unter Behandlung mit Ruxolitinib kommt es zur Reduktion der Proliferation und Aktivierung von CD4- und CD8- positiven T-Zellen in MPN-Patienten und gesunden Spendern. Wir konnten *in vitro* und *in vivo* zeigen, dass die Hemmung von JAK1 maßgeblich für den immunsuppressiven Phänotyp, der unter Ruxolitinib Behandlung beobachtet wird, verantwortlich ist (Perner et al. 2015). Eine spezifische pharmakologische Inhibition von JAK2 mit dem Hemmstoff BSK805, sowie genetische Inaktivierung von *JAK2* hatten in diesen Experimenten keinen Einfluss auf die T-Zell Proliferation *in vitro*. Nach genetischer Inaktivierung von *JAK1* mittels RNA-Interferenz (RNAi) hingegen, war der immunsuppressive Phänotyp, der nach pharmakologischer Inhibition von JAK1/2 (z.B. durch Ruxolitinib) beobachtet wurde, reproduzierbar. Zur Bestätigung dieses Phänotyps *in vivo*, verwendeten wir ein Mausmodell

der Graft-versus-Host-Erkrankung (GvHD). Hierbei wurden nicht-syngene T-Zellen, mit Knockdown von *JAK1* oder *JAK2* (RNA-Interferenz) bzw. „Non-targeting Controls“, in bestrahlte Mäuse injiziert. Nach zwei Wochen erfolgte die Tötung der Tiere und die Analyse des GvHD Grades im Darm per histologischer Untersuchung. Auch hier zeigte sich ein immunsuppressiver Effekt als Reduktion des GvHD-Grades lediglich nach Knockdown von *JAK1*.

Weiterhin konnten wir zeigen, dass nach Knockdown von *JAK1* eine Blockade des STAT1 Signals unterhalb des Interferon-gamma Rezeptors, sowie eine Hemmung von STAT1, STAT5, ERK und AKT unterhalb des IL2-Rezeptors stattfindet. Nach *JAK2* Knockdown findet sich in keinem dieser Signalwege eine reduzierte Phosphorylierung im Western Blot. Diese Daten spiegeln unsere Beobachtungen nach spezifischer bzw. unspezifischer Hemmung der JAKs durch entsprechende Pharmaka wieder.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen nach genetischer Inaktivierung von *JAK1*, tritt bei pharmakologischer Inhibition z.B. durch Ruxolitinib bei vielen Experimenten eine große Heterogenität der Messwerte auf. Bezogen auf den Aktivierungsmarker CD69 und die Analyse von zellulärer Proliferation, finden sich Patienten und Probanden ohne Zeichen einer T-Zell Hemmung genauso wie einzelne Proben mit einer sehr ausgeprägten Immunkompromittierung. Ausgehend von dieser Beobachtung haben wir die Hypothese aufgestellt, dass zelluläre Transportmechanismen dafür sorgen, dass Ruxolitinib in T-Zellen verschiedener Probanden unterschiedlich potent wirkt.

1.4 ABC-Transporter: Funktion, Bedeutung und bekannte Substrate

ATP-Binding Cassette (ABC) Transporter sind eine Proteinfamilie, die ubiquitär in Pro- und Eukaryonten vorkommt (Wu et al. 2011; Borths et al. 2002; Higgins 1992). Sie haben unterschiedliche Funktionen wobei sie immer Stoffe aktiv durch Membranen gegen das Konzentrationsgefälle transportieren. Die Energiebereitstellung erfolgt über die hydrolytische Spaltung von ATP in ADP (Locher und Borths 2004; Locher 2004). Bisher sind 48 verschiedene ABC-Transporter identifiziert, die in 7 Untergruppen ABCA-ABCG eingeteilt werden (Wu et al. 2008; Dean et al. 2001). ABC-Transporter bestehen aus zwei nucleotid-binding-domains (NBDs) und zwei Transmembran-Domänen (TMDs). Sie werden topologisch basierend auf der NBD Sequenz klassifiziert (Rees et al. 2009; Deeley et al. 2006).

ABC-Transporter sind unverzichtbar für den Transport von wichtigen Substraten wie Aminosäuren, Kohlenhydraten, Metaboliten, Peptiden, Lipiden, Proteinen sowie Medikamenten durch extra- und intrazelluläre Membranen (Dean et al. 2001). Dieser Mechanismus dient unter anderem zum Schutz der Zelle vor toxischen Stoffen (Sarkadi et al.

2006). Die intrazelluläre Konzentration von Substraten der ABC-Transporter ist abhängig von deren Expression und von in der Normalbevölkerung vorkommenden Polymorphismen in *ABC-Genen*, welche sich auf die Aktivität auswirken können (Choi und Yu 2014; Bruhn und Cascorbi 2014). Außerdem sind zahlreiche klinisch angewandte Medikamente Substrate der ABC-Transporter. Besonders in der Therapie von malignen Erkrankungen mit zytotoxischen Substanzen ist die Beteiligung dieser Proteine gut charakterisiert. Es konnte gezeigt werden, dass die Aktivität von ABC-Transportern eine wichtige Rolle für die Wirkung vieler Chemotherapeutika hat. Wichtige Beispiele hierfür sind Anthracycline, Vinca-Alkaloide, Metotrexat, Mitoxantron oder Taxane (Hoffmann und Kroemer 2004).

Bezüglich des Einflusses der ABC-Transporter auf die Sensitivität von Zellen des Immunsystems gegenüber klinisch angewandten Therapeutika, finden sich weniger Informationen in der Literatur. Gut beschrieben ist der Einfluss von ABC-Transportern auf die Wirksamkeit antiviraler Substanzen wie *h* oder *h* in der HIV Therapie (g et al. 2013; Roy et al. 2009). In vielen Studien unter anderem aus unserer Gruppe, konnte gezeigt werden, dass die ABC-Transporter ABCB1, ABCC1 und ABCG2 eine entscheidende Rolle für Resistenzen gegenüber TKIs wie Imatinib, Nilotinib und Dasatinib in der Therapie der CML spielen (Agrawal et al. 2014; Eadie et al. 2014; Lipka et al. 2012; Gromicho et al. 2011). Eine erhöhte Aktivität von ABC-Transportern führt dabei zu einem vermehrten Efflux des jeweiligen TKI und somit zur verminderten Wirksamkeit. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass der JAK1/2 Inhibitor Momelotinib ebenfalls ein Substrat von ABCB1 und ABCG2 ist. Beide Transporter wirken hier synergistisch an der Blut-Hirn-Schranke zum effektiven Export von Momelotinib aus dem ZNS (Durmus et al. 2013).

ABC-Transporter üben somit einen entscheidenden Einfluss auf die intrazelluläre Verfügbarkeit verschiedenster Medikamente aus. Studien in Knockout-Mäusen konnten zeigen, dass nach genetischer Inaktivierung von *ABCB1* eine massive Akkumulation von Substraten unter anderem im ZNS stattfindet (Schinkel et al. 1994). Die zelluläre Verfügbarkeit von Substanzen ist somit immens von ABC-Transportern im jeweiligen Kompartiment abhängig und kann durch die Messung von Plasmaspiegeln nur schwer abgeschätzt werden.

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist die Identifikation von Determinanten, für das Ausmaß der T-Zell Hemmung in Patienten unter Therapie mit dem Janus-Kinase-Inhibitor Ruxolitinib. Aufgrund von Daten unserer Gruppe sowie Hinweisen aus der Literatur, haben wir uns für eine Untersuchung der ABC-Transporter ABCB1, ABCC1 und ABCG2 entschieden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

Verwendete Suspensions-Zelllinien

Zelllinie	Firma/Herkunft
HEL Zellen (sekundäre AML M6 im Rezidiv, Expression von JAK2V617F)	DSMZ Braunschweig

Verwendete adhärenzte Zelllinien

Zelllinie	Firma/Herkunft
293T (humane embryonale Nierenkarzinom Zelllinie)	DSMZ Braunschweig

Bakterienstämme

Bakterienstamm	Eigenschaft	Firma/Herkunft
One shot Top 10 chemically competent E.coli	F- Φ 80dlacZ Δ M15, Δ (lacZYA-argF)U169, deoR, recA1, endA1, hsdR17(rK-, mK+), phoA, supE44, λ -thi-1, gyrA96, relA1	Life Technologies

Plasmide

Plasmid	Sequenz des Inserts	Vektor/ Größe	Firma/Herkunft
Non-Target shRNA (scr-shRNA)	5'- CCGGGCGCGATAGCGCTAATAA TTTCTCGAGAAATTATTAGCGC TATCGCGCTTTTT-3'	pLKO.1- puro/ 7,1kb	Sigma Aldrich / St. Louis
ABCB1 shRNA1	5'- CCGGCCGAACACATTGGAAGG AAATCTCGAGATTTCTTCCAA TGTGTTTCGGTTTTTG-3'	pLKO.1- puro/ 7,1kb	Sigma Aldrich / St. Louis
ABCB1 shRNA2	5'- CCGGGCAGCAATTAGAACTGTG ATTCTCGAGAATCACAGTTCTA ATTGCTGCTTTTTG-3'	pLKO.1- puro/ 7,1kb	Sigma Aldrich / St. Louis
ABCB1 shRNA3	5'- CCGGCGACAGAATAGTAACTTG TTTCTCGAGAAACAAGTTACTA TTCTGTCGTTTTTG-3'	pLKO.1- puro/ 7,1kb	Sigma Aldrich / St. Louis
ABCB1 shRNA4	5'- CCGGGCTCATCGTTTGTCTACA	pLKO.1- puro/	Sigma Aldrich / St. Louis

	GTTCTCGAGAACTGTAGACAAA CGATGAGCTTTTTG-3'	7,1kb	
ABCB1 shRNA5	5'- CCGGGCTGCTTTCCTGCTGATC TATCTCGAGATAGATCAGCAGG AAAGCAGCTTTTTG-3'	pLKO.1- puro/ 7,1kb	Sigma Aldrich / St. Louis
psPAX	Lentivirales Packungsplasmid	10,7kb	Didier Trono Lab
pDM2	Codiert für ein lentivirales Hüll-Antigen	5,8kb	Didier Trono Lab

Inhibitoren

Inhibitor	Firma/Herkunft
Ruxolitinib (JAK1, JAK2)	Novartis
UO126 (MEK/ERK)	Cell Signaling Technology
LY294002 (AKT/PI3K)	Calbiochem® Merck Millipore

Chemikalien und Fertiglösungen

Substanz	Firma/Herkunft
Acrylamid	Carl Roth, Karlsruhe
Agar	Carl Roth, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Ampicillin	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Asparagin	Carl Roth, Karlsruhe
Bacto-Hefeextrakt	Carl Roth, Karlsruhe
Bacto-Trypton	Carl Roth, Karlsruhe
Bromphenol Blau	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
BSA, Fraktion V	Carl Roth, Karlsruhe
Complete (Protease Inhibitor Cocktail)	Hoffmann-La Roche, Basel, Schweiz
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth, Karlsruhe
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Ethylenglycol-bis(aminoethylether)- tetraessigsäure (EGTA)	Roth
Ficoll-Paque PLUS	GE Healthcare
Freka®-Derm Hautdesinfektionsmittel	Dr. Schumacher GmbH, Malsfeld
FuGENE®	Promega
Glycerol	Carl Roth, Karlsruhe
Glycin	Carl Roth, Karlsruhe
Gibco® DPBS (1 x)	Life Technologies

Gibco® RPMI	Life Technologies
Gibco® DMEM (1 x)	Life Technologies
Hefeextrakt	Roth
HEPES	Carl Roth, Karlsruhe
Hoechst 33324	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
IGEPAL CA-630 (Octylphenoxy poly(ethyleneoxy)ethanol)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Kälberserum (FBS)	PAA Laboratories, Pasching. Österreich
L-Glutamin	Life Technologies
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Magnesiumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumfluorid NaF	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Natriumorthovanadat Na ₃ VO ₄	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Natriumpyruvat	Life Technologies
N-dodecyl β-maltoside	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Nichtessenzielle AS, 10-fach konzentriert	Life Technologies
Opti-MEM®	Life Technologies
Penicillin-Streptomycin	Life Technologies
Pepton	Roth
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Phytohemagglutinin-L (PHA-L)	Roche
Plasmocin™ Prophylactic	Life Technologies
Proleukin®S (humanes rekombinantes IL-2)	Novartis
Rhodamin 123	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
RNase freies Wasser	QIAGEN
Salzsäure	Carl Roth, Karlsruhe
S.O.C. Medium	Life Technologies
SuperSignal® Chemolumineszenz Substrat	Life Technologies
SYTOX® Blue	Life Technologies

Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Carl Roth, Karlsruhe
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS)	Carl Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Trockenmilchpulver	Fluka-Chemie, Deisenhofen
Trypanblau	Life Technologies
Tween 20	Fluka-Chemie, Deisenhofen
Verapamil	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA

Verwendete Zellkultur- und Reaktionsgefäße

Gefäß	Firma
Eppendorfgefäß 1,5ml	Eppendorf
Eppendorfgefäß 2,0ml	Eppendorf
BRAND plates 96 Well	BRAND
CELLSTAR® Cell Culture 24 Well Plates	Greiner Bio One
Cryovial® Cryotubes	Simport
FACS Röhren 4ml	BD
Falcon-Gefäß 15ml	Greiner Bio One
Falcon-Gefäß 50ml	Greiner Bio One
TC-6- Well-Platten (Suspension)	Sarstedt
Corning® Tissue culture treated dish	Corning

Verwendete Geräte

Gerät	Firma
Bakterienschüttler	Heraeus Instruments
BIO-RAD Mini-Protean® Blotting System	BIO-RAD
CO ₂ -Inkubator CB210	Binder
Durchflusszytometer „FACS Canto II“	BD
Dynal®Magnet	Invitrogen
Fusion FX7 (Western Blot Entwickler)	PeqLab
Heizblock	PeqLab
Mikroliter Pipetten diverse Volumina	Eppendorf
Mikroskop „Primo Vert“	Zeiss
Mikrozentrifuge 5415R	Eppendorf
NanoDrop2000	Thermo Scientific
Neubauer-Zählkammer	neoLab

Pipetus® Pipettierhilfe	Hirschmann Laborgeräte
Plattenphotometer „Sunrise“	Tecan
Schüttelgerät	CAT
Zellkulturbank	VWR
Zentrifuge „Multifuge 3SR+“	Thermo Scientific

Sonstige Materialien

Material	Firma
CELLSTAR® Serologische Pipetten 10ml	Greiner Bio One
CELLSTAR® Serologische Pipetten 25ml	Greiner Bio One
CellTiter96®AQueous One Solution Proliferation Assay (MTS)	Promega
epT.I.P.S. Standard Pipettenspitzen 0,5µl-20µl; 20µl-200µl; 50µl-1000µl	Eppendorf
I-MAG Streptavidin Particles Plus	BD
Nitrozellulose Membran: Amershan Protran	GE- Healthcare
QIAprep Spin Miniprep Kit	QIAGEN
Serologische Pipetten	Sarstedt
Vacutainer®K2E (EDTA) Blutentnahmeröhrchen	BD
Vacutainer® Safety-Lok Blutentnahme Set	BD
Vacutainer®-Halter	BD
Whatman® gel blotting paper	Sigma-Aldrich

Verwendete primäre und sekundäre Antikörper

Antikörper (Klon)	Firma
anti-human ABCB1 (E1Y7B) rabbit mAb	Cell Signaling Technology
anti-human ABCB1 (UIC2) CD234 APC	BioLegend
anti-human ABCC1 (IU2H10) mouse mAb Alexa Flour 488	NOVUS Biologicals
anti-human ABCG2 (5D3) mouse PE	BioLegend
anti-human Anti-GAPDH 6C5 mouse mAb	Meridian Life Science
anti-human Biotin CD14 (HCD14)	BioLegend
anti-human Biotin CD19 (HIB19)	BioLegend
anti-human CD3 (SK7) mouse APC/Cy7	BioLegend
anti-human CD4 (OKT4) mouse Brilliant Violett 510	BioLegend
anti-human CD69 (FN50) mouse PE/Cy7	BioLegend

Software

Software	Anwendung	Firma
FACS DIVA Software	Mess-Management am "FACS Canto II"	BD
FlowJo Software	Analyse und Auswertung von FACS-Daten	Tree star
FUSION FX-7 Software	Entwicklung von Western Blot Membranen	PeqLab
GraphPad Prism 5	Statistische und graphische Auswertung der Daten	GraphPad Inc.
Microsoft Excel 2013	Datensammlung	Microsoft Office
Microsoft Word 2013	Verfassung der Promotionsarbeit	Microsoft Office
NanoDrop 2000 Software	Photometrische Bestimmung von DNA	Thermo Scientific
Tecan Magelan Software	Photometrische Bestimmung der Absorption im Rahmen des MTS Assay	Tecan

Standardlösung und Puffer

Additiva

1x PBS	100 ml
1x PBS mit β -Mercaptoethanol (175 μ l/ 500 ml PBS)	100 ml
Hepespuffer, 1 M, pH 7,2 steril	100 ml
Natriumpyruvat, 100 mM	100 ml
L-Glutamin, 200 mM	100 ml
Nichtessenzielle AS, 10-fach konzentriert	60 ml
Asparagin (10 mg/ml)	20 ml

Die Lösung wird angemischt und anschließend steril-filtriert.

10 X Western Blot Puffer

Tris	60,5 g
Glycin	288 g
SDS	20 g
H2O	Auffüllen auf 2000 ml

Lysepuffer 1 (Lyse von HEL Zellen)

Hepespuffer, 1 M, pH 7,4 steril	50 mM
Glycerol	10 %
NaCl	150 mM
TritonX100	1 %
MgCl ₂	1,5 mM
EGTA	5 mM
H ₂ O	Auffüllen auf 1000 ml

Lysepuffer 2 (Lyse von T-Zellen)

N-dodecyl β -maltoside	1%
IGEPAL CA-630	1%
Na ₃ VO ₄	1 mM
PMSF	1 mM
NaF	10 mM
EDTA	10 mM
Tris pH 7.5	50 mM
NaCl	150 mM

10X TBST Puffer

NaCl	150 mM
Tris	50 mM
Tween 20	0,05 %
H ₂ O	Auffüllen auf 500 ml

Transferpuffer

10 x Western Blot Puffer	100 ml
H ₂ O	700 m
Ethanol 96%	200 ml

SDS-Probenpuffer

Tris, pH 6,8	250 mM
Glycerol	50 %
SDS	10 %
β -Mercaptoethanol	25 %
Bromphenol Blau	1 Spatelspitze

Trenngelbuffer

Tris Base 1,5M	36,34g in 200ml H ₂ O, eingestellt auf pH 8,8
----------------	--

Sammelgelbuffer

Tris Base 1M	24,23g in 200ml H ₂ O, eingestellt auf pH 6,8
--------------	--

LB-Medium

Pepton	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	5 g
Agar	15 g
H ₂ O	Auffüllen auf 1000 ml

LB Agar-Platten (Die Lösung wird autoklaviert, 50mg/ml Ampicillin zugegeben und dann in sterile Petrischalen gegossen)

LB-Medium	500ml
Bacterio Agar	7,5 g

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

2.2.1.1 Isolation und Zellkultur humaner mononukleärer Zellen

Unter Mononuklearzellen versteht man im Falle eines gesunden Probanden Monozyten, NK-Zellen sowie B- und T-Lymphozyten. Diese werden mittels eines Dichtegradienten per Zentrifugation von den anderen Blutzellen getrennt. Hierbei werden die unterschiedlichen Sedimentationskonstanten der Blutzellen genutzt und durch ein Saccharosepolymer-Gemisch, dem Ficoll-Paque™ Plus (GE Healthcare, München) voneinander separiert. Das Saccharosepolymer-Gemisch hat eine Dichte von 1.077 g/ml.

Die Blutprobenentnahme erfolgte im informierten Einverständnis der Probanden und Patienten, gemäß der Deklaration von Helsinki, im Rahmen unserer von der lokalen Ethikkommission genehmigten Studie „Untersuchung onkogener Signaltransduktionswege bei der akuten myeloischen Leukämie (AML) und bei myeloproliferativen Syndromen (MPS)“ (Ethik Protokoll 15/08). Die Blutentnahmen und Aufklärungsgespräche fanden im Rahmen der Hämatologischen Spezialambulanz für Myeloproliferative Neoplasien am Uniklinikum Magdeburg zwischen September 2014 und Mai 2015 statt. Das Blut wurde mit dem BD Vacutainer® Blutentnahmesystem entnommen (Antikoagulation mit EDTA) und in ein 50ml Falcon- Gefäß überführt. Mit PBS/1%FBS wurde das Blut (1:1) verdünnt und damit 15ml vorgelegtes Ficoll-Paque™ PLUS in einem neuen 50ml Falcon-Gefäß langsam überschichtet. Danach erfolgte die Zentrifugation 25 Minuten bei 1400U/min und deaktivierter Bremse. Die über dem Ficoll separierten Mononuklearzellen wurden mit einer Pipette abgesaugt und in ein neues Gefäß überführt, zwei Mal mit PBS+1%FBS gewaschen und nach Erylyse in Zellkultur-Medium überführt.

2.2.1.2 „Lineage Depletion“ zur Isolation humaner T-Zellen

Für die Knockdown Experimente war es notwendig die T-Zellen gesunder Probanden aus PBMCs aufzureinigen. Dafür verwendeten wir die Methode der „lineage depletion“. Dabei werden T-Zellen negativ selektioniert, indem mit Biotin gekoppelte „Lineage“ Antikörper an nicht-T-Zellen hybridisiert werden, wodurch anschließend eine magnetische Separation stattfinden kann. Die so markierten Zellen können von einem speziellen Magneten (Dyna) an den Rand der Reagenzgläser gezogen werden, sodass sie von den übrigen, nicht magnetisch markierten Zellen der Lösung getrennt werden können.

Dafür wurden die PBMCs aus gesunden Probanden Proben in 500µl PBS/1%FBS resuspendiert und jeweils 1µl der Biotin gekoppelte Antikörper für CD19 und CD14 dazugegeben. Somit erfolgt eine Entfernung der Monozyten und B-Zellen. Eine Depletion

von Granulozyten ist dabei nicht notwendig, da diese bereits bei der Aufreinigung über Ficoll depletiert werden. Nach einer 45 minütigen Inkubationszeit bei 4°C auf dem Roller wurden die Zellen zwei Mal in 50ml PBS/1%FBS gewaschen, in 6ml PBS/1%FBS resuspendiert und auf Eis gestellt. Die magnetischen Streptavidin-Partikel werden in einem 15ml Falcon gewaschen und anschließend mit der Antikörper-beladenen Zellsuspension resuspendiert. Zur Hybridisierung der magnetischen Partikel mit den Zell-gebundenen Antikörpern wurde diese Lösung nochmals für 45 Minuten bei 4°C rollend inkubiert. Anschließend wurde das jeweilige Falcon in den Dynal Magneten gestellt und für sechs Minuten separiert. Zellen, die der Magnet nicht an die Wand des Falcons gezogen hat, werden vorsichtig mit einer Pipette entfernt und in ein neues 15ml Falcon überführt. Dieser Separationsvorgang wird vier Mal wiederholt um die magnetischen Partikel mit den Monozyten und B-Zellen komplett aus der Suspension zu entfernen. Anschließend wird die Lösung zentrifugiert, zwei Mal gewaschen und in Zellkulturmedium resuspendiert. Die nun vorliegenden T-Zellen (Reinheit >90%) können nun für weitere Experimente verwendet werden.

2.2.1.3 Zellkulturbedingungen für Zelllinien und primäre T-Zellen

Bei den von uns verwendeten primären Zellen handelt es sich zum einen um Mononuklearzellen und separierte T-Lymphozyten. Diese wurden in Gibco® RPMI1640-Medium versetzt mit 10% fetalem Kälberserum (FCS), 5ml Penicillin-Streptomycin-Mix (Endkonzentration jeweils 50µg/ml) im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Bei unseren verwendeten Zelllinien handelt es sich um HEL-Zellen (humane Erythroleukämie) und HEK-293T Zellen. Die HEL-Zellen wurden kultiviert in Gibco® RPMI1640-Medium versetzt mit 29ml Additiva, 10% fetalem Kälberserum (FCS), 5ml Penicillin-Streptomycin-Mix (Endkonzentration jeweils 50µg/ml) sowie 100µl Plasmocin™ Prophylactic (2,5mg/ml) im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂. Die HEK-293T-Zellen wurden in Gibco® DMEM-Medium versetzt mit 29ml Additiva, 10% FBS, 5ml Penicillin-Streptomycin-Mix, 5ml Gibco® L-Glutamin, 500µl 1M NaOH, 5ml 1M Hespuffer sowie 100µl Plasmocin™ Prophylactic (2,5mg/ml) kultiviert und bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

2.2.1.4 Kryokonservierung von Zellen

Für die dauerhafte Aufbewahrung der Mononuklearzellen der gesunden Probanden wurden pro Proband je 5 Millionen Zellen pro Kryokontainer kryokonserviert. Dafür wurden die Zellen in 800µl PBS, 100µl FBS und 100µl DMSO aufgenommen und mit Hilfe des „Nalgene® Cell Freezing Containers“ eingefroren. Mithilfe von Isopropanol als Isolator

werden die Zellen so im -80°C Kühlschrank langsam über einen Zeitraum von 24 Stunden abgekühlt bevor sie im Flüssigstickstofftank bei -169°C eingelagert werden.

Zum Auftauen wurden die Zellen für fünf Minuten bei 37°C zügig aufgetaut, mit PBS gewaschen, um das zelltoxische DMSO zu entfernen, für 5 Minuten bei 1400U/min zentrifugiert und in Zellkulturmedium aufgenommen.

2.2.1.5 Ermittlung der Zellzahl

Für die Ermittlung der Zellzahl benutzten wir eine 0,0025mm² Neubauer Zählkammer. Dafür wurden 10µl der zu ermittelten Zellsuspension entnommen und mit 90µl Trypanblau-Lösung (0,4%) verdünnt. Davon wurden 10µl entnommen und auf die Neubauer-Zählkammer aufgebracht, sodass in den vier Großquadranten die lebenden Zellen unter dem Mikroskop ausgezählt werden konnten. Trypanblau besitzt die Eigenschaft, lebende Zellen von toten Zellen unterscheiden zu können, in dem es durch die erhöhte Zellmembran-Permeabilität toter Zellen diese anfärbt, während lebende Zellen frei vom blauen Farbstoff bleiben. Die gezählten Zellen können mittels folgender Formel in die Anzahl lebender Zellen /ml umgerechnet werden: Lebende Zellen/ml = Anzahl gezählter Zellen/Anzahl gezählter Quadranten x Verdünnungsfaktor x 10.000.

2.2.1.6 Transfektion von HEK-293T Zellen mit lentiviralen Partikeln

Die 293T-Zellen wurden aufgetaut und mit PBS+1%FBS gewaschen. Die Kultivierung erfolgte in Gibco® DMEM Medium (mit Zusätzen siehe „Kulturbedingungen“) auf Zellkultur-Petrischalen für adhärente Zellen (**Abbildung 1A**). Nach zwei Tagen wurde der Überstand der 293T-Zellen bei einer Bodenkonfluenz von 60-70% verworfen und mit 4ml Virusmedium ersetzt. Die für die Transfektion benötigten lentiviralen Plasmide werden als Suspension vorbereitet. Die Plasmid-Suspension enthält 3µg des shRNA codierenden Zielplasmids, sowie je 3µg der Packungsplasmide PSPAX.2 und PDM2.G. Die Plasmide wurden in einem Eppendorfgefäß in 900µl Opti-MEM® aufgenommen (**Abbildung 1B**). Anschließend erfolgte die Zugabe von 59µl FuGENE® HD Transfection Reagent (Hoffmann-La Roche, Basel, Schweiz) zur Plasmid Suspension. Bei FuGENE® handelt es sich um Substanz mit der Fähigkeit in wässriger Lösung Liposomen zu bilden und in diesen DNA einschließen. Diese Liposomen sind in der Lage Zellmembranen zu durchdringen und so molekularbiologische Werkzeuge in die Zellen zu transportieren. Die Mischung aus Plasmiden, Opti-MEM® und FuGENE® wird für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wird die Lösung vorsichtig unter langsamem Schwenken auf die HEK-293T Zellen getropft (**Abbildung 1B**).

24 Stunden nach Transfektion und Inkubation bei 37°C wurde der Überstand verworfen und mit 8ml neuem Gibco® DMEM Medium ersetzt. Nach weiteren 24 Stunden wurde der Lentivirus-Partikel beinhaltende Überstand mit einer 20ml Spritze abgezogen und durch einen Virusfilter mit einer Porengröße von 0,45µm gefiltert um den Virusüberstand von Zellfragmenten zu trennen (**Abbildung 1 C**). Die fertige Virussuspension wurde entweder eingefroren oder direkt zur Infektion der HEL und T-Zellen verwendet.

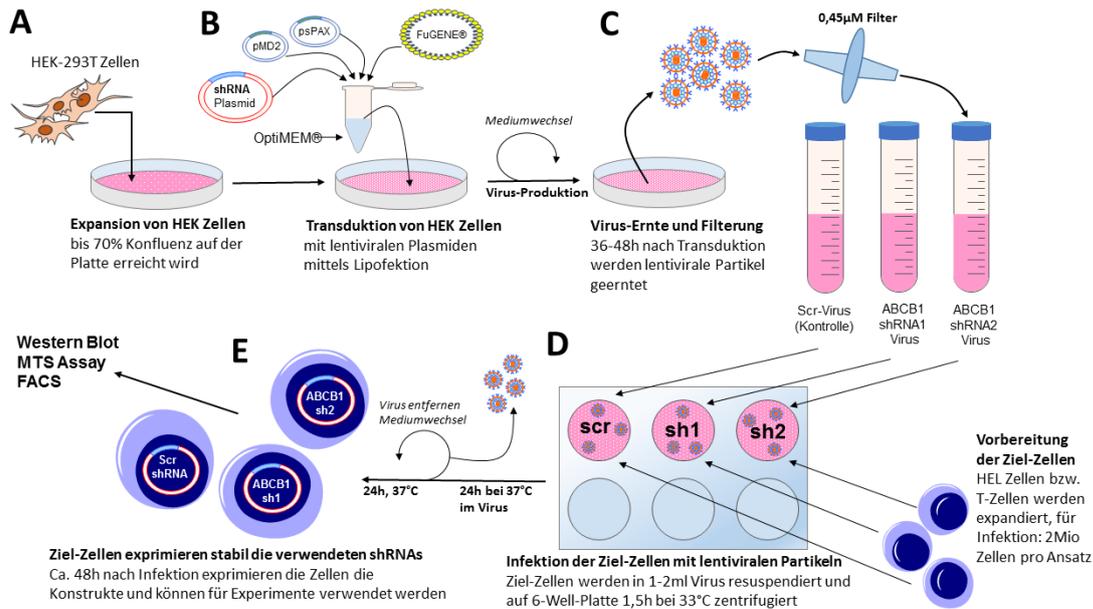


Abbildung 1: Herstellung lentiviraler Partikel und Infektion von Zielzellen

(A-C) Virusproduktion in HEK-293T Zellen. (E,D) Infektion von Zielzellen mit lentiviralen Partikeln.

2.2.1.7 Infektion von Zellen mit lentiviralen Partikeln zum Knockdown von ABCB1

Für die Infektion wurden je zwei Millionen HEL oder drei Millionen T-Zellen mit 1ml Virus-Überstand für 1,5 Stunden bei 2000U/min und 33°C zentrifugiert. Danach wurden die Zellen in eine 24-Well Platte überführt und für 18 Stunden bei 37°C inkubiert (**Abbildung 1D**). Danach wurden die Zellen in PBS/1%FBS gewaschen, bei 1400U/min fünf Minuten zentrifugiert und in 4ml RPMI Medium aufgenommen. Die anschließende Kultivierung erfolgte in 6-Well Platten. Zwei Tage nach der Infektion mit shRNA haltigen Viruspartikeln ist mit einem „Knockdown“ des Ziel-Gens zu rechnen und die Zellen können für Experimente verwendet werden (**Abbildung 1E**). Zur effektiven Infektion der humanen T-Zellen durch diese Methode, erfolgte im Voraus eine Vorstimulation mit 0,1% PHA.

2.2.2 Molekularbiologie

2.2.2.1 Transformation von E.coli und Plasmid Präparation

Für die Vervielfältigung der *ABCB1* shRNA Plasmide führten wir eine Re-transformation in eine E. coli Kultur mit anschließender Aufreinigung des Plasmids durch. Der „Top 10“ E.coli Stamm (chemisch kompetente Zellen) wurde aus -80°C aufgetaut und vorsichtig auf 1µl des jeweiligen Vektors in ein 1,5ml Eppendorfgefäß pipettiert und für 20 Minuten auf Eis inkubiert. Danach wurden die Bakterien für 30 Sekunden bei 42° C einem Hitzeschock ausgesetzt. Nach Zugabe von 300µl vorgewärmten S.O.C.-Medium wurden die Bakterien für eine Stunde bei 37°C schüttelnd inkubiert. Die Bakterien wurden nun auf die LB-Ampicillin Agar-Platte fraktioniert ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde jeweils eine Kolonie der Bakterien gepickt und in ein 15ml Falcon-Gefäß mit 5ml Flüssig LB-Medium und 5µl Ampicillin suspendiert und wieder bei 37°C über Nacht schüttelnd inkubiert. Für die Aufreinigung der Plasmide verwendeten wir das „QIAprep Spin Miniprep Kit“. Die Bakterien werden als erstes in 250µl P1 Puffer sorgfältig suspendiert. Mit dem P2 Puffer werden die Bakterien lysiert und anschließen der Essigsäure haltige N3 Puffer zum Ausfällen der Bakterien-DNA dazugegeben. Die Eppendorf Gefäße mit der denaturierten Bakterien-DNA wurden für zehn Minuten bei 13000U/min zentrifugiert. Der Überstand wird nun in die „QIAprep Spin“ Säulen überführt und in mehreren Schritten gewaschen. Dabei werden unterschiedliche Puffer nacheinander zugesetzt und die Lösung in den „QIAprep Spin“ Säulen zentrifugiert. Das Zentrifugat wird verworfen und neuer Puffer auf den Filter mit den enthaltenden Plasmiden pipettiert. Am Ende wird die Plasmid DNA in DNase/RNase freiem Wasser gelöst und noch einmal in einer neuen sauberen „QIAprep Spin“ Säule zentrifugiert. Jetzt enthält das Zentrifugat die gewünschte Plasmid DNA. Die DNA Konzentration und Reinheit wurde anschließend mittels Nano Drop 2000 gemessen.

2.2.3 Biochemische Analysen

2.2.3.1 Western Blot

Für die Bestimmung des *ABCB1* Proteinlevels nach Knockdown wurden die infizierten HEL und T-Zellen mit jeweils drei Millionen Zellen in gleichen Teilen für jeden Ansatz (scr-shRNA, *ABCB1*-shRNA1, *ABCB1*-shRNA2) aufgeteilt und drei Mal in PBS/1%FBS gewaschen. Der Überstand wurde abgesaugt die Zellen mit jeweils 120µl Lysepuffer 1 für HEL Zellen und 120µl Lysepuffer 2 für T-Zellen versetzt und in neue Eppendorf Gefäße überführt und 30 Minuten auf Eis lysiert. Daraufhin wurden die Zellen bei 13000U/min für 5 min zentrifugiert, der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt und das Pellet

verworfen. Nun sind die Zellen für die Durchführung des Western Blots bereit, können aber auch für die spätere Durchführung weggefroren werden. Für den Western Blot werden 30µl des Lysats mit 5ml SDS-Probenpuffer versetzt und für fünf Minuten im Hitzeblock aufgeköcht. Die Laufkammer mit dem Gel (8% Acrylamid) wird mit 1x Western Blot Puffer aufgefüllt und 90µl des Lysats in die Geltaschen pipettiert. Nach einer Laufzeit von 90 Minuten bei 100V wird die Laufkammer demontiert und das Gel in Transferpuffer eingeweicht und danach zusammen mit der Nitrocellulose Membran in das Western-Blotting Papier und dann in die Halterung für das Blot-Sandwich eingespannt und bei 100V für weitere 90 Minuten geblottet. Die Halterung wird demontiert, die Membran für zehn Minuten in 1x TBST Puffer gewaschen. Zum Blocken werden die Membranen mit 5% Milchpulver in 1x TBST Puffer für eine Stunde geschüttelt und danach wieder drei Mal in 1x TBST Puffer gewaschen. Die Membranen werden geschnitten und mit dem entsprechenden primären Antikörper versetzt. Die Lösung für die Primären Antikörper enthält 1x TBST Puffer und 5% BSA sowie den ABCB1-AK in einer Konzentration von 1/1000 sowie den GAPDH-AK in einer Konzentration von 1/3000. Bei 4°C werden die Membranen in dieser Lösung für 12-18 Stunden in einem 50ml Falcon Gefäß auf dem Roller inkubiert. Anschließend werden die Membranen wieder drei Mal für zehn Minuten in 1x TBST Puffer gewaschen und danach mit dem sekundären Antikörper versetzt. Für ABCB1 handelt es sich dabei um einen sekundären anti-rabbit AK während GAPDH ein anti-mouse AK ist. Beide werden in einer Konzentration von 1/2000 in 1x TBST Puffer und 5% Milchpulver gemischt. Die Membran wird in dieser Lösung für eine Stunde geschüttelt inkubiert und danach wieder drei Mal für zehn Minuten mit 1x TBST Puffer gewaschen. Nun wird nach Zugabe von Super Signal® Chemolumineszenz der Membranstreifen im Fusion Western Blot Entwickler fotografiert. Die Banden wurden densitometrisch mittels ImageJ analysiert.

2.2.3.2 Proliferationsmessung mittels MTS-Assay

Das „CellTiter96® AQueous One Solution Proliferation Assay“ ist eine kolorimetrische Methode zur Ermittlung der metabolischen Aktivität einer Zellsuspension, als Korrelat zur Zellzahl (und damit der Proliferation beim Ausbringen gleicher Zellzahlen zum Zeitpunkt 0). In stoffwechselaktiven Zellen spiegeln GAD(P)H-spezifische Oxydoreduktasen in einem bestimmten Maß die Vitalitäts- und Proliferationseigenschaften der Zellen wieder. Diese Enzyme reduzieren den MTS Farbstoff (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) in das unlösliche violette Formazan. Für unsere Versuche wurden die Zellen in Triplikaten mit verschiedenen Ruxolitinib Konzentrationen und

Lösungsmittelkontrolle (DMSO) auf einer 96 Well Platte behandelt. Dafür haben wir 30000 oder 50000 Zellen pro well aufgebracht. Diesen Versuch führten wir für die scr-shRNA, *ABCBI*-shRNA1 und *ABCBI*-shRNA2 auf einer Platte durch. Die Zellen wurden für drei Tage (HEL Zellen) bzw. für vier Tage (T-Zellen) bei 37°C inkubiert. Die MTS-Lösung wurde im Wasserbad aufgetaut und je 20µl/well auf die Platten aufgetragen. Nach weiteren drei Stunden wurde im „Tecan® Sunrise“ Plattenphotometer die Absorption jedes Wells bei 490nm gemessen. Von jedem Messwert wurde zur Korrektur der Wert der „Leer-Kontrolle“ (nur RPMI) abgezogen. Für die erhaltenen Werte bei der Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen Ruxolitinib wurde eine Ratio ($\text{Abs.}_{\text{RUX}} / \text{Abs.}_{\text{DMSO}}$) gebildet. Der so entstandene Faktor gibt die relative Proliferation unter der entsprechenden Ruxolitinib Dosis im Vergleich zur DMSO Kontrolle an.

2.2.4 Durchflusszytometrie

2.2.4.1 Allgemeines zur Methode

Unter dem Begriff Durchflusszytometrie versteht man ein Messverfahren, in dem Zellen zum einen über ihre Größe und Granularität, zum anderen über die Markierung mit einem Fluoreszenzfarbstoff gezählt und sortiert werden können. Dabei fließen die Zellen in einer Reihe mit hoher Geschwindigkeit an einer Spannungs/- bzw. Lichtquelle (Laser) vorbei. Hier geben die Zellen je nach ihrer Form, ihren Eigenschaften (z.B. Granularität) oder Fluoreszenz-Färbung ein bestimmtes Streulicht oder Fluoreszenzsignal ab, welches mithilfe eines Detektors gemessen wird. Man unterscheidet Vorwärtsstreulicht (FCS/ Forward Scatter) welches die Größe der Zelle angibt von Seitwärtsstreulicht (SSC/ Side Scatter) welches die Granularität der Zellen, die Menge der Vesikel und die Größe des Zellkerns widerspiegelt. Bei dem von uns verwendeten FACS Gerät handelt sich um das FACS Canto II (BD Biosciences, Franklin Lakes, New Jersey, USA) mit der „FACS DIVA™ Software“ (BD Biosciences, Franklin Lakes, New Jersey, USA) als Mess-Software. Bearbeitet wurden die Daten mittels FlowJo™ (Tree star, Ashland, Oregon, USA).

2.2.4.2 Messung der ABC-Transporter und CD69 Expression auf T-Zellen

Für die Messung der CD69 und ABC-Transporter Oberflächenexpression auf den T-Zellen gesunder Probanden wurden zwei Millionen Mononuklearzellen in 1ml Gibco® RPMI auf einer 24-Well Platte ausplattiert. Die Zellen jedes Probanden wurden entweder mit der Lösungsmittelkontrolle DMSO oder Ruxolitinib in einer Konzentration von 100nM behandelt. Die Zellen wurden für eine Stunde bei 37°C mit Ruxolitinib bzw. DMSO inkubiert und danach mit 5µl PHA stimuliert. Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden

wurden die Zellen mit Fluoreszenz-markierten Antikörpern für die ABC-Transporter ABCB1, ABCC1 und ABCG2 sowie für die Oberflächenmarker CD3 und CD4 gefärbt. Die Fraktion der CD3-positiven und CD4-negativen T-Zellen wurde als CD8- Zell-Fraktion definiert. Außerdem führten wir für jeden ABC-Transporter-Antikörper eine IgG-Kontrolle mit. Die PBMCs von Patienten unter Ruxolitinib Therapie wurden stimuliert (PHA-L, 5µg/ml) und unstimuliert (als Negativkontrolle) auf 6-Well Platten aufgebracht. Nach 24 Stunden wurden durchflusszytometrisch ABC-Transporter- und CD69-Expression auf T-Zellen der Patienten analog zu den gesunden Probanden bestimmt.

2.2.4.3 Messung der Proliferation mittels CFSE-Assay

Carboxyfluorescein-succinimidyl-ester (CFSE) ist ein zellpermeabler Fluoreszenzfarbstoff der kovalent an intrazellulärer Lysine bindet. CFSE bleibt durch die stabile chemische Bindung lange in der Zelle vorhanden und wird bei Zellteilung zu etwa gleichen Teilen an die Tochterzellen weitergegeben. Mit steigender Zellteilungszahl nimmt das Fluoreszenzsignal der einzelnen Zellen ab. Durch Messung der Fluoreszenzsignale mittels Durchflusszytometrie können so die Proliferationseigenschaften von Zellen ermittelt werden. Für unsere Versuche verwendeten wir das CellTrace™ CFSE Cell Proliferation Kit. Nach Isolation von Mononuklearzellen mittels FICOLL wurden die Zellen gezählt und je zwei Millionen Zellen in 15ml Falcon Gefäße überführt. Danach wurden die Zellen gewaschen, in 1ml PBS/1%FBS resuspendiert und mit CFSE zu einer Endkonzentration zu 5µM versetzt. Der Ansatz wurde 15 Minuten bei 37°C inkubiert, danach mit PBS/1%FBS 3x gewaschen und in Zellkulturmedium aufgenommen. Für jeden Probanden wurde ein Ansatz (1ml Volumen) mit der Lösungsmittelkontrolle DMSO, sowie Ruxolitinib in einer Konzentration von 100nM in einer 24 Well Platte angelegt. Die Zellen wurden mit 5µg/ml PHA und 100IE/ml IL2 stimuliert und für fünf Tage inkubiert. Die Proliferationsrate wurde daraufhin durchflusszytometrisch bestimmt. Das Messfenster setzten wir dabei auf die Gruppe der schnell proliferierenden Zellen, üblicherweise ~ 50% der am stärksten proliferierenden Zellen in der DMSO Kontrolle.

2.2.4.4 Messung von Apoptose bzw. Ausschluss toter Zellen

Zum Ausschluss toter Zellen bei unseren durchflusszytometrischen Messungen verwendeten wir den Fluoreszenzfarbstoff SYTOX® Blue „Dead Cell Stain“ (Invitrogen, Karlsruhe). Dieser Farbstoff färbt durch die erhöhte Membranpermeabilität toter Zellen Nukleinsäuren an, die in violetterem Licht bei 405 nm blau aufleuchten. So konnten wir durchflusszytometrisch den Anteil toter Zellen bestimmen. Zur Detektion früherer Stadien der Apoptose verwendeten wir AnnexinV V. Dieses markiert an der Zelloberfläche

exprimierte Phosphatidylserine und kann an einen Fluoreszenzfarbstoff gebunden in der Durchflusszytometrie erkannt werden.

2.2.4.5 ABC-Transporter Efflux Assay (Rhodamin123/Hoechst33324)

Zur funktionellen Bestimmung der Transportfunktion von ABCB1 und ABCG2 wurden die fluoreszierenden Substrate Rhodamin123 (ABCB1) und Hoechst33342 (ABCG2) verwendet. PBMCs aus dem peripheren Blut gesunder Probanden wurden nach Isolation für 18h mit PHA (0,5%) und IL2 (50U/ml) stimuliert. Anschließend wurden die Zellen für 1h bei 37°C mit den fluoreszierenden Substraten beladen (Rhodamin123: 200ng/ml, Hoechst33342: 5µg/ml). Zusätzlich erfolgte eine Co-Inkubation mit Ruxolitinib (50nM, 100nM, 500nM, 1µM), Verapamil (50µM als Positivkontrolle für ABCB1) und DMSO als Lösungsmittelkontrolle. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen dreimal mit PBS (+1%FBS) gewaschen und in neuem Zellkulturmedium resuspendiert. Wie initial werden wieder Ruxolitinib, Verapamil oder DMSO als Substrate/Inhibitoren bzw. Kontrollen hinzugefügt. Es erfolgte nun eine weitere Inkubation für 1h. In dieser Zeit werden die fluoreszierenden Substrate nun durch ABCB1 und ABCG2 aus den Zellen heraus transportiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit erfolgte eine Oberflächenfärbung zur Identifikation von CD4- und CD8- positiven T-Zellen (siehe 2.2.4.2) sowie die Messung im FACS zur Registrierung der MFI der beiden Farbstoffe in den Zellpopulationen. Dabei entspricht eine Zunahme der MFI im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle einer Retention von Farbstoff in den Zellen und somit einer eingeschränkten ABC-Transportfunktion.

2.2.5 **Software-Anwendungen und Statistik**

Die Auswertung der durchflusszytometrischen Daten erfolgte mittels Flowjo Software. Es wurde ein „Gating“ für CD69, sowie für CFSE durchgeführt, während für die ABC-Transporter mit der Mittleren-Fluoreszenz-Intensität (MFI) jedes Probanden gearbeitet wurde. Alle Daten wurden als Rohdaten mithilfe von Microsoft Exel (Version 2013) archiviert. Die grafische Verarbeitung sowie die statistischen Berechnungen wurden mit „GraphPad Prism“ (Version 5) durchgeführt. Die durchflusszytometrische Quantifizierung („Gating“) von CD69 bzw. CFSE wurde als nicht-parametrischer Datensatz mit dem „Wilcoxon-matched-pairs-test“ statistisch ausgewertet. Für die statistische Erfassung der Proliferation im MTS Assay, sowie der Änderung der ABCB1 Expression (MFI) auf T-Zellen unter Behandlung mit Inhibitoren wichtiger zellulärer Signalwege, wurde im Sinne einer Auswertung parametrischer Daten ein gepaarter t-Test verwendet. Zum Vergleich der ABC-Transporter MFI und CD69 Expression bzw. Proliferation wurde eine Korrelation nach Pearson berechnet.

3 Ergebnisse

3.1 Die Höhe der Expression von ABC-Transportern ist ein Marker für die Aktivierbarkeit von T-Zellen mit Ruxolitinib behandelter MPN Patienten.

Auf der Suche nach einem Mechanismus zur Erklärung der Heterogenität der Immunsuppression nach JAK-Inhibition haben wir Proben von MPN Patienten unter Ruxolitinib Therapie untersucht. Dafür haben wir aus frischem peripherem Blut von 15 Patienten Mononuklearzellen isoliert und für 24 Stunden mit dem Mitogen PHA (0,5%) stimuliert. Anschließend wurde durchflusszytometrisch die Oberflächen-Expression von ABCB1, ABCC1, ABCG2 sowie die Expression des Aktivierungsmarkers CD69 auf T-Zellen (CD3 positive Zellen) bestimmt (**Abbildung 2 A-F**). CD69 ist einer der am zeitigsten auf der Oberfläche von T-Lymphozyten und NK-Zellen exprimierten Glykoproteine im Rahmen der T-Zell-Aktivierung, zugehörig zur Superfamilie der C-Typ- Lectine (Ziegler et al. 1994). Als pleiotroper Immunregulator spielt CD69 eine wichtige Rolle für verschiedene Funktionen während der T-Zell-Aktivierung (Ziegler et al. 1994). Die genauen Mechanismen mit denen CD69 Einfluss auf wichtige Zellfunktionen nimmt, sind jedoch nur zum Teil bekannt. Besonders in der Durchflusszytometrie hat sich CD69 als Aktivierungsmarker mit Korrelation zur Proliferation nach TCR Stimulation etabliert (Simms und Ellis 1996). Für die Fähigkeit zur T-Zell Aktivierung unter Ruxolitinib Therapie zeigte sich, wie in den Vorarbeiten, eine große Heterogenität. Während die T-Zellen einiger Patienten eine hohe Induktion der CD69 Expression aufweisen, zeigte sich in den Proben anderer Patienten nur eine moderate bis sehr schwache CD69 Induzierbarkeit unter Ruxolitinib Therapie. Dabei schwankte die Anzahl der CD69 positiven Zellen 24 Stunden nach Stimulation zwischen ca. 10% - 60% aller T-Zellen. Die Stärke der Aktivierung steht dabei im Zusammenhang mit der Oberflächen-Expression der untersuchten ABC-Transporter (**Abbildung 3A-C**). Je höher die Expression der ABC-Transporter auf T-Zellen war, desto größer war das Potential zur CD69 Induktion nach Stimulation mit PHA. Interessanterweise fanden wir diese Korrelation bei allen der drei untersuchten ABC-Transporter. Aufgrund dieses Zusammenhangs vermuten wir, dass die untersuchten ABC-Transporter eine Rolle für den zellulären Export von Ruxolitinib spielen, ähnlich wie dies für andere TKI oder JAK-Inhibitoren beschrieben ist. Patienten mit niedriger ABC-Transporter Expression könnten damit anfälliger gegenüber den beschriebenen opportunistischen Infektionen unter Ruxolitinib Therapie sein.

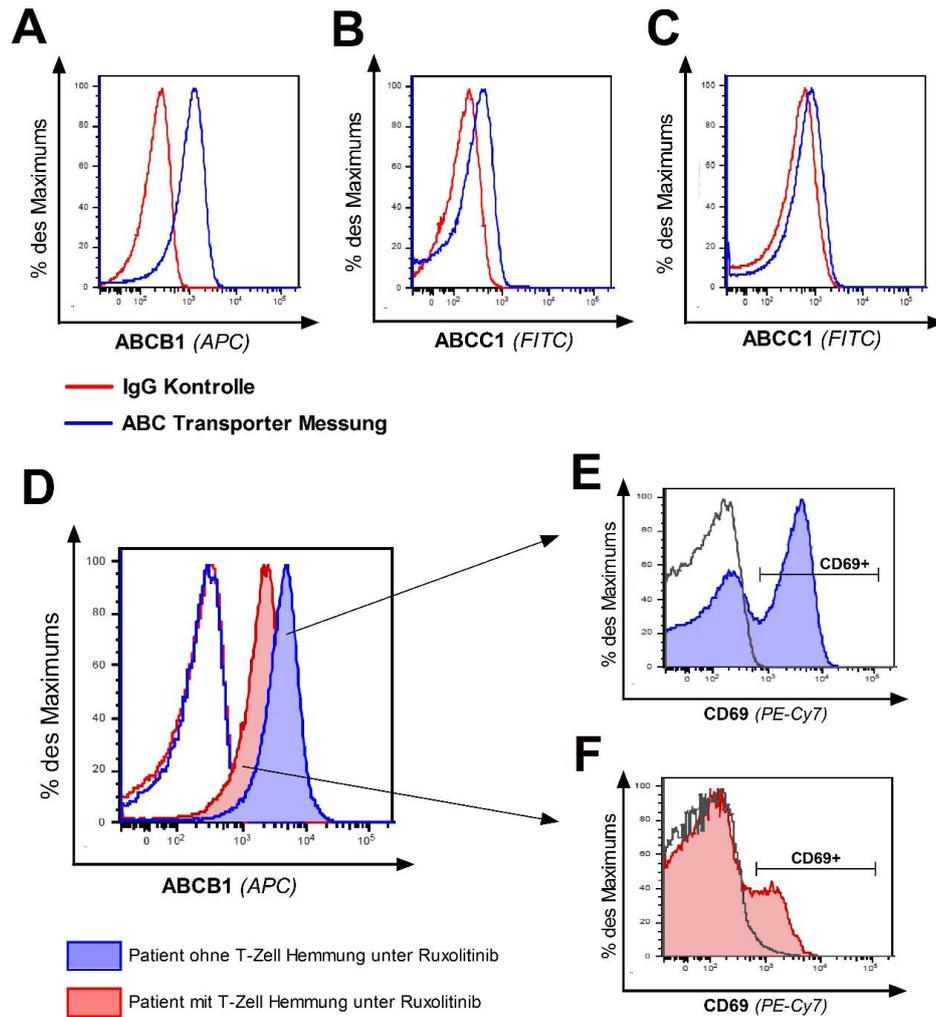


Abbildung 2: Durchflusszytometrische Messung der Expression von ABC-Transportern und CD69 auf der Zellmembran von T-Zellen Ruxolitinib behandelter Patienten.

(A,B,C) Histogramme der Fluoreszenzintensitäten der ABC-Transporter Messung (blau) und der zugehörigen IgG-Kontrolle (rot) für ABCB1 (A), ABCC1 (B), ABCG2 (C) auf T-Zellen 24h nach Aktivierung mit 5 µg/ml PHA beispielhaft in einem Patienten. (D) ABCB1 Expression von zwei exemplarischen Patienten im Vergleich. Es zeigt sich ein deutlicher Unterschied der ABCB1 Expression. (E) CD69, ein Aktivierungsmarker von T-Zellen, wurde zusätzlich in jedem Ansatz durchflusszytometrisch gemessen. In der Patientenprobe mit hoher ABCB1 Expression zeigt sich ein normaler Expressions-Anstieg von CD69 24h nach Aktivierung (>50% positive Zellen) im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle (graue Linie). (F) In der Probe mit niedriger ABCB1-Expression kommt es nach Aktivierung nur zu einer eingeschränkten CD69 Expressions-Steigerung im Sinne einer gehemmten T-Zell Antwort.

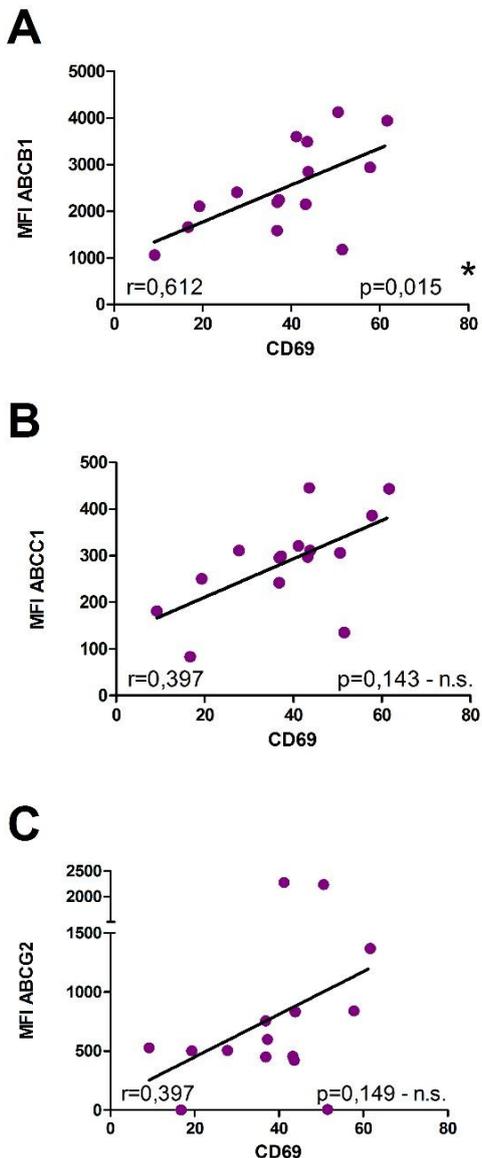


Abbildung 3: Zusammenhang zwischen T-Zell Aktivierbarkeit und ABC-Transporter Expression in Proben aus MPN-Patienten unter Ruxolitinib Therapie.

(A,B,C) Korrelation der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI = $MFI_{ABC} - MFI_{IgG}$) von ABCB1, ABCC1 und ABCG2 mit der CD69 Expression auf T-Zellen mit Ruxolitinib behandelter MPN-Patienten. (A) Für ABCB1 zeigt sich ein signifikanter Zusammenhang (Korrelation nach Pearson), während ABCC1 (B) und ABCG2 (C) dem gleichen Trend folgend jedoch nicht signifikant sind. Am Boden der Diagramme ist der Korrelationskoeffizient (r) und der jeweilige p -Wert dargestellt.

Uns interessierte außerdem, ob andere Faktoren wie zum Beispiel die Zusatzmedikation mit anderen Medikamenten mit potentielltem Einfluss auf Zellen des Immunsystems, wie Aspirin (ASS), Hydroxyurea (HU), Pomalidomid, Panobinostat, Sonidegib und Busulfan Einfluss auf die Aktivierbarkeit von T-Zellen haben. Durch die Korrelation unserer Ergebnisse mit den klinischen Hintergrund-Informationen der einzelnen Patienten konnten wir unsere Daten auf verschiedene Störfaktoren prüfen. Die eingenommene Ruxolitinib Dosis, der MPN-Subtyp, der Mutationsstatus, Alter und die Co-Medikation, hatte keinen signifikanten Einfluss auf die T-Zell Aktivierbarkeit im untersuchten Patientenmaterial (**Abbildung 4 A-J**). Interessanterweise sehen wir auch hier, dass nicht unterschiedliche Ruxolitinib Dosen (10mg-40mg / Tag) einen Einfluss auf die T-Zell Aktivierung haben, sondern dass dieser Effekt stark von der ABC-Transporter Expression der Patienten abzuhängen scheint.

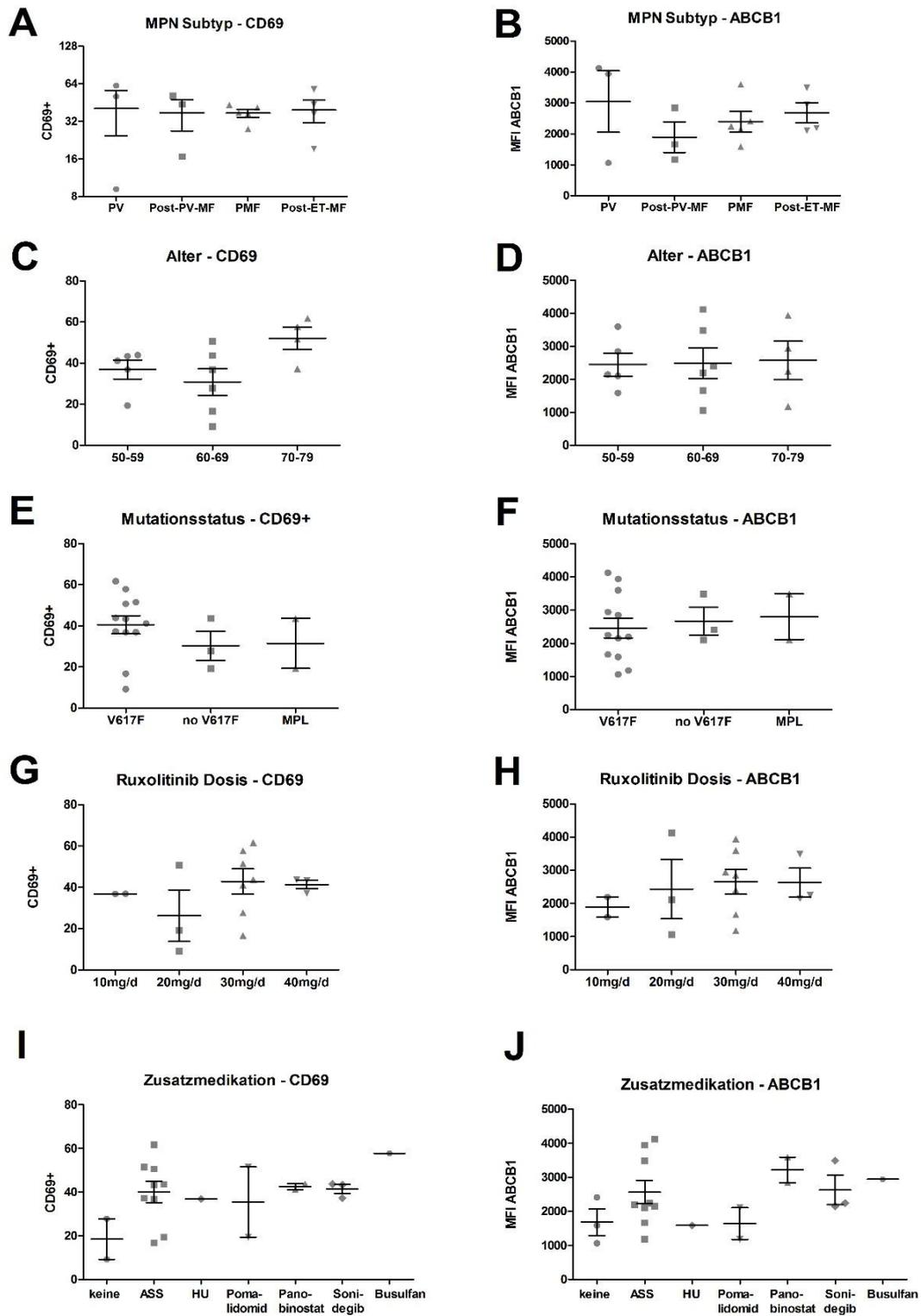


Abbildung 4: Variable klinische Einflussfaktoren haben keinen Einfluss auf die CD69 und ABCB1 Expression in T-Zellen mit Ruxolitinib behandelter MPN-Patienten.

(A-H) Die Patienten wurden für die Einflussfaktoren MPN-Subtyp, Alter, Mutationsstatus und Ruxolitinib Dosis pro Tag in einzelne Gruppen eingeteilt und die für die Patienten gemessenen CD69 (A,C,E,G) und ABCB1 (B,D,F,H) Expressionen miteinander verglichen. (A,B) Zwischen den einzelnen MPN-Subtypen sehen wir keine Unterschiede in Bezug auf die CD69 oder ABCB1 Oberflächenexpression. (C,D) Auch beim Alter sehen wir eine homogene Verteilung von CD69 und ABCB1 Expression zwischen den Altersgruppen. (E,F) Bezüglich des Mutationsstatus kann ebenfalls kein Unterschied ausgemacht werden. (G,H) Durch eine Dosissteigerung von Ruxolitinib wird keine Veränderung der T-Zell Aktivierung oder ABCB1-Expression erreicht. (I,J) Die Ko-Medikation mit anderen potentiell immunsuppressiven Substanzen hat in unseren Experimenten keinen Einfluss auf die CD69- und ABCB1-Expression

3.2 Die Expression von ABC-Transportern korreliert mit der Empfindlichkeit gegenüber Ruxolitinib in CD8-positiven T-Zellen gesunder Probanden.

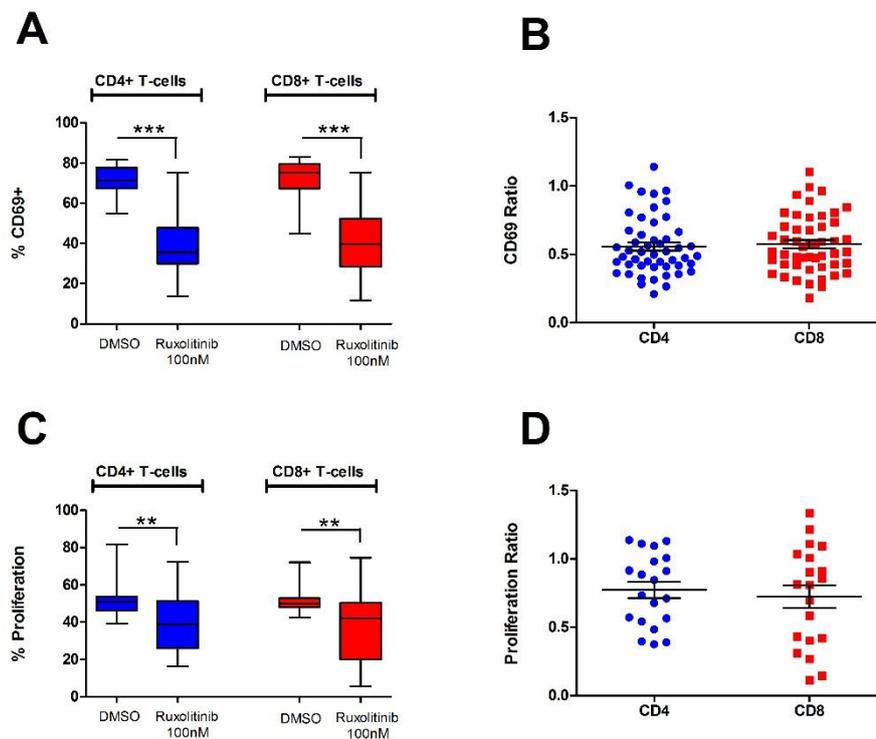


Abbildung 5: Ruxolitinib hemmt die Aktivierung und Proliferation in T-Zellen gesunder Spender

(A) Der prozentuale Anteil an CD69 positiven CD4- und CD8 -positiven T-Zellen gesunder Probanden nach Behandlung der Zellen mit 100nM Ruxolitinib im Vergleich zur Lösungsmittel-Kontrolle DMSO. Es zeigt sich eine deutlich erniedrigte CD69 Expression nach Ruxolitinib Behandlung. (B) Die relative CD69-Expression als Quotient aus der absoluten CD69 Expression nach Ruxolitinib Behandlung und der DMSO Kontrolle. (C) Anteil schnell proliferierender Zellen unter Behandlung mit Ruxolitinib oder der Lösungsmittelkontrolle DMSO. (D) Die relative Proliferation berechnet analog zu CD69. Nach Behandlung mit Ruxolitinib zeigt sich besonders hier eine deutliche Heterogenität.

Um den in den Patientenproben beobachteten Zusammenhang weiter zu untersuchen haben wir Mononuklearzellen (PBMCs) von 53 gesunden Probanden untersucht. Dafür isolierten wir die PBMCs mittels FICOLL aus dem Blut der gesunden Probanden und nahmen diese in Zellkultur-Medium auf. Anschließend haben wir jede Probe mit dem Lösungsmittel DMSO bzw. Ruxolitinib behandelt und mit PHA stimuliert. Nach 24 Stunden wurde durchflusszytometrisch in beiden Proben die CD69 Expression auf CD4- und CD8- positiven T-Zellen bestimmt. CD4-positive Zellen repräsentieren die T-Helferzellen, während CD8-Zellen zytotoxische T-Lymphozyten sind. In unseren Messungen zeigte sich sowohl in den CD4- als auch in der CD8-

positiven T-Zellen eine deutliche Reduktion der prozentualen Anzahl CD69 positiver Zellen durch Ruxolitinib (**Abbildung 5A,B**).

Die verwendete Ruxolitinib Dosis von 100nM entspricht einer in der Therapie von MPN Patienten relevanten Plasma Konzentration (Shilling et al. 2010). Besonders in den CD8-, in geringerem Ausmaß auch in den CD4- T-Zellen sehen wir eine große Spannweite in der

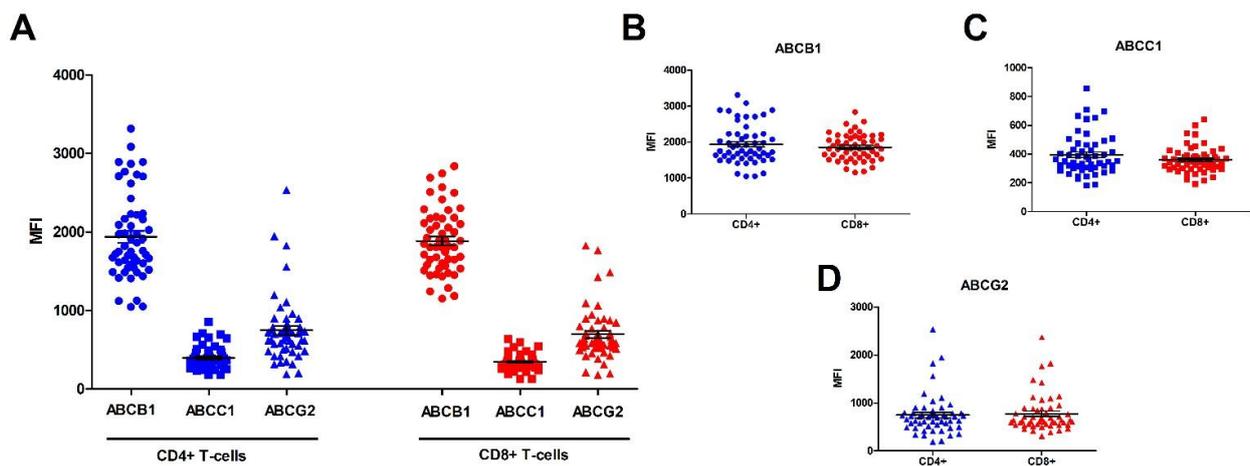


Abbildung 6: Durchflusszytometrische Bestimmung der ABC-Transporter Expression auf der Zellmembran von T-Zellen gesunder Probanden.

(A-D) Die Oberflächen Expression von ABCB1, ABCC1 und ABCG2 auf CD4- und CD8- positiven T-Zellen, als mittlere Fluoreszenzintensität ($MFI = MFI_{ABC} - MFI_{IgG}$). (A) Für ABCB1 zeigt sich die durchschnittlich höchste Oberflächenexpression im Vergleich zu ABCC1 und ABCG2. Im Vergleich zwischen CD4- und CD8- positiven T-Zellen ist kein maßgeblicher Unterschied in der Expression von ABCB1 (B), ABCC1 (C) und ABCG2 (D) erkennbar.

Reduktion der CD69 Induktion nach Ruxolitinib Behandlung. Diese Messwerte bestätigen die Beobachtungen unserer bisherigen Studien und zeigen wieder eine starke Heterogenität in einer größeren Kohorte gesunder Probanden. Um einen besseren Eindruck über die generelle Verteilung und Quantität von ABC-Transportern auf der Oberfläche von T-Zellen zu gewinnen untersuchten wir die Expression von ABCB1, ABCC1 und ABCG2 auf der Oberfläche von CD4- und CD8- positiven T-Zellen in allen 53 gesunden Probanden. Dabei stellte sich ABCB1 wie im Patientenmaterial als am stärksten exprimierter Transporter heraus (**Abbildung 6**). Diese Beobachtungen sind für CD4- und CD8- positive T-Zellen vergleichbar. In Hinblick auf unsere Beobachtungen aus den Patientenproben, interessierte uns, ob es auch in den gesunden Probanden einen Zusammenhang zwischen der Stärke der ABC-Transporter Expression und der Immunsuppression durch Ruxolitinib gibt.

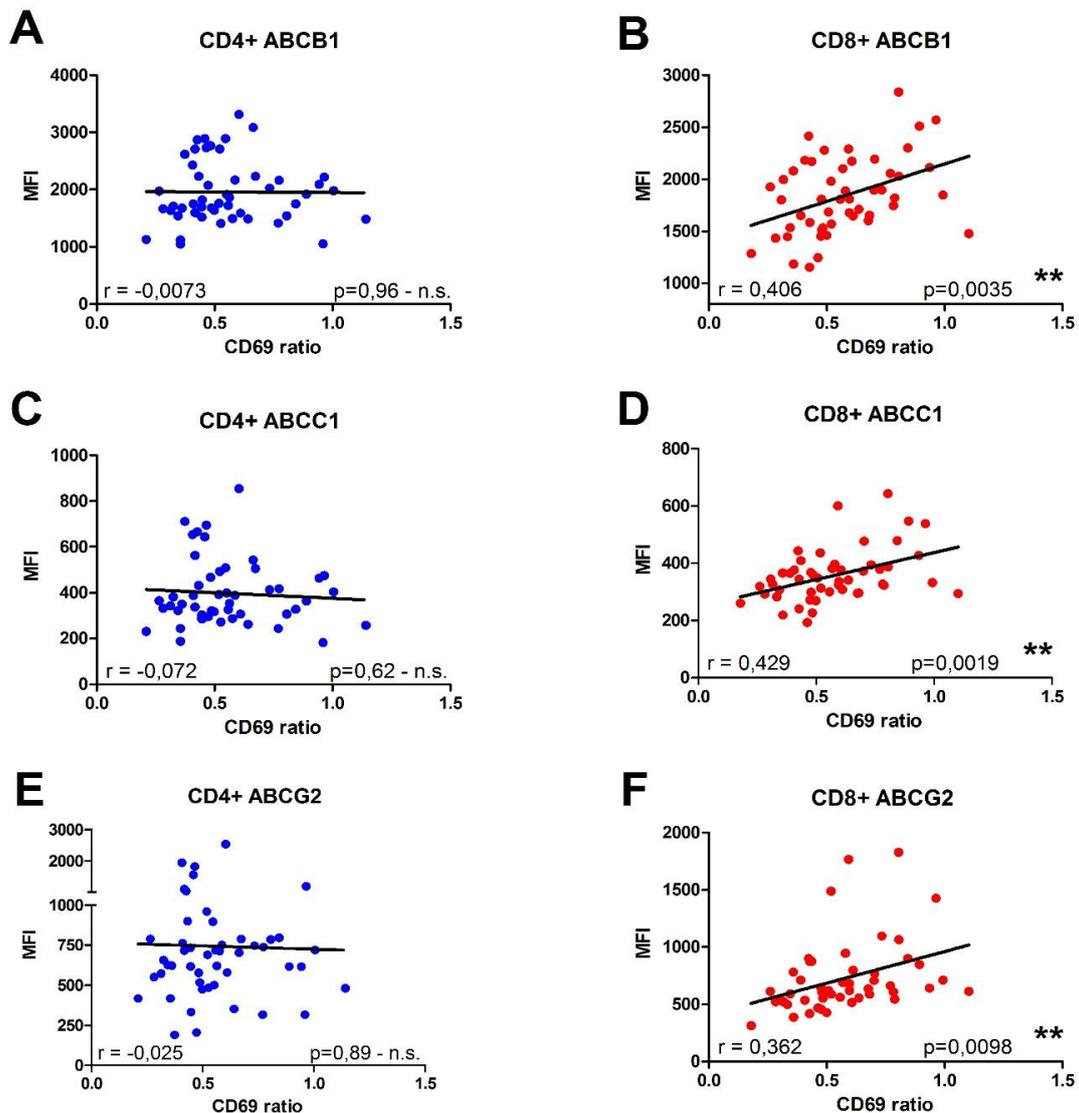


Abbildung 7: Korrelation der ABC-Transporter Oberflächenexpression mit der Reduktion der CD69 Induktion durch Behandlung mit Ruxolitinib in Proben gesunder Probanden.

Die mittlere Fluoreszenzintensität der ABC-Transporter ABCB1 (A,B), ABCC1 (C,D) und ABCG2 (E,F) auf der Oberfläche CD4- und CD8- positiver T-Zellen korreliert mit der relativen CD69 Expression nach in vitro Behandlung mit Ruxolitinib ($CD69_{ratio} = CD69_{RUX}/CD69_{DMSO}$). (B,D,F) Wir sehen einen signifikanten Zusammenhang in den CD8- positiven T-Zellen für alle drei untersuchten ABC-Transporter. (A,C,E) In den CD4- positiven T-Zellen zeigt sich dieser Zusammenhang nicht. Unten in jedem Bild angegeben sind der Korrelationskoeffizient (r) und der zugehörige p -Wert.

Dafür errechneten wir für jeden Probanden einen Faktor der die Reduktion der CD69 positiven Zellen unter Ruxolitinib Behandlung im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle angibt ($X = \text{CD69}^{\text{RUX}} / \text{CD69}^{\text{DMSO}}$) (**Abbildung 5B**). Diesen Faktor setzten wir in Korrelation mit der jeweiligen ABC-Transporter Expression des Probanden. Hier zeigte sich eine signifikante Korrelation zwischen der Oberflächen Expression von ABCB1, ABCC1 und ABCG2 mit der Reduktion von CD69 positiven Zellen unter Ruxolitinib Behandlung (**Abbildung 7A-F**). Allerdings ist dieser Zusammenhang nur in den CD8- positiven T-Zellen signifikant. Diese Daten lassen vermuten, dass die Menge an exprimierten ABC-Transportern auf T-Zellen eine Rolle dafür spielt, inwieweit die T-Zellen in ihrer Aktivierbarkeit durch Ruxolitinib gehemmt werden. Das könnte damit zusammenhängen, dass Ruxolitinib besser und schneller aus den Zellen nach extrazellulär transportiert wird und sich die intrazelluläre Wirkung auf die T-Zellen dadurch reduziert. Dies könnte auch erklären warum wir sowohl in Ruxolitinib behandelten Patienten, als auch in den gesunden Probanden eine starke Heterogenität in der Aktivierbarkeit der T-Zellen sehen. Patienten und Probanden mit einer hohen Oberflächen Expression von ABC-Transportern zeigen eine stärkere CD69 Induktion als Surrogat Marker für eine höhere T-Zell-Aktivität, als Patienten und Probanden die weniger ABC-Transporter auf ihren T-Zellen exprimieren.

Zur ersten Überprüfung der funktionellen Konsequenzen der beobachteten CD69 Hemmung haben wir mittels CFSE Assay die Proliferationsfähigkeit der T-Zellen fünf Tage nach Stimulation mit PHA durchflusszytometrisch bestimmt. Diesen Versuch führten wir mit Mononuklearzellen von 20 gesunden Probanden durch, wobei wir die Proliferation der T-Zellen unter Behandlung mit Ruxolitinib mit der Proliferation unter Behandlung mit dem Lösungsmittel DMSO verglichen. Dabei untersuchten wir die Menge der schnell proliferierenden T-Zellen (**Abbildung 5C**). Auch hier errechneten wir für jeden Probanden wieder einen Faktor für die Reduktion der T-Zell Proliferation (analog zu CD69) (**Abbildung 5D**) und setzten diesen in Bezug zu der jeweiligen ABC-Transporter Oberflächen- Expression von ABCB1, ABCC1 und ABCG2 auf CD4- und CD8- positiven T-Zellen. Ein Zusammenhang zwischen ABC-Transporter Oberflächen Expression und der Reduktion der schnell proliferierenden T-Zellen konnte mittels CFSE Assay bei 100nM Ruxolitinib weder in den CD8- noch in den CD4- positiven T-Zellen gezeigt werden (**Abbildung 8 A-F**).

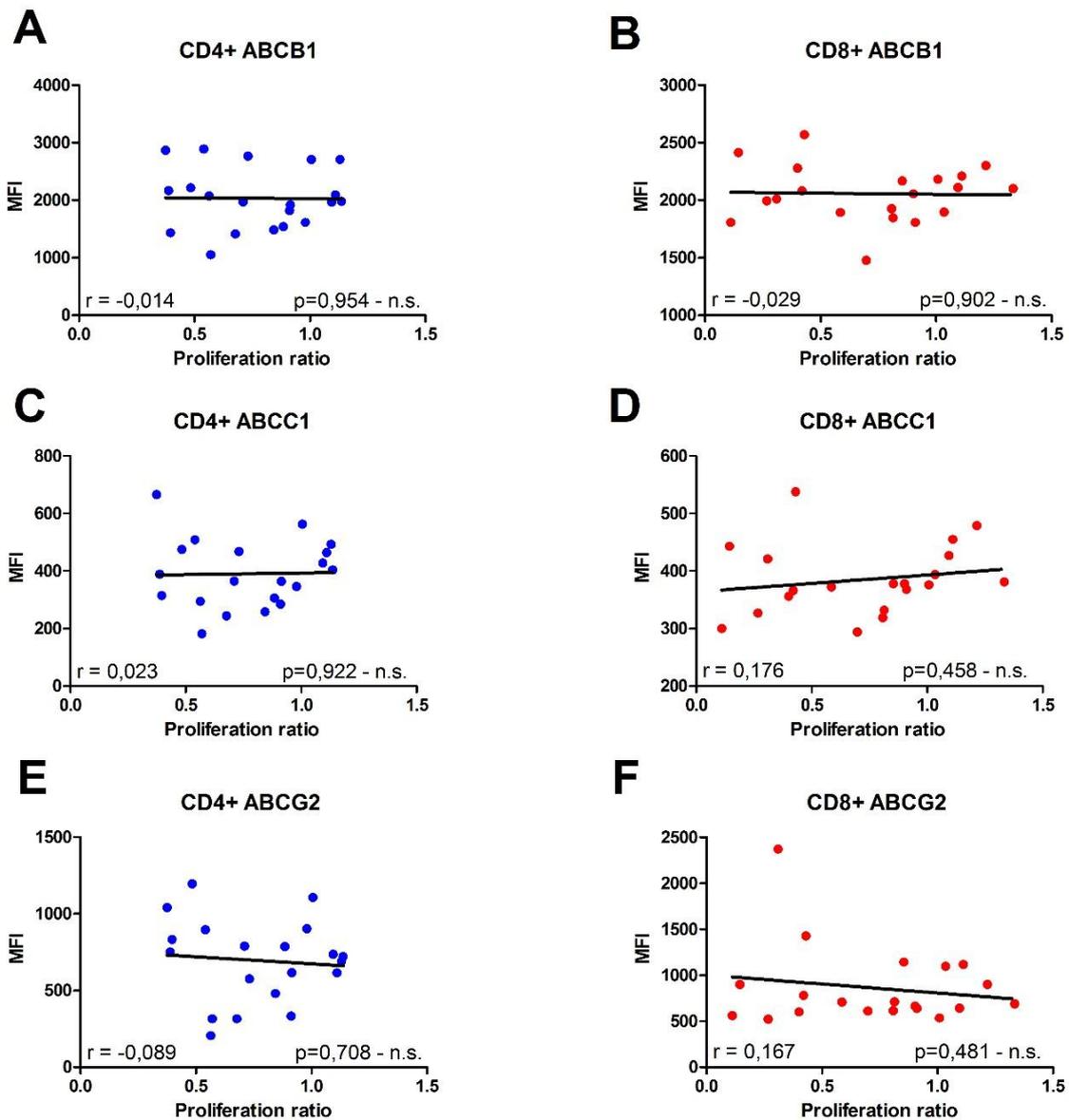


Abbildung 8: Korrelation der ABC-Transporter Oberflächenexpression mit der Proliferationsrate nach Behandlung mit Ruxolitinib in Proben gesunder Probanden.

Die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) der ABC-Transporter ABCB1 (A,B), ABCC1 (C,D) und ABCG2 (E,F) auf der Oberfläche CD4- und CD8- positiver T-Zellen korreliert mit der Proliferation nach Behandlung mit Ruxolitinib (Proliferation ratio = $\text{Proliferation}_{\text{RUX}}/\text{Proliferation}_{\text{DMSO}}$). Weder in den CD8- noch in den CD4- positiven T-Zellen ist ein Zusammenhang erkennbar. Unten in jedem Bild angegeben sind der Korrelationskoeffizient (r) und der zugehörige p-Wert.

3.3 Die Expression von ABCB1, ABCC1 und ABCG2 korrelieren auf humanen Zellen

Um eine Aussage über die Expression von ABCB1, ABCC1 und ABCG2 im Verhältnis zueinander zu treffen, haben wir die Ergebnisse der einzelnen ABC-Transporter Messungen der 53 gesunden Probanden intra-individuell verglichen. Dabei zeigt sich in CD4- und in CD8-positiven T-Zellen ein Zusammenhang der Oberflächen Expression von ABCB1 sowohl mit ABCC1 (**Abbildung 9A,B**) als auch mit ABCG2 (**Abbildung 9C,D**). Wir zeigen damit, dass es „ABC-high“ bzw. „ABC-weak“ exprimierende Probanden gibt. Aufgrund dieser Ergebnisse gehen wir davon aus, dass die Expression der untersuchten ABC-Transporter in T-Zellen möglicherweise durch die gleichen regulatorischen Signalwege gesteuert wird.

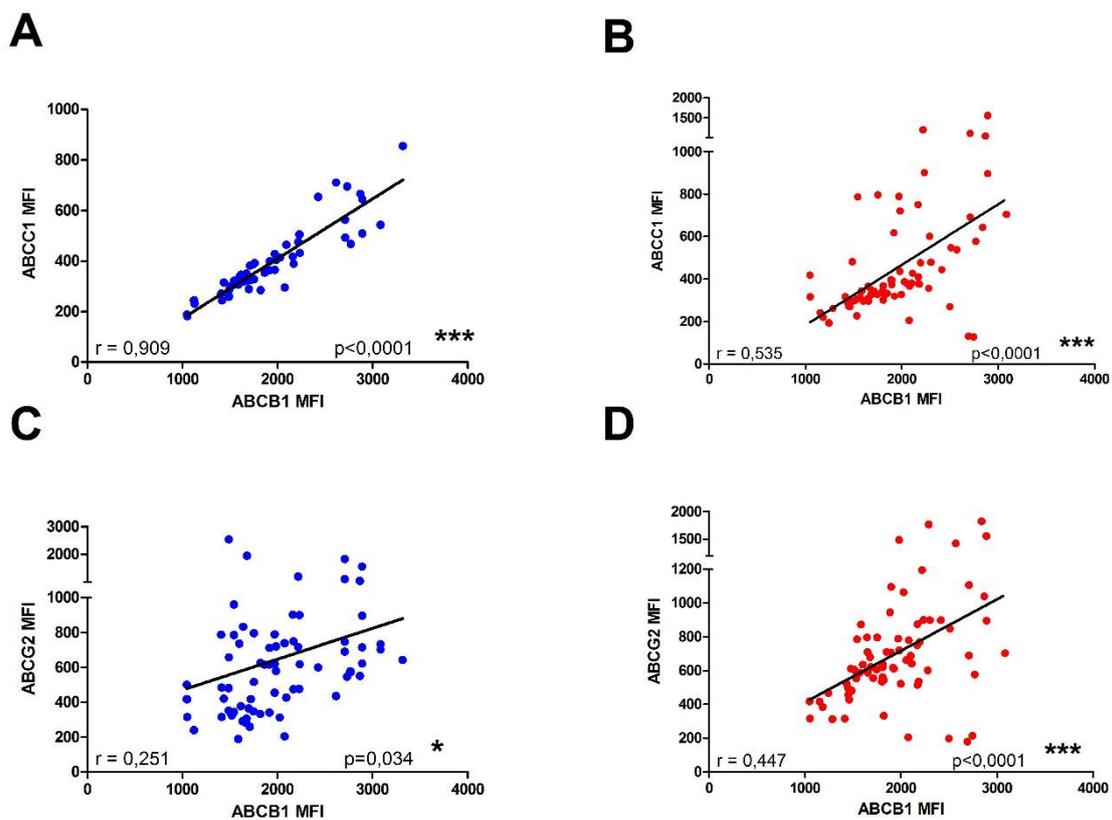


Abbildung 9: Korrelation der Oberflächenexpression von ABCB1 mit der Oberflächenexpression von ABCC1 und ABCG2 auf T-Zellen gesunder Probanden.

(A-D) Es wurden die mittleren Fluoreszenzintensitäten von ABCB1 mit denen von ABCC1 und ABCG2 auf der Oberfläche CD4- (A,C) und CD8- (B,D) positiver T-Zellen korreliert. Es zeigt sich sowohl zwischen ABCB1 und ABCC1 (A,B) als auch für ABCB1 und ABCG2 (C,D) ein Zusammenhang in CD4- und CD8- positiven T-Zellen. In jedem Bild finden sich unten der Korrelationskoeffizient (r) und der zugehörige p -Wert.

Unter Berücksichtigung unserer Beobachtung, dass ABCB1 der am stärksten exprimierte ABC-Transporter auf T-Zellen ist, haben wir uns entschieden in den folgenden Experimenten die Zusammenhänge fokussiert auf ABCB1 als Modell zu untersuchen.

3.4 Genetische Inaktivierung von *ABCB1* mittels RNAi in HEL Zellen

Zur Festigung unserer Hypothese, dass ABC-Transporter (insbesondere ABCB1) eine Rolle für die Wirksamkeit von Ruxolitinib in T-Zellen haben, rekapitulieren wir unsere Ansätze mittels genetische Inaktivierung von ABCB1. Dafür nutzten wir die Methode der RNA Interferenz (**Abbildung 1**). Wir verwendeten zwei verschiedene shRNAs (shRNA1 und shRNA2) zum spezifischen Knockdown von *ABCB1*. Diese wählten wir als die effektivsten Konstrukte aus einer Reihe von fünf verschiedenen shRNAs nach einer ersten Validierung in HEL Zellen aus. HEL Zellen sind eine humane erytroleukämische Zelllinie (AML M6) mit Expression einer JAK2V617F Mutation. Diese Zelllinie ist bekannt für eine hohe funktionelle ABC-Transporter Expression (Marks et al. 1996, Ishida et al. 1990, Ishida et al. 1989). Wir wählten diese Zelllinie als Modell um zunächst in einem stark JAK2-abhängigen System den Effekt des *ABCB1* Knockdown auf die Ruxolitinib Sensitivität zu überprüfen. Nach Infektion der HEL Zellen mit lentiviralen Partikeln, welche die verschiedenen *ABCB1*-shRNAs bzw. das Kontroll-Plasmid (scr-shRNA) enthalten, wurden diese in Zellkulturmedium für drei Tage kultiviert und mit Puromycin selektioniert. Um einen Effekt des Knockdown sichtbar zu machen und einen funktionellen Zusammenhang darstellen zu können titrierten wir Ruxolitinib in einer Konzentrationsreihe von 50nM, 100nM, 250nM, 500nM und 1µM für eine Behandlungszeit von 48 Stunden auf die infizierten HEL Zellen. Als Referenz verwendeten wir eine Kontrolle mit dem Lösungsmittel DMSO. Wir begannen mit einem Assay zur Apoptose-Messung nach Behandlung der HEL Zellen mit den unterschiedlichen Ruxolitinib Konzentrationen. Dafür verwendeten wir AnnexinV V/SYTOX® Blue Färbung, zur Detektion apoptotischer Zellen. Dabei markiert AnnexinV V Zellen, die Phosphatidylserine an ihrer Zelloberfläche exprimieren, was ein Zeichen für die beginnende Apoptose ist. Durch Bindung von AnnexinV V an einen Fluoreszenzfarbstoff können diese Zellen mittels Durchflusszytometrie sichtbar gemacht werden. Zusätzlich färbten wir mittels SYTOX® blue tote und nekrotische Zellen. SYTOX® blue hat die Eigenschaft Nukleinsäuren anzufärben, wobei es nur in die Zellen gelangt wenn die Zellmembran im Rahmen des Zelltodes permeabel wird. Mittels Durchflusszytometrie konnten wir so messen, wie viele Zellen nach Behandlung mit unterschiedlichen Dosen Ruxolitinib noch vital sind. Aus der Subtraktion dieser lebendigen Zellen von 100% ergibt sich der Anteil toter Zellen. Generell zeigen unsere Messungen, dass sowohl in der nicht zielgerichteten scr-shRNA als auch in *ABCB1*-shRNA1 und -shRNA2 eine

mit der Dosis von Ruxolitinib ansteigende Apoptose Rate auszumachen ist. In unseren Untersuchungen zeigte sich außerdem, dass in den Zellen die mit der scr-shRNA infiziert wurden die Apoptose Rate am niedrigsten war. In Bezug dazu zeigte sich nach Infektion mit *ABCB1*-shRNA1 und -shRNA2 eine erhöhte Apoptose-Rate bei allen verwendeten Konzentrationen (**Abbildung 10A**).

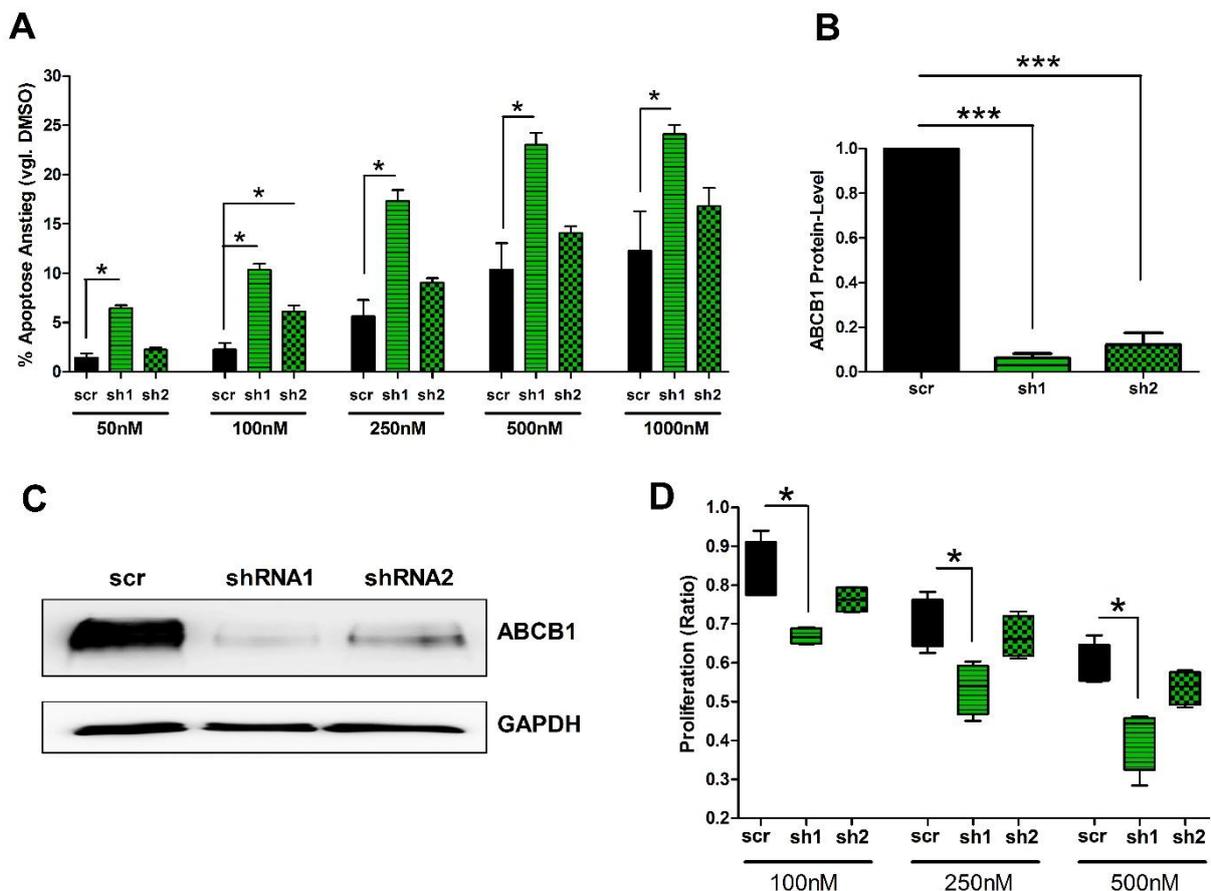


Abbildung 10: *ABCB1* Knockdown in HEL Zellen

(A) Durchflusszytometrisch bestimmte Apoptose-Rate in HEL Zellen nach Behandlung mit unterschiedlichen Ruxolitinib Konzentrationen. Wir sehen einen deutlichen Anstieg der Apoptose in den Zellen mit *ABCB1* Knockdown, wobei die *ABCB1*-shRNA1 eine signifikante Steigerung der Apoptose im Vergleich zur scr-shRNA aufweist. (B,C) Die Knockdown Effizienz im Western Blot und der entsprechenden densitometrischen Auswertung ist bei der *ABCB1*-shRNA1 dabei durchweg stärker als mit der *ABCB1*-shRNA2. (D) Auch in der mittels MTS-Assay gemessenen Proliferation unter Behandlung mit unterschiedlichen Dosen Ruxolitinib sehen wir in *ABCB1*-shRNA1 und *ABCB1*-shRNA2 eine deutlich erniedrigte Proliferation. Die Messwerte der *ABCB1*-shRNA1 sind dabei signifikant geringer als in der Kontrolle

Dabei war die Apoptose Rate der shRNA1 durchweg signifikant höher als die scr-shRNA während sich bei der shRNA2 nur bei 100nM Ruxolitinib eine signifikante Apoptose Steigerung in Bezug zur scr-shRNA fand. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass durch einen Knockdown von ABCB1, die Fähigkeit der HEL Zellen Ruxolitinib aus der Zelle zu schleusen und sich dadurch vor den toxischen Eigenschaften zu schützen reduziert wird. Deshalb reagieren diese Zellen mit höherer Apoptose. Der Unterschied in der Apoptose Rate der *ABCB1*-shRNA1 und shRNA2 infizierten HEL Zellen lässt sich auf eine unterschiedliche Knockdown Effizienz der shRNA Konstrukte in HEL Zellen zurückführen. Die *ABCB1*-shRNA1 zeigte in HEL Zellen stets den stärkeren Knockdown (>90%), während die *ABCB1*-shRNA2 lediglich eine Reduktion des ABCB1-Levels um ca. 80% erreicht (**Abbildung 10B,C**). Somit scheint für einen ausgeprägten Effekt ein nahezu kompletter Knockdown von *ABCB1* von Nöten zu sein.

Um eine weitere Aussage über die Auswirkungen des *ABCB1* Knockdown zu treffen führten wir ein MTS–Assay zur Messung der Proliferation der HEL Zellen durch. In diesem Experiment titrierten wir Ruxolitinib in Konzentrationen von 12,5nM -1µM in Triplikaten auf einer 96 Well Platte. Dabei verglichen wir wieder die scr-shRNA, *ABCB1*-shRNA1 und *ABCB1*-shRNA2. Von diesem Experiment erstellten wir vier unabhängige Replikate. Dabei inkubierten wir die Zellen nach Ruxolitinib-Behandlung für drei Tage bei 37°C. Danach bestimmten wir photometrisch die metabolische Aktivität, als Äquivalent zur Zellzahl, nach Zugabe des MTS Farbstoffes in jedes Well. Mittels Plattenphotometer wurde die Absorption bei 490nm gemessen. In unseren Untersuchungen zeigte sich, dass die Proliferation der HEL Zellen unter steigender Ruxolitinib Konzentration wie erwartet reduziert wird. Die mit *ABCB1*-shRNA1 infizierten HEL Zellen sind in ihrer Proliferationsfähigkeit am meisten gehemmt. Sie weisen eine signifikante Proliferationsreduktion in den Konzentrationen 100nM, 250nM und 500 nM gegenüber den scr-shRNA HEL Zellen auf (Abbildung 10 D). Auch die mit der *ABCB1*-shRNA2 infizierten HEL Zellen proliferieren langsamer als die scr-shRNA infizierten Zellen. Dieser Effekt ist jedoch nicht signifikant. Auch in diesem Experiment zeigt sich analog zur Apoptose, dass der stärkere ABCB1-Knockdown der shRNA1 den stärkeren und signifikanten Phänotyp in den HEL Zellen ergibt. Diese Untersuchungen untermauern unsere Hypothese, dass ABCB1 eine Schlüsselrolle in der Ausschleusung von Ruxolitinib aus Zellen spielt. Umso weniger ABCB1 von der Zelle gebildet und an der Zellmembran exprimiert wird, desto sensibler ist die Zelle auf die toxischen Eigenschaften von Ruxolitinib. Besonders in den mittleren Ruxolitinib Dosen (100-500nM), ergab sich nach *ABCB1* Knockdown eine deutliche Sensitivierung der Zellen gegenüber Ruxolitinib. In den HEL Zellen mit dem stärksten

Knockdown von *ABCBI* sehen wir, analog zu den Apoptose-Messungen, auch die größte Sensitivität auf Ruxolitinib. Bei einer Ruxolitinib Konzentration von 1µM lässt sich kein Unterschied zwischen den unterschiedlichen Konstrukten mehr ausmachen.

3.5 Einfluss des *ABCBI* Knockdown auf die Proliferation humaner T- Zellen

Neben dem Zelllinien-Model der HEL Zellen, wollten wir auch in humanen T-Zellen untersuchen, welche Auswirkungen der Knockdown von *ABCBI* auf die Proliferation der Zellen hat. Dafür separierten wir Blut von sechs gesunden Probanden mittels FICOLL in PBMCs und isolierten mittels Lineage-Cell-Depletion die T-Zellen. Die T-Zellen wurden mit 1µg/ml PHA für 18h bei 37°C vorstimuliert und danach mit den lentiviralen Partikeln, die entweder scr-shRNA, *ABCBI*-shRNA1 oder *ABCBI*-shRNA2 enthielten, infiziert. Die infizierten Zellen wurden wiederum 18 Stunden in Virus kultiviert. Danach wurde das Medium durch Zellkultur-Medium ersetzt und die T- Zellen für weitere 48 Stunden kultiviert (**Abbildung 1**). Nach diesen 48 Stunden wurden die Zellen gezählt und auf eine 96 Well Platte aufgebracht. Dabei haben wir bei den ersten beiden Probanden jeweils 20.000 Zellen pro Well aufgetragen, uns für die weiteren vier Probanden zur besseren Darstellung der Effekte für 50.000 Zellen pro Well entschieden. Die Zellen wurden in Triplikaten aufgetragen und mit Konzentration von 12,5nM- 1µM Ruxolitinib behandelt. Nach vier Tagen Inkubation wurde mittels MTS-Assay die Proliferationsrate, analog zu den HEL Zellen gemessen (**Abbildung 11 A**). Unsere Messungen zeigen, dass die Proliferationsrate durch einen Knockdown von *ABCBI* in den Konzentrationen 12,5nM, 25nM, 50nM und 100nM im Vergleich zu scr-shRNA reduziert wird. In den meisten Probanden Proben konnte im Gegensatz zu den HEL Zellen ein stärkerer Knockdown bei der *ABCBI*-shRNA2 erreicht werden (**Abbildung 11 B**). Unsere Ergebnisse zeigen, dass auch in humanen T-Zellen durch einen Knockdown von **ABCBI** die Sensitivität der Zellen gegenüber Ruxolitinib steigt und die Proliferation der Zellen stärker gehemmt wird. Ab einer Ruxolitinib Dosis über 100nM sehen wir keinen Unterschied zwischen den Zellen die mit scr-shRNA, *ABCBI*-shRNA1 oder *ABCBI*-shRNA2 infiziert wurden. Mit diesem Experiment haben wir auf genetischer Ebene modellhaft für ABCB1 gezeigt, dass neben der gefundenen Korrelation zwischen ABC-Transporter Expression und der Induzierbarkeit des Aktivierungsmarkers CD69, die T- Zell Proliferation als wichtiger funktioneller Parameter der T-Zell-Aktivierung mit der ABC-Transporter Expression korreliert ist.

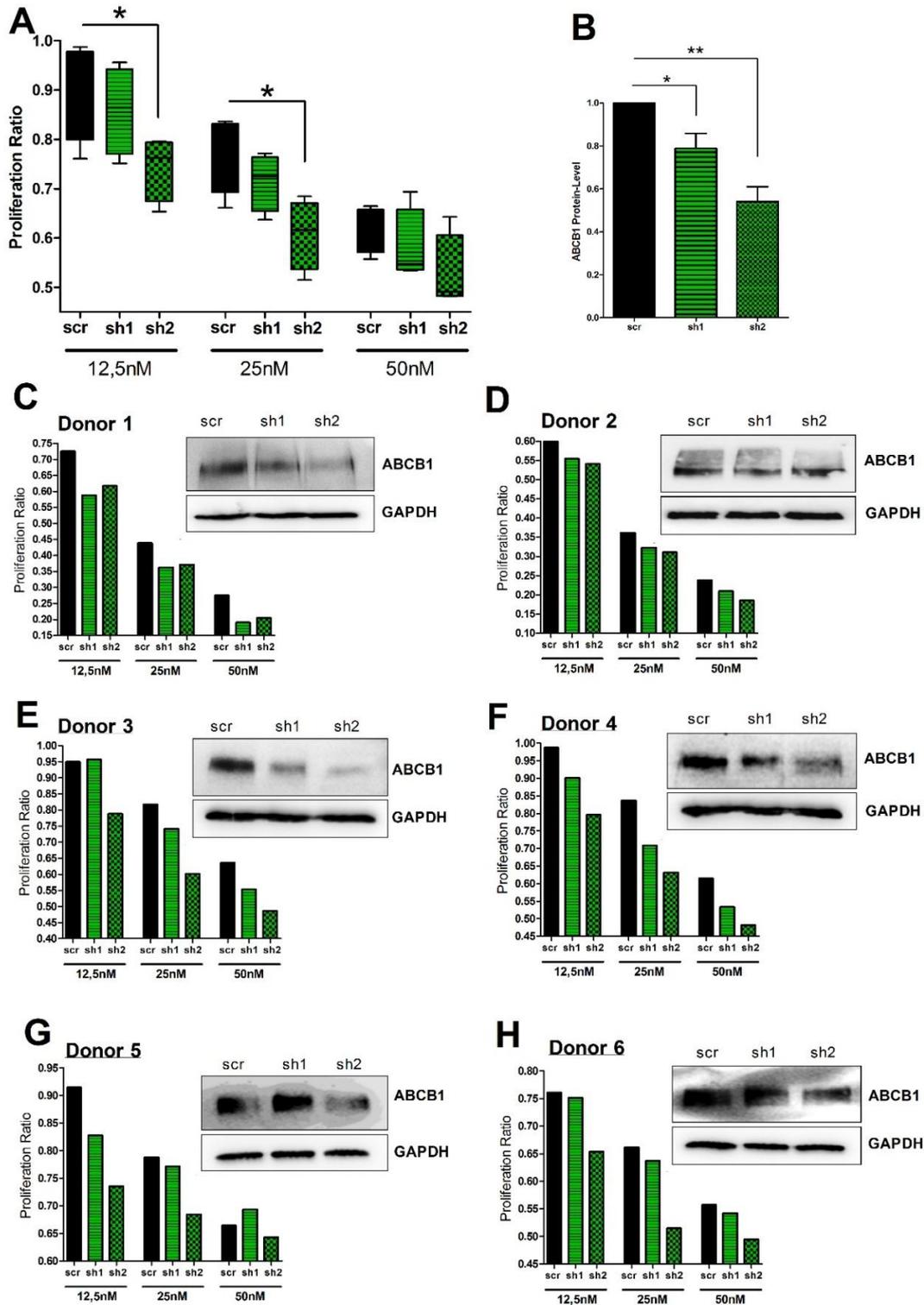


Abbildung 11: *ABCB1* Knockdown in T-Zellen gesunder Probanden.

(A) Proliferation von T-Zellen nach Knockdown von *ABCB1* gemessen mittels MTS-Assay in gesunden Probanden nach Behandlung mit unterschiedliche Konzentrationen Ruxolitinib. Wir sehen eine deutliche Verminderung der Proliferation in den Zellen mit *ABCB1* knockdown im Vergleich zur Kontrolle. (B) Bezogen auf die Knockdown-Effizienz zeigt die *ABCB1*-shRNA2 den stärkeren Phänotyp in der densitometrischen Auswertung der Western-Blot Kontrollen. (C-H) Die mittels MTS-Assay gemessene Proliferation sowie Western-Blot für *ABCB1* Knockdown in den einzelnen Probanden. Deutlich zeigt sich der Zusammenhang zwischen Knockdown-Effizienz und T-Zell Hemmung.

Das gleichzeitige Fehlen von zwei Transportproteinen z.B. von ABCB1 und ABCG2, könnte somit zu einem drastischeren Phänotyp als der alleinige Knockdown von ABCB1 führen.

3.6 Der Einfluss der JAK/STAT, PI3K/AKT und MEK/ERK Signaltransduktion auf die Oberflächenexpression von ABCB1 in T-Zellen

Zur Klärung der Frage inwieweit die JAK-Inhibition selbst die Expression von ABCB1 verändert bzw. welche anderen Signaltransduktionswege für die Expression wichtig sind, haben wir die Oberflächenexpression von ABCB1 nach Behandlung mit verschiedenen Kinase-Inhibitoren gemessen. Bei der Stimulation von T-Zellen mit PHA kommt es zu einer Aktivierung des T-Zell-Rezeptors (TCR), durch eine Quervernetzung mit CD2. Diese Form der TCR-Stimulation kommt bei der physiologischen Aktivierung von T-Zellen über CD3 und CD28 durch präsentierte Antigene nicht vor. Trotzdem werden die wichtigen Signalwege unterhalb des TCR auch nach unspezifischer PHA Stimulation aktiviert. Es kommt dabei zu einer Aktivierung des Ras/MEK/ERK und PI3K/Akt Signalwegs (**Abbildung 14**). Die JAKs spielen bei der Aktivierung von T-Zellen eine additive Rolle, indem sie modulatorische Signale über Zytokin- Rezeptoren vermitteln. Auch unterhalb der JAKs werden neben den STATs, Ras/MEK/Erk und PI3K/Akt aktiviert. In der Literatur ist ein Zusammenhang zwischen MAPK/ERK Signalweg und ABCB1 Expression beschrieben (Chen et al. 2015; Tomiyasu et al. 2013). Ebenfalls finden sich viele Hinweise für eine Beteiligung des PI3K/AKT Signalwegs an der Regulation der ABC-Transporter Expression (Yun et al. 2015; Hour et al. 2015; Xie et al. 2013). Darüber hinaus ist unterhalb der JAKs STAT3 dafür bekannt, die ABCB1 Expression zu beeinflussen (Bourguignon et al. 2008). Aufgrund dieser Daten vermuteten wir einen Einfluss der JAK/STAT, PI3K/AKT und MEK/ERK Signalwege auf die ABCB1 Oberflächenexpression in stimulierten humanen T-Zellen. Dafür haben wir PBMCs aus fünf gesunden Probanden isoliert und zunächst die basale ABCB1 Oberflächenexpression durchflusszytometrisch gemessen. Hier zeigte sich, dass ABCB1 auch auf unstimulierten T-Zellen exprimiert ist. Danach wurden die Zellen für 24 Stunden mit PHA bzw. PHA + IL2 stimuliert und mit Ruxolitinib, dem MEK1/2 -Inhibitor UO126 und dem PI3K-Inhibitor LY294002 behandelt. Nach diesen 24 Stunden wurde wieder die ABCB1 Expression gemessen. Wir verglichen die Messwerte unter Kinase-Inhibitor Behandlung mit einer DMSO Kontrolle und dem basalen Messwert. Durch Stimulation mit PHA bzw. PHA + IL2 steigt die ABCB1 Expression in T-Zellen im Vergleich zum basal Messwert an. Bei der Behandlung mit Ruxolitinib zeigte sich nach 24 Stunden eine signifikant erniedrigte ABCB1 Expression nach PHA+IL2 Stimulation im Vergleich zur DMSO Kontrolle (**Abbildung 12**). Bei ausschließlicher PHA Stimulation zeigt sich keine Signifikanz jedoch der gleiche Trend.

Diese Beobachtungen erklären sich über die Tatsache, dass die JAKs nicht im TCR Signalweg, wohl aber unterhalb des IL2 Rezeptors involviert sind. (**Abbildung 14**) Das unter alleiniger PHA Stimulation in einigen Zellen gesunder Probanden trotzdem ein Effekt zu sehen ist erklären wir damit, dass durch die Stimulation der Zelle mit PHA eine endogene Zytokin Produktion stattfindet, welche wiederum zur autokrinen Aktivierung von Janus-Kinasen führen kann. Wir benutzen IL2 als Modell für JAK vermittelte Zytokin Signaltransduktion unter der Vorstellung, dass es additive Effekte mit Zytokinen gibt. Die Ergebnisse nach Ruxolitinib Behandlung unterscheiden sich kaum zwischen

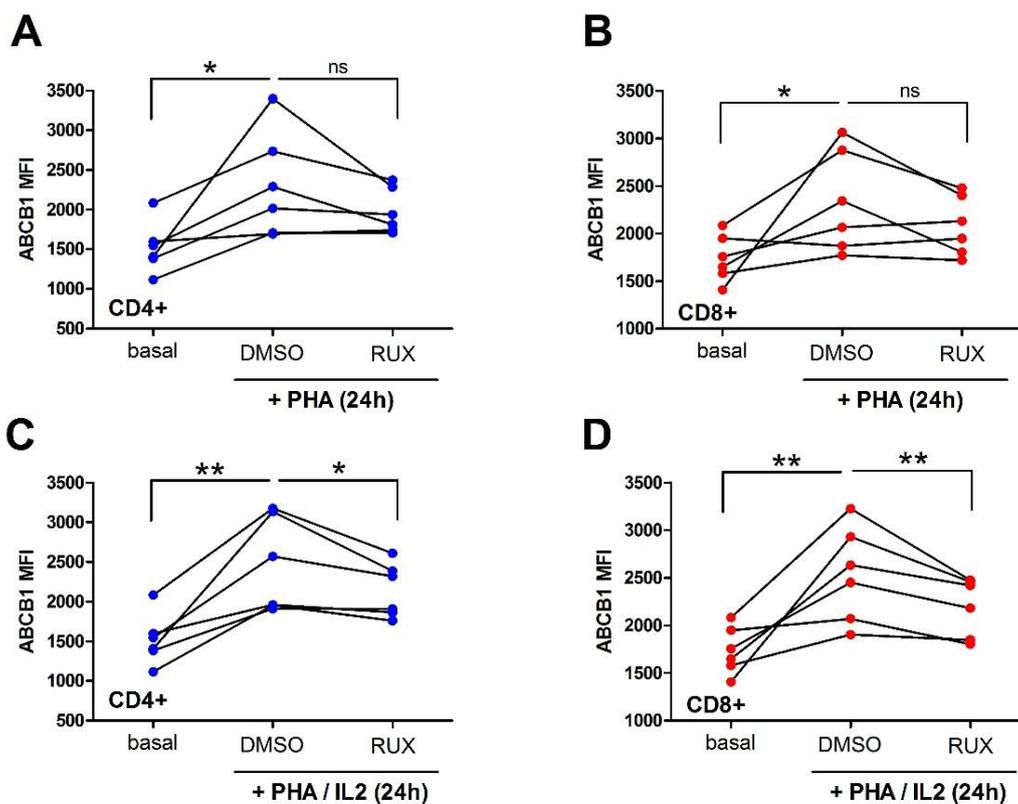


Abbildung 12: Einfluss des JAK/STAT Signalwegs auf die ABCB1 Expression

Es wurde die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) von ABCB1 auf CD4 (A,C) - und CD8 (B,D) -positiven T-Zellen direkt am Tag der Blutentnahme (basal), und 24 Stunden nach Stimulation mit PHA (A,B) und PHA+IL2 (C,D) gemessen. Dabei zeigt sich nach Stimulation mit PHA+IL2 eine signifikante Reduktion der ABCB1 Expression unter in vitro Behandlung mit Ruxolitinib im Vergleich zur DMSO Kontrolle (C,D), während in der ausschließlich mit PHA stimulierten Gruppe der gleiche Trend, jedoch keine Signifikanz gezeigt werden konnte (A,B). Außerdem sieht man in den Stimulierten T-Zellen eine Zunahme der Oberflächenexpression im Vergleich zu den basalen Messwerten vor Stimulation (A-D).

den CD4- und CD8- positiven T-Zellen. Die Behandlung durch den MEK1/2 Inhibitor UO126 und dem PI3K-Inhibitor LY294002 bewirkt eine im Vergleich zur DMSO Kontrolle

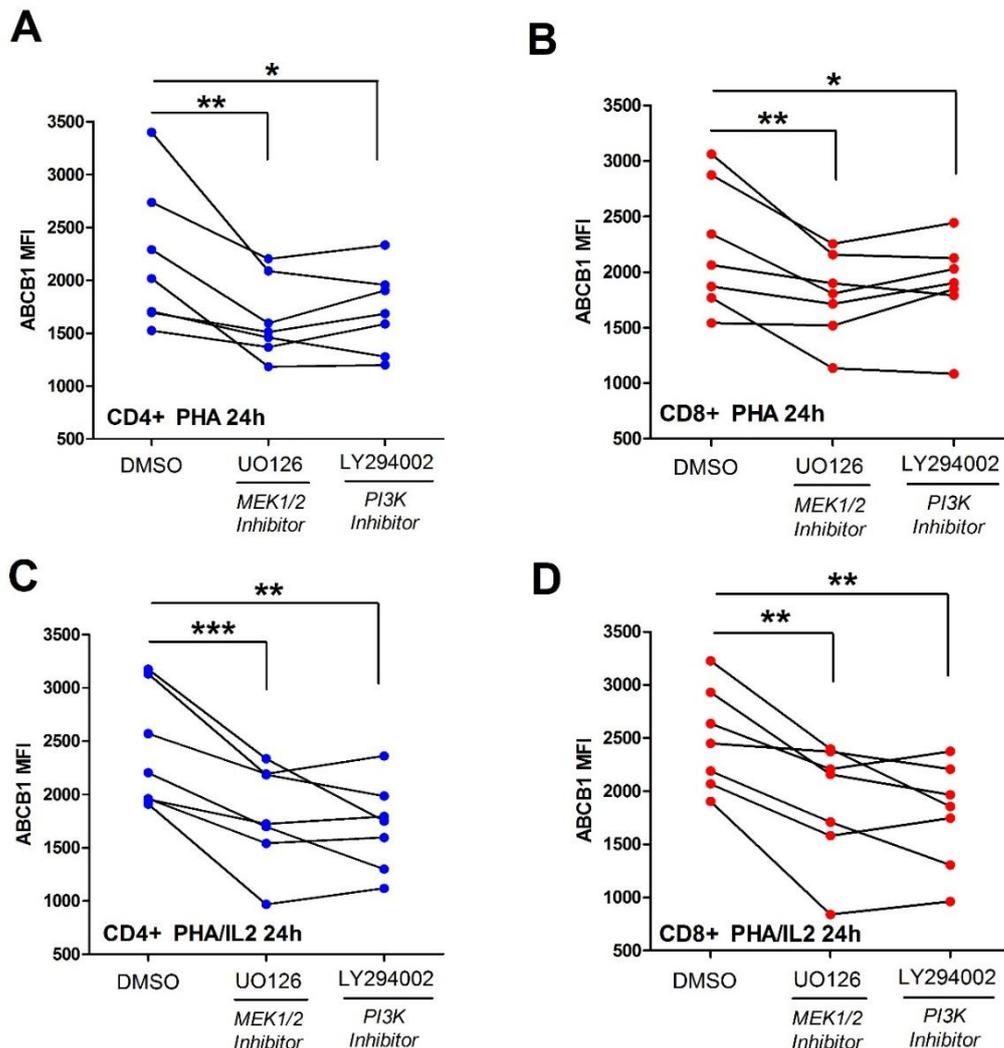


Abbildung 13: Einfluss des Ras/Mek/Erk und PI3K/Akt Signalweges auf die Expression von ABCB1.

Es wurde die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) von ABCB1 auf der Oberfläche von CD4 (A,C) - und CD8 (B,D) -positiven T-Zellen 24 Stunden nach Stimulation mit PHA (A,B) und PHA+IL2 (C,D) gemessen. Dabei zeigt sich nach Stimulation eine signifikante Reduktion der ABCB1 Expression unter Behandlung mit UO126 (MEK1/2 Inhibitor) und LY294002 (PI3K Inhibitor) im Vergleich zur DMSO Kontrolle in CD4- und CD8- positiven T-Zellen. (A-D). Unter der Inhibition mit UO126 zeigt sich dabei der stärkste Effekt.

deutlich stärkere Reduktion der ABCB1 Oberflächenexpression als die Behandlung mit Ruxolitinib. Diesen Effekt sehen wir sowohl in den CD4- als auch in den CD8- positiven T-Zellen (Abbildung 13). Generell sehen wir in den mit PHA +IL2 stimulierten Zellen eine noch deutlich ausgeprägtere Reduktion der ABCB1 Oberflächenexpression gegenüber der DMSO Kontrolle als in den lediglich mit PHA stimulierten Zellen. Dieser Effekt ist

möglicherweise durch die Kostimulation von ERK und AKT über die JAK Kinasen und die Synergie zwischen dem TCR und dem IL2-Rezeptor in Bezug auf die MEK/ERK und PI3K/AKT Signalwege zu erklären (**Abbildung 14**).

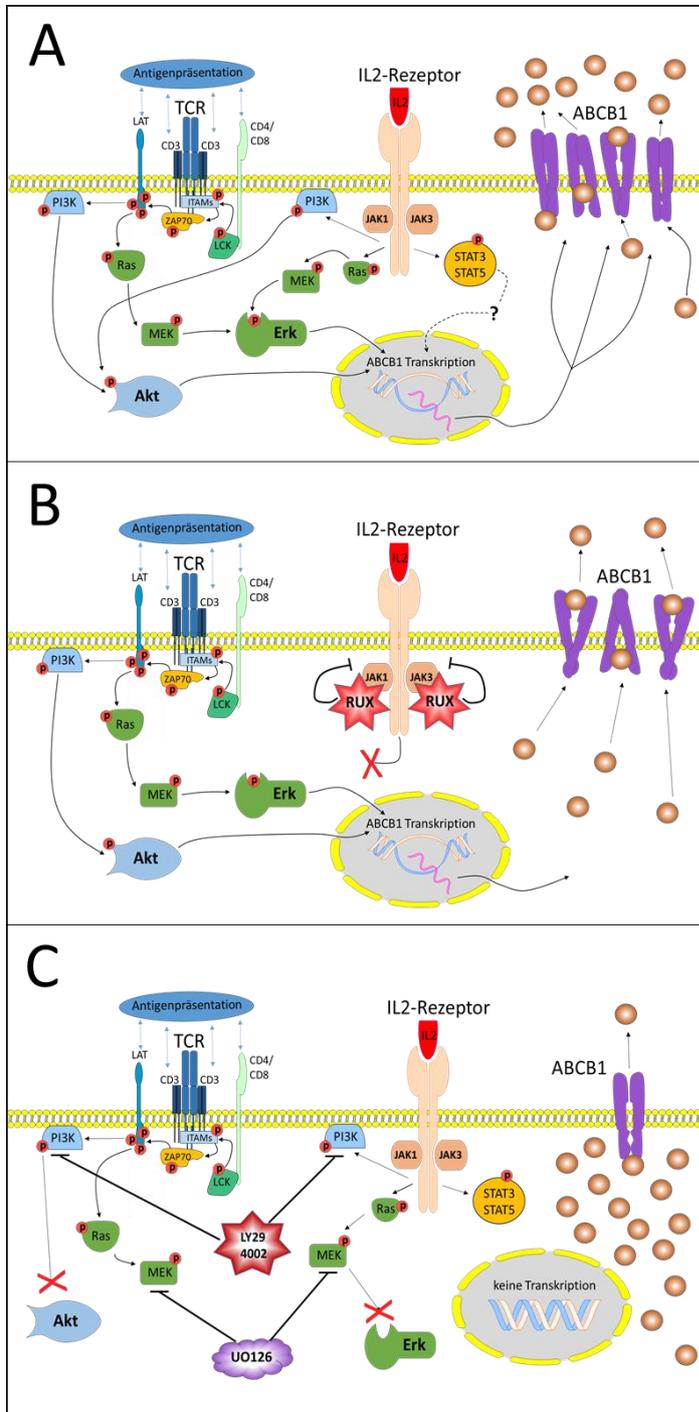


Abbildung 14: Modell der Funktion und Regulation von ABCB1 auf T-Zellen.

(A) Kooperation von TCR- und Zytokin-Signaltransduktion in der Regulation der ABCB1 Expression zum Export von Ruxolitinib oder anderer Substrate aus T-Zellen. (B) Einfluss von Ruxolitinib auf die Expression von ABCB1. Es kommt zum Wegfall der Zytokin-vermittelten Signale. (C) Eine Blockade des MEK/ERK bzw. PI3K/Akt Signalweges reduziert drastisch die Expression von ABCB1 auf T-Zellen.

Durch unsere Untersuchungen konnten wir zeigen, dass durch Stimulation von T-Zellen die ABCB1 Oberflächenexpression steigt (**Abbildung 12, Abbildung 14A**). Die Behandlung mit Ruxolitinib, führt zu einer Reduktion der ABCB1 Oberflächen Expression (**Abbildung 12, Abbildung 14 B**). Dies ist ein Hinweis darauf, dass Ruxolitinib selbst seine Wirkung in der Zelle verlängern könnte. Dies würde durch Inhibition der JAK1 und damit der Reduktion der ABCB1 Oberflächenexpression durch Hemmung zellulärer Signalwege möglich erscheinen. Konsistent mit publizierten Daten sind auch in unseren Untersuchungen mit humanen T-Zellen der PI3K/AKT und MEK/ERK Signalweg Regulatoren der ABCB1 Expression (**Abbildung 13, Abbildung 14C**).

3.7 Messung der Transportfunktion von ABCB1 und ABCG2 unter Ruxolitinib Behandlung

Um abschließend die Frage zu klären, inwieweit Ruxolitinib tatsächlich ein Substrat bzw. Inhibitor der untersuchten ABC-Transporter ist, haben wir ein Efflux-Assay mit fluoreszierenden ABC-Substraten durchgeführt. Hierfür verwendeten wir Rhodamin123 als Substrat für ABCB1 und Hoechst33342 als Substrat für ABCG2. Die Zellen wurden wie in 2.2.4.5 beschrieben mit den fluoreszierenden Substraten beladen und nach Inkubation mit Ruxolitinib, Verapamil (als Positivkontrolle) oder DMSO (Lösungsmittelkontrolle) durchflusszytometrisch gemessen. Es zeigte sich, dass Ruxolitinib in den von uns verwendeten Konzentrationen mit der biologischen Funktion von ABCB1 interagiert. Wir konnten sowohl in CD4- als auch in CD8- positiven T-Zellen zeigen, dass es durch Ruxolitinib Behandlung zu einer signifikanten Hemmung des Rhodamin123-Efflux über ABCB1 kommt (**Abbildung 15A**). Der Effekt von 100nM Ruxolitinib ist in unseren Experimenten vergleichbar mit dem von Verapamil, einem bekannten Substrat und kompetitiven Inhibitor von ABCB1. Im Gegensatz dazu konnten wir keinen Einfluss von Ruxolitinib auf die Transportfunktion von ABCG2 feststellen (**Abbildung 15B**). Diese Beobachtung legt nahe, dass anders als für Momelotinib beschrieben, im Falle von Ruxolitinib keine Synergie zwischen ABCB1 und ABCG2 besteht.

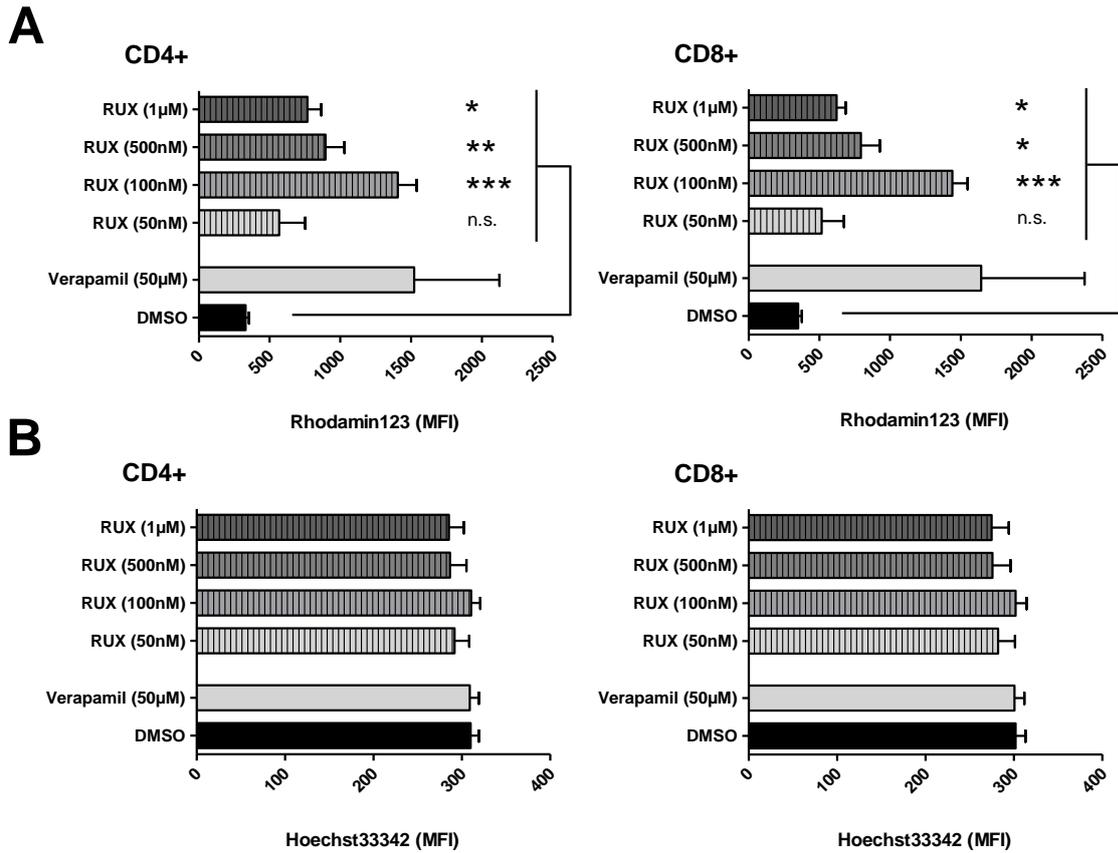


Abbildung 15: Ruxolitinib hemmt den Substrat-Efflux über ABCB1.

(A) MFI von Rhodamin123 in stimulierten PBMCs gesunder Probanden unter Behandlung mit Ruxolitinib, Verapamil oder DMSO zur Ermittlung der Pumpfunktion von ABCB1 in CD4- (links) und CD8- (rechts) positiven T-Zellen. (B) Experiment analog zu A, Darstellung der MFI von Hoechst33342 zur Detektion der Pumpfunktion von ABCG2.

4 Diskussion

Durch unsere Untersuchungen können wir einen Zusammenhang zwischen der ABCB1-, ABCC1- und ABCG2-Transporter Expression und der Aktivierbarkeit von T-Zellen, gemessen durch den Aktivierungsmarker CD69 unter Ruxolitinib Behandlung, zeigen. Je mehr ABC-Transporter auf der T-Zelle exprimiert sind, desto resistenter scheinen die T-Zellen gegenüber dem hemmenden Einfluss von Ruxolitinib zu sein. Diese Korrelation zeigt sich in CD3-positiven Zellen von mit Ruxolitinib behandelten Patienten und in CD8-positiven Zellen der gesunden Probanden als signifikant. Wir verwendeten CD69 als einen Globalmarker der T-Zell Aktivierung. Durch die Komplexität der Biologie aktivierter T-Zellen können wir durch die Messung dieses einzelnen Markers jedoch keine umfassende Aussage über Parameter der T-Zell-Funktion treffen. Beispielsweise könnten detaillierte Analysen von T-Zell Zytokin-Profilen oder Untersuchungen zur Differenzierung von T-Zellen im Zusammenhang mit der ABC-Transporter Expression näheren Aufschluss über den Einfluss auf den funktionellen Status der Zellen erbringen. Wir konnten aufgrund der geringen Anzahl untersuchter Patienten und der relativen Seltenheit infektiöser Nebenwirkungen in unserer Studie keinen Zusammenhang zwischen CD69 Expression und klinischer Symptomatik zeigen. Ob die Patienten z.B. bei niedriger CD69 Expression häufiger an Infektionen leiden, ist in weiteren klinischen Studien zu untersuchen. Möglicherweise gibt es für eine Korrelation mit klinischer Immunsuppression spezifischere Marker als CD69. Trotz aller Vorbehalte gehen wir davon aus, durch die Messung von CD69 modellhaft die T-Zell Aktivierung abbilden zu können.

Ein möglicher Störfaktor im Rahmen der ABC-Transporter Expressions-Messung könnte sich dadurch ergeben, dass wir lediglich die Expression der jeweiligen Transporter ABCB1, ABCC1 und ABCG2, jedoch nicht deren Funktionalität überprüft haben. Aus Studien in der Normalbevölkerung sind mehrere Polymorphismen der ABC-Transporter Gene bekannt, welche zu unterschiedlichen Phänotypen führen (Bruhn und Cascorbi 2014). In unseren Untersuchungen haben wir keine „Single Nucleotide Polymorphisms“ (SNPs) überprüft. Auch in diesem Fall könnten klinische Studien zu SNPs, z.B. im *ABCB1* Gen, im Zusammenhang mit der Infektanfälligkeit von MPN Patienten unter Ruxolitinib von Interesse für die Therapieoptimierung sein. Die von uns durchgeführte Efflux-Messung könnte sich an dieser Stelle als hilfreich erweisen, da sie sowohl die Expression als auch die Funktion der untersuchten ABC-Transporter abbildet.

Des Weiteren stellt sich die Frage, weshalb wir ausschließlich in den CD8-positiven T-Zellen einen signifikanten Zusammenhang von CD69 und ABC-Transporter Expression sehen, nicht jedoch in den CD4-positiven Zellen. Es ist bekannt, dass viele Erkrankungen, wie

beispielsweise die Alopecia areata oder Immunreaktionen wie die GvHD, in denen die Therapie mit Ruxolitinib einen positiven Effekt zeigt, maßgeblich durch CD8- positive T-Zellen vermittelt sind (Xing et al. 2014; Ju et al. 2014; Choi et al. 2014). Unsere Beobachtungen, die einen CD8 prädominanten Phänotyp belegen, sind mit dieser Verteilung konsistent.

Besonders in CD8- positiven T-Zellen scheint ein relativ enger Zusammenhang zwischen CD69 Expression und Stärke der T-Zell Aktivierung zu bestehen. Aufgrund der Tatsache, dass sowohl die Expression der ABC-Transporter als auch die Efflux-Hemmung von ABCB1 durch Ruxolitinib in unseren Experimenten auf CD4- und CD8- positiven T-Zellen vergleichbar waren, gehen wir davon aus, dass die prinzipiellen Mechanismen in beiden Zellpopulationen ähnlich sind. Aufgrund der Heterogenität der CD4- positiven Zellpopulation bildet CD69 hier möglicherweise die biologische Realität weniger gut ab als in den CD8 positiven T-Zellen.

Beispielsweise liegt ein direkter Einfluss von Ruxolitinib auf die Differenzierung der T-Helferzellen oder das Profil der sekretierten Zytokine nahe. Aus der Literatur ist bekannt, dass auch die Funktion und Differenzierung der CD4- positiven T-Zellen maßgeblich durch Ruxolitinib gehemmt wird (Heine et al. 2013a). Eine genaue Charakterisierung des Einflusses von ABC-Transportern auf CD4-positiven Zellen unter Ruxolitinib Behandlung erscheint somit sinnvoll und könnte weiter zum Verständnis der heterogenen Immunkompromittierung in Patienten beitragen.

Darüber hinaus konnten wir mittels genetischer Inaktivierung von *ABCB1* auf funktioneller Ebene zeigen, dass die Abundanz dieses Transportproteins die Sensitivität von T-Zellen gegenüber Ruxolitinib beeinflusst. *ABCB1* ist ein in der Literatur sehr gut und häufig beschriebener ABC-Transporter. Er erzielte in unseren Experimenten die durchschnittlich höchsten MFIs und war auch ohne Stimulation ausreichend auf den Zellen nachweisbar. Zudem sahen wir in den Patientenproben lediglich in der Korrelation von *ABCB1* mit der CD69 Expression einen signifikanten Zusammenhang. Auch bei der Korrelation von *ABCB1* zu *ABCC1* und *ABCG2* fällt auf, dass sowohl *ABCC1* als auch *ABCG2* beide mit *ABCB1* in ihrer Expression signifikant korrelieren. Daher entschieden wir uns für *ABCB1* um eine beispielhafte Untersuchung durchzuführen. In unseren Experimenten konnten wir bestätigen, dass ein *ABCB1* Knockdown in HEL und T-Zellen die Sensitivität gegenüber Ruxolitinib erhöht. Dieser Effekt zeigt sich in der Apoptose der HEL Zellen und in der Messung der Proliferation in HEL- und primären humanen T-Zellen. Dabei sahen wir jeweils nur bei hoher Knockdown Effizienz einen signifikanten Phänotyp. Ein milder Knockdown von *ABCB1* führte ebenfalls zu einer Reduktion, jedoch ohne Signifikanz zu erreichen. Möglicherweise kommt es zu einer kompensatorischen Aktivitätssteigerung anderer teil-reduzanter ABC-Transporter. Wir gehen

davon aus, dass der zwar signifikante, aber dennoch relativ milde Effekt im Hinblick auf die Proliferation durch die alleinige Inaktivierung von ABCB1 bedingt ist. In der Literatur sind synergistische Effekte von ABCB1 und ABCG2 beschrieben, durch die es zur Potenzierung der intrazellulären Akkumulation von TKIs durch Doppel-Knockdown kommt (Durmus et al. 2013). Aufgrund dieser Daten vermuteten wir auch für Ruxolitinib eine Synergie zwischen ABCB1 und ABCG2. Durch genetische Inaktivierung von *ABCB1* konnten wir modelhaft zeigen, welche funktionellen Effekte die ABC-Transporter auf die T-Zell Funktionen haben können.

Um einen direkten Nachweis der Interaktion zwischen Ruxolitinib und ABCB1 zu erbringen haben wir im Weiteren ein Efflux-Assay mit Rhodamin123, einem ABCB1 Substrat, durchgeführt. Hier gelang uns der Nachweis einer direkten Interaktion zwischen Ruxolitinib und ABCB1. Ruxolitinib hemmt in klinisch relevanten Dosen (ab 100nM) den zellulären Efflux von Rhodamin123. Somit können wir die Schlussfolgerung ziehen, dass Ruxolitinib entweder ein kompetitiver Inhibitor (Substrat) oder ein allosterischer Hemmstoff von ABCB1 ist. Die Beobachtungen zur Korrelation der ABCB1 Expression mit der T-Zell Aktivierung, sowie die RNAi Experimente suggerieren, dass Ruxolitinib tatsächlich von ABCB1 transportiert wird und somit ein Substrat von ABCB1 ist. Eine Synergie zwischen ABCB1 und ABCG2 im Transport von Ruxolitinib (wie für Momelotinib beschrieben) können wir auf Basis unserer Experimente nicht bestätigen (Durmus et al. 2013). Die Möglichkeit von Synergien mit anderen ABC-Transportern, die hier nicht untersucht wurden ist dabei möglich und wahrscheinlich.

Im Rahmen unserer Experimente haben wir erste Hinweise erhalten, dass der PI3K/AKT und MEK/ERK Signalweg eine Rolle in der Regulation der ABCB1 Expression in T-Zellen spielt. Auch in diesen Experimenten verwendeten wir ABCB1 als Modell und gehen davon aus, dass dieser Regulationsmechanismus möglicherweise auch für andere ABC-Transporter zutreffend ist. Es ist umfassend beschrieben, dass die PI3K/AKT und MEK/ERK Signalwege zentrale Regulatoren in aktivierten T-Zellen sind (Kortum et al. 2013; Cantrell 2002). Mit ihrer Aktivierung durch Stimulation mit PHA und Co-Stimulation mit IL2 wird die ABCB1 Oberflächenexpression auf T-Zellen in unseren Experimenten gesteigert. Dieser Effekt ist durch Inhibitoren dieser Signalwege, in unserem Fall durch den MEK1/2 Inhibitor UO126 und den PI3K-Inhibitor LY294002 hemmbar (**Abbildung 13**, **Abbildung 14C**). Aufgrund des Zusammenhangs zwischen dem PI3K/AKT und MEK/ERK Signalweg und der ABCB1 Expression in T-Zellen, spekulieren wir welche Funktionen die ABC-Transporter ohne die Anwesenheit eines TKI wie Ruxolitinib für die T-Zellen haben. ABC-Transporter könnten an

dem Transfer immunmodulatorischer Peptide und Lipide beteiligt sein, und somit eine Rolle in der Homöostase der T-Zellen in vivo einnehmen.

Auch unter dem Einfluss von Ruxolitinib sehen wir eine Minderung der ABCB1 Oberflächenexpression auf T-Zellen (**Abbildung 12**). Dieser Effekt ist jedoch nur unter Kostimulation mit IL-2 und einem damit aktivierten JAK/STAT Signalwegs ausgeprägt. Wir wissen aus unseren Vorarbeiten, dass Ruxolitinib sowohl eine Blockade des JAK/STAT Signalwegs, als auch des MAP-Kinase- und PI3K-Signalwegs nach IL2 Stimulation von T-Zellen bewirkt. Wir vermuten deshalb, dass die Hemmung der ABCB1 Expression unter Ruxolitinib auf eine Blockade des MAP-Kinase bzw. PI3K/AKT Signalwegs unterhalb des IL2 Rezeptors zurückzuführen ist. Aufgrund der fortbestehenden Aktivierung dieser Signalwege durch den TCR-Komplex kann es jedoch nur zu einer schwachen Reduktion der ABCB1 Expression durch den Wegfall des synergistischen IL2 Signals kommen (**Abbildung 14 B**).

ABC-Transporter vermittelter Efflux als Schutzmechanismus der T-Zelle gewinnt besonders im Hinblick auf Ruxolitinib-Therapie-assoziierte Infektionen an Bedeutung. Wir vermuten, dass Patienten mit einer geringen Expression von ABC-Transporter auf T-Zellen, durch die Behandlung mit Ruxolitinib eher an Infektionen erkranken, da ihre T-Zellen nicht adäquat in der Lage sind, sich vor zu viel intrazellulärem Ruxolitinib zu schützen. Durch eine erniedrigte Anzahl an ABC-Transportern in der Zellmembran, könnten z.B. weniger Ruxolitinib Moleküle nach extrazellulär transportiert werden. Dadurch könnte es zur verminderten Proliferation und Differenzierung von T-Zellen, sowie zu einer Hemmung Zytokin-vermittelter Signale kommen. Zukünftige klinische Studien könnten die Frage adressieren, ob sich durch die Bestimmung der ABC-Transporter Expression ein Infekt-Risiko für Patienten unter Ruxolitinib-Therapie vorhersagen lässt. Hierdurch könnten Patienten mit einer sehr niedrigen ABC-Transporter Expression und dem Risiko für begleitende Infektionen schon frühzeitig mit einer entsprechenden medikamentösen Infektionsprophylaxe behandelt werden. Die Komplikationen unter Ruxolitinib Therapie könnten so weiter minimiert werden, ohne das Therapie-Ansprechen zu reduzieren. Unsere Arbeit liefert erste Hinweise darauf, dass ABCB1 sich als ein Risikomarker für Patienten in Behandlung mit JAK-Inhibitoren eignen könnte. In der Korrelation der CD69 Aktivierbarkeit in T-Zellen mit der eingenommenen Ruxolitinib Dosis der jeweiligen MPN Patienten konnten wir keinen Zusammenhang feststellen. Diese Beobachtung suggeriert, dass kein linearer Zusammenhang zwischen intrazellulärer- und Serum-Konzentration besteht. Vielmehr scheint die Heterogenität in der T-Zell Hemmung prädominant durch eine unterschiedliche ABC-Expression hervorgerufen zu sein.

Neben den MPN finden sich auch in vielen soliden Tumoren gehäuft Mutationen in Tyrosinkinase-Rezeptoren oder Über-Expression dieser Moleküle. Beispiele dafür sind ABL, BTK, FLT3, c-KIT, HER2/neu, FGFR, VEGFR, PDGFR oder EGFR (Drake et al. 2014; Traxler 2003). Fast alle dieser Rezeptoren vermitteln nach Aktivierung durch Ihre Liganden Signale über den MAP-Kinase- bzw. PI3K/Akt Signalweg. Dieser Zusammenhang könnte erklären warum viele Tumoren eine hohe Expression von ABC-Transportern zeigen. Obwohl bei den meisten malignen Tumoren die Behandlung mit Tyrosinkinase-Inhibitoren auf lange Sicht oft unbefriedigende Ergebnisse liefert, könnte eine Co-Medikation mit diesen Substanzen auf Basis der bisherigen Erkenntnisse die antitumorale Wirkung einer Chemotherapie verbessern.

Bei der Optimierung einer therapeutischen Intervention ist somit die Balance zwischen einer Hemmung der ABC-Transporter zur Verbesserung der zytostatischen Wirkung und einer ausreichenden Restaktivität der Membranpumpen zur Vermeidung toxischer Nebenwirkungen zu finden. Wichtig ist vor allem die Kenntnis von ABC-Transporter Substraten um die Verschreibung kritischer Wirkstoffkombinationen aus Unwissenheit zu vermeiden. Nach intensiver Prüfung in klinischen Studien, könnte den ABC-Transportern eine ähnliche Rolle bei der Prädiktion von Arzneimittelinteraktion zukommen, wie aktuell dem CytochromP450 System.

5 Zusammenfassung

Wir haben in unseren Untersuchungen den JAK1/2 Inhibitor Ruxolitinib als ein Substrat des ABCB1-Transporters identifiziert. Ruxolitinib ist der erste JAK Inhibitor mit Zulassung für Polycythämia Vera (PV) und Myelofibrose (MF) in Deutschland. Dabei hemmt Ruxolitinib die mutierte JAK2V617F Kinase in hämatopoetischen Zellen genauso wie die mit Zytokin-Rezeptoren assoziierten Wildtyp-JAKs, z.B. in Immunzellen. Durch diesen immunmodulierenden Einfluss kommt es bei einigen Patienten unter Ruxolitinib Behandlung zum Teil zu schweren infektiösen Komplikationen. Vorarbeiten unserer Gruppe zeigten eine starke Heterogenität der T-Zell Hemmung durch Ruxolitinib zwischen den einzelnen untersuchten Individuen. Das führte uns zu der Zielstellung, eine Ursache für das heterogene Ansprechen der T-Zellen auf die Ruxolitinib Behandlung im Sinne einer starken oder schwachen Hemmung zu finden. Wir entschieden uns für die Untersuchung von ABC-Transportern auf T-Zellen. Nach Stimulation von T-Zellen Ruxolitinib behandelter Patienten zeigt sich eine starke Einschränkung der Immunfunktion nur in Proben mit einer geringen Expression der Transportproteine ABCB1, ABCC1 und ABCG2. Um unsere Ergebnisse zu validieren, führten wir Messungen mit PBMCs einer größeren Kohorte gesunder Probanden durch. Dabei fanden wir einen signifikanten Zusammenhang zwischen der Aktivierbarkeit von T-Zellen und der Oberflächenexpression von ABCB1, ABCC1 und ABCG2 auf CD8-positiven T-Zellen. Um einen funktionellen Beweis für die Beteiligung von ABC-Transportern an der Modulation der Ruxolitinib Sensitivität zu erbringen, führten wir eine genetische Inaktivierung von ABCB1 mittels RNA Interferenz durch. In T-Zellen gesunder Probanden führte Inaktivierung von ABCB1 zu einer vermehrten Hemmung der T-Zell Proliferation nach Ruxolitinib Behandlung. Auch in der humanen Zelllinie HEL kann durch Inaktivierung von ABCB1 ein Zusammenhang zur Ruxolitinib Empfindlichkeit gezeigt werden. Durch die Messung des Efflux fluoreszierender ABC-Substrate aus T-Zellen konnten wir abschließend zeigen, dass Ruxolitinib Substrat bzw. Inhibitor von ABCB1, nicht jedoch von ABCG2, ist. Unsere Daten lassen darauf schließen, dass niedrige ABC-Transporter Expression ein Prädiktor für infektiöse Komplikationen unter Ruxolitinib Therapie sein könnte. Durch die Identifikation dieses Zusammenhangs ergeben sich potentiell neue Ansätze für klinische Studien zur Verbesserung des Therapie-Managements bei Patienten unter Behandlung mit Ruxolitinib.

6 Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Prof. Dr. Florian Heidel für das zur Untersuchung bereitgestellte interessante Thema meiner Dissertation bedanken. Dabei gilt besonderer Dank der professionellen und umfassenden Betreuung sowie der wissenschaftlichen Koordination.

Das produktive und freundliche Klima innerhalb der Arbeitsgruppe förderte das strukturierte und motivierte Vorankommen meiner Arbeit.

Des Weiteren gilt mein besonderer Dank Florian Perner, der mich in die experimentellen Methoden und die Auswertung der Daten einarbeitete und meine Arbeit stets durch konstruktive Ideen für die Durchführung der Experimente bereicherte.

Ich bedanke mich weiterhin bei dem gesamten Team der Hämatologischen Spezialambulanz, insbesondere bei Prof. Dr. Florian Heidel und Dr. Denise Wolleschak für die Bereitstellung des Patientenmaterials.

Für die finanzielle Förderung im Rahmen des Projektes „Effects of Ruxolitinib on T-cell function“ danke ich der Firma Novartis.

Besonderer Dank geht an meine Eltern und Großeltern, die mich in der Zeit meines Studiums und während meiner Promotionsarbeit immer aus ganzem Herzen unterstützt haben.

7 Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Caroline Ebert
Geburtsdatum: 31.01.91
Geburtsort: Suhl
Nationalität: Deutsch
Familienstand: ledig/ keine Kinder
Adresse: Ernst-Thälmann-Str. 16,
07747 Jena
E-Mail: Caroline.ebert91@gmail.com



Ausbildungsweg:

1997-2009 Besuch der Grundschule Masserberg und des Gymnasiums in Schleusingen

13.05.2009 Abitur am Hennebergischen Gymnasium "Georg Ernst", Schleusingen (Note: 1,5)

Seit 01.10.2009 Studium der Humanmedizin an der Otto-von-Guericke Universität Magdeburg

Februar 2011 Wahlfach „Genetik und Physiologie der BDNF-abhängigen Gedächtnisbildung“ für Mediziner (Note: sehr gut)

05.09.2011 Abschluss des ersten Staatsexamens / Physikum (Note: gut)

**01.05.2012 –
01.05.2014** Wissenschaftliche Tätigkeit im „Neurodegeneration Research Lab“ der Klinik für Neurologie des Universitätsklinikum Magdeburg im Rahmen von klinischen Studien zur Identifikation von ABC-Transportern als klinische Marker in Neurodegenerativen Erkrankungen

2012 - 2013 Wahlfach Neurologie (Note: 1)
09.10.2014 Abschluss des Zweiten Staatsexamens (Note: gut)

**Oktober 2014 -
Juli 2015** Experimentelle Arbeit im Rahmen des Promotions Projektes „Einfluss von ABC-Transportern auf die Sensitivität von T-Zellen gegenüber dem Janus-Kinase-Inhibitor Ruxolitinib“ im Labor von Oberarzt Prof. Dr. med. F. H. Heidel der Klinik für Hämatologie/Onkologie des Universitätsklinikum Magdeburg

**November 2014-
Oktober 2015** Praktisches Jahr: Klinisch ärztliche Tätigkeit im 6. Studienjahr
1. Tertial: Klinik für Herz-und Thorax Chirurgie und Klinik für Allgemein- und Viszeral Chirurgie des Universitätsklinikum Magdeburg
2. Tertial: Klinik für Hämatologie/Onkologie Universitätsklinikum Magdeburg
3. Tertial: Klinik für Neurologie Universitätsklinikum Jena

Dezember 2015 Drittes Staatsexamen (Note: sehr gut)

Veröffentlichungen:

Publikationen in Zeitschriften

Ebert C, Perner F, Wolleschak D, Schnöder TM, Fischer T, Heidel FH. Expression and function of ABC-transporter protein ABCB1 correlates with inhibitory capacity of Ruxolitinib in vitro and in vivo. **Haematologica**. 2015 Nov 20. pii: haematol.2015.136754. [Epub ahead of print]

Perner F, Schnöder TM, Ranjan S, Wolleschak D, **Ebert C**, Pils MC, Frey S, Polanetzki A, Fahldieck C, Schönborn U, Schraven B, Isermann B, Fischer T, Heidel FH. Specificity of JAK-kinase inhibition determines impact on human and murine T-cell function. **Leukemia**. 2015 Aug 5. doi: 10.1038/leu.2015.218.

Poster bei nationalen Kongressen:

Ebert C, Perner F, Schnoeder TM, Fischer T und Heidel FH:

JAK Inhibitoren: Eine potentiell interessante neue Substanzgruppe zur Behandlung der Multiplen Sklerose und anderer entzündlicher Erkrankungen? Molekulare Mechanismen der Immunsuppression unter JAK-Inhibition und Review von Daten zur Wirksamkeit und Sicherheit aus klinischen Studien in myeloproliferativen- und rheumatischen Erkrankungen.

Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Neurologie/Düsseldorf 9-2015

Auswahl zur Vorstellung als e-Poster als eines unter den 30 besten Abstracts 2015

8 Erklärung

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

Einfluss von ABC-Transportern auf die Sensitivität von T-Zellen gegenüber dem Janus-Kinase-Inhibitor Ruxolitinib

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, den

Caroline Ebert

9 Literaturverzeichnis

- Adamson, J. W.; Fialkow, P. J.; Murphy, S.; Prchal, J. F.; Steinmann, L. (1976): Polycythemia vera: stem-cell and probable clonal origin of the disease. In: *N Engl J Med* 295 (17), S. 913–916. DOI: 10.1056/NEJM197610212951702.
- Baccarani, Michele; Castagnetti, Fausto; Gugliotta, Gabriele; Rosti, Gianantonio (2015): A review of the European LeukemiaNet recommendations for the management of CML. In: *Ann Hematol* 94 Suppl 2, S. S141-7. DOI: 10.1007/s00277-015-2322-2.
- Barosi, Giovanni; Bergamaschi, Gaetano; Marchetti, Monia; Vannucchi, Alessandro M.; Guglielmelli, Paola; Antonioli, Elisabetta et al. (2007): JAK2 V617F mutational status predicts progression to large splenomegaly and leukemic transformation in primary myelofibrosis. In: *Blood* 110 (12), S. 4030–4036. DOI: 10.1182/blood-2007-07-099184.
- Baxter, E. Joanna; Scott, Linda M.; Campbell, Peter J.; East, Clare; Fourouclas, Nasios; Swanton, Soheila et al. (2005): Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. In: *Lancet* 365 (9464), S. 1054–1061. DOI: 10.1016/S0140-6736(05)71142-9.
- Beer, Philip A.; Campbell, Peter J.; Scott, Linda M.; Bench, Anthony J.; Erber, Wendy N.; Bareford, David et al. (2008): MPL mutations in myeloproliferative disorders: analysis of the PT-1 cohort. In: *Blood* 112 (1), S. 141–149. DOI: 10.1182/blood-2008-01-131664.
- Bellusci, Carolina P.; Rocco, Carlos; Aulicino, Paula; Mecikovsky, Debora; Curras, Veronica; Hegoburu, Soledad et al. (2013): Influence of MDR1 C1236T polymorphism on lopinavir plasma concentration and virological response in HIV-1-infected children. In: *Gene* 522 (1), S. 96–101. DOI: 10.1016/j.gene.2013.03.020.
- Bonicelli, Gilles; Abdulkarim, Khadija; Mounier, Morgane; Johansson, Peter; Rossi, Cedric; Jooste, Valerie et al. (2013): Leucocytosis and thrombosis at diagnosis are associated with poor survival in polycythaemia vera: a population-based study of 327 patients. In: *Br J Haematol* 160 (2), S. 251–254. DOI: 10.1111/bjh.12117.
- Borths, Elizabeth L.; Locher, Kaspar P.; Lee, Allen T.; Rees, Douglas C. (2002): The structure of Escherichia coli BtuF and binding to its cognate ATP binding cassette transporter. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 (26), S. 16642–16647. DOI: 10.1073/pnas.262659699.
- Boulay, Jean-Louis; O'Shea, John J.; Paul, William E. (2003): Molecular phylogeny within type I cytokines and their cognate receptors. In: *Immunity* 19 (2), S. 159–163.
- Bourguignon, Lilly Y. W.; Peyrollier, Karine; Xia, Weiliang; Gilad, Eli (2008): Hyaluronan-CD44 interaction activates stem cell marker Nanog, Stat-3-mediated MDR1 gene expression, and ankyrin-regulated multidrug efflux in breast and ovarian tumor cells. In: *J. Biol. Chem.* 283 (25), S. 17635–17651. DOI: 10.1074/jbc.M800109200.
- Braun, Jörg; Aries, Sven (2000): Basislehrbuch Innere Medizin. Kompakt, greifbar, verständlich. 1. Aufl. München, Jena: Urban und Fischer.
- Bruhn, Oliver; Cascorbi, Ingolf (2014): Polymorphisms of the drug transporters ABCB1, ABCG2, ABCC2 and ABCC3 and their impact on drug bioavailability and clinical relevance. In: *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 10 (10), S. 1337–1354. DOI: 10.1517/17425255.2014.952630.
- Campbell, Peter J.; Griesshammer, Martin; Dohner, Konstanze; Dohner, Hartmut; Kusec, Rajko; Hasselbalch, Hans C. et al. (2006): V617F mutation in JAK2 is associated with poorer survival in idiopathic myelofibrosis. In: *Blood* 107 (5), S. 2098–2100. DOI: 10.1182/blood-2005-08-3395.
- Cantrell, Doreen (2002): Protein kinase B (Akt) regulation and function in T lymphocytes. In: *Semin Immunol* 14 (1), S. 19–26. DOI: 10.1006/smim.2001.0338.

- Caocci, G.; Murgia, F.; Podda, L.; Solinas, A.; Atzeni, S.; La Nasa, G. (2014): Reactivation of hepatitis B virus infection following ruxolitinib treatment in a patient with myelofibrosis. In: *Leukemia* 28 (1), S. 225–227. DOI: 10.1038/leu.2013.235.
- Chen, Ting; Wang, Changyuan; Liu, Qi; Meng, Qiang; Sun, Huijun; Huo, Xiaokui et al. (2015): Dasatinib reverses the multidrug resistance of breast cancer MCF-7 cells to doxorubicin by downregulating P-gp expression via inhibiting the activation of ERK signaling pathway. In: *Cancer Biol. Ther.* 16 (1), S. 106–114. DOI: 10.4161/15384047.2014.987062.
- Choi, Jaebok; Cooper, Matthew L.; Alahmari, Bader; Ritchey, Julie; Collins, Lynne; Holt, Matthew; DiPersio, John F. (2014): Pharmacologic blockade of JAK1/JAK2 reduces GvHD and preserves the graft-versus-leukemia effect. In: *PLoS ONE* 9 (10), S. e109799. DOI: 10.1371/journal.pone.0109799.
- Choi, Young Hee; Yu, Ai-Ming (2014): ABC transporters in multidrug resistance and pharmacokinetics, and strategies for drug development. In: *Curr Pharm Des* 20 (5), S. 793–807.
- Colomba, Claudia; Rubino, Raffaella; Siracusa, Lucia; Lalicata, Francesco; Trizzino, Marcello; Titone, Lucina; Tolomeo, Manlio (2012): Disseminated tuberculosis in a patient treated with a JAK2 selective inhibitor: a case report. In: *BMC Res Notes* 5, S. 552. DOI: 10.1186/1756-0500-5-552.
- Dean, M.; Hamon, Y.; Chimini, G. (2001): The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. In: *J Lipid Res* 42 (7), S. 1007–1017.
- Deeley, Roger G.; Westlake, Christopher; Cole, Susan P. C. (2006): Transmembrane transport of endo- and xenobiotics by mammalian ATP-binding cassette multidrug resistance proteins. In: *Physiol Rev* 86 (3), S. 849–899. DOI: 10.1152/physrev.00035.2005.
- Drachman, J. G.; Millett, K. M.; Kaushansky, K. (1999): Thrombopoietin signal transduction requires functional JAK2, not TYK2. In: *J Biol Chem* 274 (19), S. 13480–13484.
- Drake, Justin M.; Lee, John K.; Witte, Owen N. (2014): Clinical targeting of mutated and wild-type protein tyrosine kinases in cancer. In: *Mol Cell Biol* 34 (10), S. 1722–1732. DOI: 10.1128/MCB.01592-13.
- Durmus, S.; Xu, N.; Sparidans, R. W.; Wagenaar, E.; Beijnen, J. H.; Schinkel, A. H. (2013): P-glycoprotein (MDR1/ABCB1) and breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) restrict brain accumulation of the JAK1/2 inhibitor, CYT387. In: *Pharmacol Res* 76, S. 9–16. DOI: 10.1016/j.phrs.2013.06.009.
- Feldmann, Marc; Maini, Ravinder N. (2008): Role of cytokines in rheumatoid arthritis: an education in pathophysiology and therapeutics. In: *Immunol Rev* 223, S. 7–19. DOI: 10.1111/j.1600-065X.2008.00626.x.
- Ferreira, Thais B.; Hygino, Joana; Barros, Priscila O.; Teixeira, Bruna; Kasahara, Taissa M.; Linhares, Ulisses C. et al. (2014): Endogenous interleukin-6 amplifies interleukin-17 production and corticoid-resistance in peripheral T cells from patients with multiple sclerosis. In: *Immunology* 143 (4), S. 560–568. DOI: 10.1111/imm.12334.
- Galli, Sofia; McLornan, Donal; Harrison, Claire (2014): Safety evaluation of ruxolitinib for treating myelofibrosis. In: *Expert Opin Drug Saf* 13 (7), S. 967–976. DOI: 10.1517/14740338.2014.916273.
- Ghoreschi, Kamran; Gadina, Massimo (2014): Jakpot! New small molecules in autoimmune and inflammatory diseases. In: *Exp Dermatol* 23 (1), S. 7–11. DOI: 10.1111/exd.12265.
- Ghoreschi, Kamran; Weigert, Christina; Rocken, Martin (2007): Immunopathogenesis and role of T cells in psoriasis. In: *Clin Dermatol* 25 (6), S. 574–580. DOI: 10.1016/j.clindermatol.2007.08.012.
- Goldberg, Roger A.; Reichel, Elias; Oshry, Lauren J. (2013): Bilateral toxoplasmosis retinitis associated with ruxolitinib. In: *N. Engl. J. Med.* 369 (7), S. 681–683. DOI: 10.1056/NEJMc1302895.

- Guglielmelli, Paola; Pancrazzi, Alessandro; Bergamaschi, Gaetano; Rosti, Vittorio; Villani, Laura; Antonioli, Elisabetta et al. (2007): Anaemia characterises patients with myelofibrosis harbouring Mpl mutation. In: *Br J Haematol* 137 (3), S. 244–247. DOI: 10.1111/j.1365-2141.2007.06565.x.
- Harrison, Claire; Kiladjian, Jean-Jacques; Al-Ali, Haifa Kathrin; Gisslinger, Heinz; Waltzman, Roger; Stalbovskaya, Viktoriya et al. (2012): JAK inhibition with ruxolitinib versus best available therapy for myelofibrosis. In: *N Engl J Med* 366 (9), S. 787–798. DOI: 10.1056/NEJMoa1110556.
- Heine, Annkristin; Brossart, Peter; Wolf, Dominik (2013a): Ruxolitinib is a potent immunosuppressive compound: is it time for anti-infective prophylaxis? In: *Blood* 122 (23), S. 3843–3844. DOI: 10.1182/blood-2013-10-531103.
- Heine, Annkristin; Held, Stefanie Andrea Erika; Daecke, Solveig Nora; Wallner, Stephanie; Yajnanarayana, Sowmya Parampalli; Kurts, Christian et al. (2013b): The JAK-inhibitor ruxolitinib impairs dendritic cell function in vitro and in vivo. In: *Blood* 122 (7), S. 1192–1202. DOI: 10.1182/blood-2013-03-484642.
- Higgins, C. F. (1992): ABC transporters: from microorganisms to man. In: *Annu Rev Cell Biol* 8, S. 67–113. DOI: 10.1146/annurev.cb.08.110192.000435.
- Hoffmann, Ulrich; Kroemer, Heyo K. (2004): The ABC transporters MDR1 and MRP2: multiple functions in disposition of xenobiotics and drug resistance. In: *Drug Metab Rev* 36 (3-4), S. 669–701. DOI: 10.1081/DMR-200033473.
- Hour, Tzyh-Chyuan; Chung, Shiu-Dong; Kang, Wang-Yi; Lin, Ying-Chu; Chuang, Shu-Ju; Huang, A-Mei et al. (2015): EGFR mediates docetaxel resistance in human castration-resistant prostate cancer through the Akt-dependent expression of ABCB1 (MDR1). In: *Arch. Toxicol.* 89 (4), S. 591–605. DOI: 10.1007/s00204-014-1275-x.
- Huang, Weishan; August, Avery (2015): The signaling symphony: T cell receptor tunes cytokine-mediated T cell differentiation. In: *J Leukoc Biol* 97 (3), S. 477–485. DOI: 10.1189/jlb.1R10614-293R.
- Ishida, Y.; Ohtsu, T.; Hamada, H.; Sugimoto, Y.; Tobinai, K.; Minato, K. et al. (1989): Multidrug resistance in cultured human leukemia and lymphoma cell lines detected by a monoclonal antibody, MRK16. In: *Jpn J Cancer Res* 80 (10), S. 1006–1013.
- Ishida, Y.; Shimada, Y.; Shimoyama, M. (1990): Synergistic effect of cyclosporin A and verapamil in overcoming vincristine resistance of multidrug-resistant cultured human leukemia cells. In: *Jpn J Cancer Res* 81 (8), S. 834–841.
- Islam, Naseeha; Leung, Patrick S. C.; Huntley, Arthur C.; Gershwin, M. Eric (2015): The autoimmune basis of alopecia areata: a comprehensive review. In: *Autoimmun Rev* 14 (2), S. 81–89. DOI: 10.1016/j.autrev.2014.10.014.
- James, Chloe; Ugo, Valerie; Le Couedic, Jean-Pierre; Staerk, Judith; Delhommeau, Francois; Lacout, Catherine et al. (2005): A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. In: *Nature* 434 (7037), S. 1144–1148. DOI: 10.1038/nature03546.
- Jang, You-Na; Baik, Eun Joo (2013): JAK-STAT pathway and myogenic differentiation. In: *JAKSTAT* 2 (2), S. e23282. DOI: 10.4161/jkst.23282.
- Ju, Ji-Min; Lee, Hakmo; Oh, Keunhee; Lee, Dong-Sup; Choi, Eun Young (2014): Kinetics of IFN-gamma and IL-17 Production by CD4 and CD8 T Cells during Acute Graft-versus-Host Disease. In: *Immune Netw* 14 (2), S. 89–99. DOI: 10.4110/in.2014.14.2.89.
- Kannan, Arun; Huang, Weishan; Huang, Fei; August, Avery (2012): Signal transduction via the T cell antigen receptor in naive and effector/memory T cells. In: *Int J Biochem Cell Biol* 44 (12), S. 2129–2134. DOI: 10.1016/j.biocel.2012.08.023.

- Keizer, Sytze; Gerritsen, Roald; Jauw, Yvonne; Janssen, Jeroen; Koopman, Bart; Bresser, Paul (2015): Fatal tuberculosis during treatment with ruxolitinib. In: *Ned Tijdschr Geneesk* 159, S. A8650.
- Kortum, Robert L.; Rouquette-Jazdanian, Alexandre K.; Samelson, Lawrence E. (2013): Ras and extracellular signal-regulated kinase signaling in thymocytes and T cells. In: *Trends Immunol* 34 (6), S. 259–268. DOI: 10.1016/j.it.2013.02.004.
- Kralovics, Robert; Passamonti, Francesco; Buser, Andreas S.; Teo, Soon-Siong; Tiedt, Ralph; Passweg, Jakob R. et al. (2005): A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. In: *The New England journal of medicine* 352 (17), S. 1779–1790. DOI: 10.1056/NEJMoa051113.
- Larsen, Thomas Stauffer; Pallisgaard, Niels; Moller, Michael Boe; Hasselbalch, Hans Carl (2007): The JAK2 V617F allele burden in essential thrombocythemia, polycythemia vera and primary myelofibrosis--impact on disease phenotype. In: *European journal of haematology* 79 (6), S. 508–515. DOI: 10.1111/j.1600-0609.2007.00960.x.
- Lengfelder, E. (2013): Diagnosis and therapy of polycythemia vera in the era of JAK2. In: *Dtsch Med Wochenschr* 138 (7), S. 331–336. DOI: 10.1055/s-0032-1332856.
- Lengfelder, Eva; Merx, Kirsten; Hehlmann, Rudiger (2006): Diagnosis and therapy of polycythemia vera. In: *Semin Thromb Hemost* 32 (3), S. 267–275. DOI: 10.1055/s-2006-939438.
- Leonard, W. J.; O'Shea, J. J. (1998): Jaks and STATs: biological implications. In: *Annu Rev Immunol* 16, S. 293–322. DOI: 10.1146/annurev.immunol.16.1.293.
- Levine, Ross L.; Gilliland, D. Gary (2008): Myeloproliferative disorders. In: *Blood* 112 (6), S. 2190–2198. DOI: 10.1182/blood-2008-03-077966.
- Levine, Ross L.; Wadleigh, Martha; Coombs, Jan; Ebert, Benjamin L.; Wernig, Gerlinde; Huntly, Brian J. P. et al. (2005): Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. In: *Cancer Cell* 7 (4), S. 387–397. DOI: 10.1016/j.ccr.2005.03.023.
- Lipka, Daniel B.; Wagner, Marie-Christine; Dziadosz, Marek; Schnoder, Tina; Heidel, Florian; Schemionek, Mirle et al. (2012): Intracellular retention of ABL kinase inhibitors determines commitment to apoptosis in CML cells. In: *PLoS ONE* 7 (7), S. e40853. DOI: 10.1371/journal.pone.0040853.
- Locher, Kaspar P. (2004): Structure and mechanism of ABC transporters. In: *Curr Opin Struct Biol* 14 (4), S. 426–431. DOI: 10.1016/j.sbi.2004.06.005.
- Locher, Kaspar P.; Borths, Elizabeth (2004): ABC transporter architecture and mechanism: implications from the crystal structures of BtuCD and BtuF. In: *FEBS Lett* 564 (3), S. 264–268. DOI: 10.1016/S0014-5793(04)00289-3.
- Marks, D. C.; Su, G. M.; Davey, R. A.; Davey, M. W. (1996): Extended multidrug resistance in haemopoietic cells. In: *Br J Haematol* 95 (4), S. 587–595.
- Michalak, Marek; Lynch, Jeffrey; Groenendyk, Jody; Guo, Lei; Robert Parker, J. M.; Opas, Michal (2002): Calreticulin in cardiac development and pathology. In: *Biochim Biophys Acta* 1600 (1-2), S. 32–37.
- Nangalia, J.; Massie, C. E.; Baxter, E. J.; Nice, F. L.; Gundem, G.; Wedge, D. C. et al. (2013): Somatic CALR mutations in myeloproliferative neoplasms with nonmutated JAK2. In: *N Engl J Med* 369 (25), S. 2391–2405. DOI: 10.1056/NEJMoa1312542.
- Nestle, Frank O.; Kaplan, Daniel H.; Barker, Jonathan (2009): Psoriasis. In: *N Engl J Med* 361 (5), S. 496–509. DOI: 10.1056/NEJMra0804595.
- O'Shea, John J.; Murray, Peter J. (2008): Cytokine signaling modules in inflammatory responses. In: *Immunity* 28 (4), S. 477–487. DOI: 10.1016/j.immuni.2008.03.002.

- Parampalli Yajnanarayana, Sowmya; Stubig, Thomas; Cornez, Isabelle; Alchalby, Haefaa; Schonberg, Kathrin; Rudolph, Janna et al. (2015): JAK1/2 inhibition impairs T cell function in vitro and in patients with myeloproliferative neoplasms. In: *Br J Haematol* 169 (6), S. 824–833. DOI: 10.1111/bjh.13373.
- Pasquali, Livia; Lucchesi, Cinzia; Pecori, Chiara; Metelli, Maria Rita; Pellegrini, Silvia; Iudice, Alfonso; Bonuccelli, Ubaldo (2015): A clinical and laboratory study evaluating the profile of cytokine levels in relapsing remitting and secondary progressive multiple sclerosis. In: *J Neuroimmunol* 278, S. 53–59. DOI: 10.1016/j.jneuroim.2014.12.005.
- Perner, F.; Schnoder, T. M.; Ranjan, S.; Wolleschak, D.; Ebert, C.; Pils, M. C. et al. (2015): Specificity of JAK-kinase inhibition determines impact on human and murine T-cell function. In: *Leukemia*. DOI: 10.1038/leu.2015.218.
- Pikman, Yana; Lee, Benjamin H.; Mercher, Thomas; McDowell, Elizabeth; Ebert, Benjamin L.; Gozo, Maricel et al. (2006): MPLW515L is a novel somatic activating mutation in myelofibrosis with myeloid metaplasia. In: *PLoS Med* 3 (7), S. e270. DOI: 10.1371/journal.pmed.0030270.
- Pourcelot, Emmanuel; Trocme, Candice; Mondet, Julie; Bailly, Sebastien; Toussaint, Bertrand; Mossuz, Pascal (2014): Cytokine profiles in polycythemia vera and essential thrombocythemia patients: clinical implications. In: *Exp Hematol* 42 (5), S. 360–368. DOI: 10.1016/j.exphem.2014.01.006.
- Rees, Douglas C.; Johnson, Eric; Lewinson, Oded (2009): ABC transporters: the power to change. In: *Nat Rev Mol Cell Biol* 10 (3), S. 218–227. DOI: 10.1038/nrm2646.
- Roy, Upal; Chakravarty, Geetika; Honer Zu Bentrup, Kerstin; Mondal, Debasis (2009): Montelukast is a potent and durable inhibitor of multidrug resistance protein 2-mediated efflux of taxol and saquinavir. In: *Biol Pharm Bull* 32 (12), S. 2002–2009.
- Sarkadi, Balazs; Homolya, Laszlo; Szakacs, Gergely; Varadi, Andras (2006): Human multidrug resistance ABCB and ABCG transporters: participation in a chemoinnity defense system. In: *Physiol Rev* 86 (4), S. 1179–1236. DOI: 10.1152/physrev.00037.2005.
- Sazawal, Sudha; Singh, Neha; Mahapatra, Manoranjan; Saxena, Renu (2015): Calreticulin mutation profile in Indian patients with primary myelofibrosis. In: *Hematology*. DOI: 10.1179/1607845415Y.0000000018.
- Schartl M; Gessler M; Eckardstein A: Biochemie und Molekularbiologie des Menschen. München: Elsevier, Urban & Fischer.
- Scherber, Robyn; Dueck, Amylou C.; Johansson, Peter; Barbui, Tiziano; Barosi, Giovanni; Vannucchi, Alessandro M. et al. (2011): The Myeloproliferative Neoplasm Symptom Assessment Form (MPN-SAF): international prospective validation and reliability trial in 402 patients. In: *Blood* 118 (2), S. 401–408. DOI: 10.1182/blood-2011-01-328955.
- Schinkel, A. H.; Smit, J. J.; van Tellingen, O.; Beijnen, J. H.; Wagenaar, E.; van Deemter, L. et al. (1994): Disruption of the mouse *mdr1a* P-glycoprotein gene leads to a deficiency in the blood-brain barrier and to increased sensitivity to drugs. In: *Cell* 77 (4), S. 491–502.
- Schonberg, Kathrin; Rudolph, Janna; Vonnahme, Maria; Parampalli Yajnanarayana, Sowmya; Cornez, Isabelle; Hejazi, Maryam et al. (2015): JAK Inhibition Impairs NK Cell Function in Myeloproliferative Neoplasms. In: *Cancer Res* 75 (11), S. 2187–2199. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-14-3198.
- Scott, Linda M.; Tong, Wei; Levine, Ross L.; Scott, Mike A.; Beer, Philip A.; Stratton, Michael R. et al. (2007): JAK2 exon 12 mutations in polycythemia vera and idiopathic erythrocytosis. In: *N Engl J Med* 356 (5), S. 459–468. DOI: 10.1056/NEJMoa065202.

- Shilling, Adam D.; Nedza, Frank M.; Emm, Thomas; Diamond, Sharon; McKeever, Edward; Punwani, Naresh et al. (2010): Metabolism, excretion, and pharmacokinetics of 14CINCB018424, a selective Janus tyrosine kinase 1/2 inhibitor, in humans. In: *Drug Metab Dispos* 38 (11), S. 2023–2031. DOI: 10.1124/dmd.110.033787.
- Silver, Richard T.; Vandris, Katherine; Wang, Y. Lynn; Adriano, Fernando; Jones, Amy V.; Christos, Paul J.; Cross, Nicholas C. P. (2011): JAK2(V617F) allele burden in polycythemia vera correlates with grade of myelofibrosis, but is not substantially affected by therapy. In: *Leukemia research* 35 (2), S. 177–182. DOI: 10.1016/j.leukres.2010.06.017.
- Simms, P. E.; Ellis, T. M. (1996): Utility of flow cytometric detection of CD69 expression as a rapid method for determining poly- and oligoclonal lymphocyte activation. In: *Clin Diagn Lab Immunol* 3 (3), S. 301–304.
- Spoerl, Silvia; Mathew, Nimitha R.; Bscheider, Michael; Schmitt-Graeff, Annette; Chen, Sophia; Mueller, Tony et al. (2014): Activity of therapeutic JAK 1/2 blockade in graft-versus-host disease. In: *Blood* 123 (24), S. 3832–3842. DOI: 10.1182/blood-2013-12-543736.
- Strober, Warren; Fuss, Ivan J. (2011): Proinflammatory cytokines in the pathogenesis of inflammatory bowel diseases. In: *Gastroenterology* 140 (6), S. 1756–1767. DOI: 10.1053/j.gastro.2011.02.016.
- Takahashi, Koichi; Patel, Keyur P.; Kantarjian, Hagop; Luthra, Rajyalakshmi; Pierce, Sherry; Cortes, Jorge; Verstovsek, Srdan (2013): JAK2 p.V617F detection and allele burden measurement in peripheral blood and bone marrow aspirates in patients with myeloproliferative neoplasms. In: *Blood* 122 (23), S. 3784–3786. DOI: 10.1182/blood-2013-07-515676.
- Tanemura, Atsushi; Oiso, Naoki; Nakano, Mayuko; Itoi, Saori; Kawada, Akira; Katayama, Ichiro (2013): Alopecia areata: infiltration of Th17 cells in the dermis, particularly around hair follicles. In: *Dermatology* 226 (4), S. 333–336. DOI: 10.1159/000350933.
- Tefferi, A.; Rumi, E.; Finazzi, G.; Gisslinger, H.; Vannucchi, A. M.; Rodeghiero, F. et al. (2013): Survival and prognosis among 1545 patients with contemporary polycythemia vera: an international study. In: *Leukemia* 27 (9), S. 1874–1881. DOI: 10.1038/leu.2013.163.
- Tefferi, Ayalew; Barbui, Tiziano (2015): Polycythemia vera and essential thrombocythemia: 2015 update on diagnosis, risk-stratification and management. In: *Am J Hematol* 90 (2), S. 162–173. DOI: 10.1002/ajh.23895.
- Tefferi, Ayalew; Vaidya, Rakhee; Caramazza, Domenica; Finke, Christy; Lasho, Terra; Pardanani, Animesh (2011): Circulating interleukin (IL)-8, IL-2R, IL-12, and IL-15 levels are independently prognostic in primary myelofibrosis: a comprehensive cytokine profiling study. In: *J Clin Oncol* 29 (10), S. 1356–1363. DOI: 10.1200/JCO.2010.32.9490.
- Tomiyasu, Hirotaka; Watanabe, Manabu; Sugita, Kanji; Goto-Koshino, Yuko; Fujino, Yasuhito; Ohno, Koichi et al. (2013): Regulations of ABCB1 and ABCG2 expression through MAPK pathways in acute lymphoblastic leukemia cell lines. In: *Anticancer Res* 33 (12), S. 5317–5323.
- Traxler, Peter (2003): Tyrosine kinases as targets in cancer therapy - successes and failures. In: *Expert Opin Ther Targets* 7 (2), S. 215–234. DOI: 10.1517/14728222.7.2.215.
- Vannucchi, A. M.; Antonioli, E.; Guglielmelli, P.; Longo, G.; Pancrazzi, A.; Ponziani, V. et al. (2007): Prospective identification of high-risk polycythemia vera patients based on JAK2(V617F) allele burden. In: *Leukemia* 21 (9), S. 1952–1959. DOI: 10.1038/sj.leu.2404854.
- Vannucchi, Alessandro M. (2015): Ruxolitinib versus standard therapy for the treatment of polycythemia vera. In: *The New England journal of medicine* 372 (17), S. 1670–1671. DOI: 10.1056/NEJMc1502524.

- Vannucchi, Alessandro M.; Kiladjian, Jean Jacques; Griesshammer, Martin; Masszi, Tamas; Durrant, Simon; Passamonti, Francesco et al. (2015): Ruxolitinib versus standard therapy for the treatment of polycythemia vera. In: *N Engl J Med* 372 (5), S. 426–435. DOI: 10.1056/NEJMoa1409002.
- Verstovsek, Srdan; Kantarjian, Hagop; Mesa, Ruben A.; Pardanani, Animesh D.; Cortes-Franco, Jorge; Thomas, Deborah A. et al. (2010): Safety and efficacy of INCB018424, a JAK1 and JAK2 inhibitor, in myelofibrosis. In: *N Engl J Med* 363 (12), S. 1117–1127. DOI: 10.1056/NEJMoa1002028.
- Verstovsek, Srdan; Mesa, Ruben A.; Gotlib, Jason; Levy, Richard S.; Gupta, Vikas; DiPersio, John F. et al. (2013): Efficacy, safety and survival with ruxolitinib in patients with myelofibrosis: results of a median 2-year follow-up of COMFORT-I. In: *Haematologica* 98 (12), S. 1865–1871. DOI: 10.3324/haematol.2013.092155.
- Wathes, Rowan; Moule, Simon; Milojkovic, Dragana (2013): Progressive multifocal leukoencephalopathy associated with ruxolitinib. In: *N Engl J Med* 369 (2), S. 197–198. DOI: 10.1056/NEJMc1302135.
- Wu, Chung-Pu; Calcagno, Anna Maria; Ambudkar, Suresh V. (2008): Reversal of ABC drug transporter-mediated multidrug resistance in cancer cells: evaluation of current strategies. In: *Curr Mol Pharmacol* 1 (2), S. 93–105.
- Wu, Chung-Pu; Hsieh, Chia-Hung; Wu, Yu-Shan (2011): The emergence of drug transporter-mediated multidrug resistance to cancer chemotherapy. In: *Mol Pharm* 8 (6), S. 1996–2011. DOI: 10.1021/mp200261n.
- Wysham, Nicholas G.; Sullivan, Donald R.; Allada, Gopal (2013): An opportunistic infection associated with ruxolitinib, a novel janus kinase 1,2 inhibitor. In: *Chest* 143 (5), S. 1478–1479. DOI: 10.1378/chest.12-1604.
- Xie, Xia; Tang, Bo; Zhou, Jianyun; Gao, Qing; Zhang, Pengbing (2013): Inhibition of the PI3K/Akt pathway increases the chemosensitivity of gastric cancer to vincristine. In: *Oncol. Rep.* 30 (2), S. 773–782. DOI: 10.3892/or.2013.2520.
- Xing, Luzhou; Dai, Zhenpeng; Jabbari, Ali; Cerise, Jane E.; Higgins, Claire A.; Gong, Weijuan et al. (2014): Alopecia areata is driven by cytotoxic T lymphocytes and is reversed by JAK inhibition. In: *Nat Med* 20 (9), S. 1043–1049. DOI: 10.1038/nm.3645.
- Yamaoka, Kunihiko; Saharinen, Pipsa; Pesu, Marko; Holt, Vance E T 3rd; Silvennoinen, Olli; O'Shea, John J. (2004): The Janus kinases (Jaks). In: *Genome Biol* 5 (12), S. 253. DOI: 10.1186/gb-2004-5-12-253.
- Yun, Miyong; Lee, Duckgwe; Park, Moon-Nyeo; Kim, Eun-Ok; Sohn, Eun Jung; Kwon, Byung-Mog; Kim, Sung-Hoon (2015): Cinnamaldehyde Derivative (CB-PIC) Sensitizes Chemo-Resistant Cancer Cells to Drug-Induced Apoptosis via Suppression of MDR1 and its Upstream STAT3 and AKT Signalling. In: *Cell. Physiol. Biochem.* 35 (5), S. 1821–1830. DOI: 10.1159/000373993.
- Ziegler, S. F.; Ramsdell, F.; Alderson, M. R. (1994): The activation antigen CD69. In: *Stem Cells* 12 (5), S. 456–465. DOI: 10.1002/stem.5530120502.