

Aus dem CharitéCentrum 14 – Tumormedizin
Klinik für Hämatologie und Onkologie
Campus Benjamin Franklin
Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h. c. Eckhard Thiel

Habilitationsschrift

Neue molekulare Prognosefaktoren bei der akuten Leukämie

zur Erlangung der Venia legendi
für das Fach

Innere Medizin

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Dr. med. Claudia Dorothea Baldus

geboren am 06.09.1972
in Köln

Eingereicht: Oktober 2007
Dekan: Professor Dr. med. M. Paul
1. Gutachter: Professor Dr. med. Schlegelberger
2. Gutachter: Professor Dr. med. Serve

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG	5
2. AKUTE MYELOISCHE LEUKÄMIE (AML)	6
2.1 Epidemiologie	6
2.2 Klassifikation	7
2.3 Klinisches Krankheitsbild	7
2.4 Diagnosstellung	8
2.5 Therapie und Prognose	8
2.6 Pathogenetisches Modell	9
3. ZYTOGENETISCHE UND MOLEKULARGENETISCHE VERÄNDERUNGEN BEI DER AML	10
3.1 AML mit normalem Karyotyp	11
3.1.1 Genetische Alterationen mit prognostischer Relevanz bei AML mit normalem Karyotyp	13
4. AKUTE T-LYMPHOBLASTISCHE LEUKÄMIE (T-ALL)	15
5. NEUE THERAPIEKONZEPTE	17
6. FRAGESTELLUNG UND ZIELSETZUNG	18
7. EIGENE ARBEITEN	19
7.1 Das Gen <i>BAALC</i> (<i>Brain and acute leukemia, cytoplasmic</i>)	19
7.1.1 <i>BAALC</i> , ein neuer Marker der hämatopoetischen Progenitorzellen	20
7.1.2 Die prognostische Bedeutung der <i>BAALC</i> Expression bei Patienten mit <i>de novo</i> akuter myeloischer Leukämie mit normalem Karyotyp	27
7.1.3 Die prognostische Bedeutung der <i>BAALC</i> Expression und der internen Tandemduplikation von <i>FLT3</i> bei AML Patienten mit normalem Karyotyp	34
7.2 AML mit komplex aberranten Karyotyp	43
7.2.1 Die gesteigerte Expression der Gene <i>APP</i> , <i>ETS2</i> und <i>ERG</i> bei AML mit komplex aberranten Karyotyp und Chromosom 21 Aberration ist auf eine genomische Amplifikation zurückzuführen	44
7.3 <i>ERG</i> - v-ets avian erythroblastosis virus e26 oncogene related gene	51
7.3.1 Bedeutung der <i>ERG</i> Expression in AML	51
7.3.1.1 Eine gesteigerte Expression des ETS Transkriptionsfaktors <i>ERG</i> ist assoziiert mit einer ungünstigen Prognose bei AML mit normalem Karyotyp	52

7.3.2 Bedeutung der <i>ERG</i> Expression bei der T-ALL	62
7.3.2.1 Eine hohe Expression des ETS Transkriptionsfaktors <i>ERG</i> ist assoziiert mit einer ungünstigen Prognose bei erwachsenen Patienten mit akuter T-lymphoblastischer Leukämie	63
7.3.3 Untersuchungen zur <i>ERG</i> und <i>BAALC</i> Expression in T-ALL	71
7.3.3.1 Die niedrige Expression von <i>ERG</i> und <i>BAALC</i> identifiziert eine neue Subgruppe von erwachsenen Patienten mit akuter T-lymphoblastischer Leukämie mit einer sehr günstigen Prognose	72
8. DISKUSSION	80
9. ZUSAMMENFASSUNG	83
10. LITERATURVERZEICHNIS	85
11. DANKSAGUNG	91
12. ERKLÄRUNG	92

1. EINLEITUNG

Die akute myeloische Leukämie (AML) stellt die häufigste myeloische Neoplasie des Erwachsenenalters dar. Diese hämatologische Systemerkrankung entsteht durch eine klonale Vermehrung von myeloischen Vorläuferzellen, die gekennzeichnet sind durch eine Differenzierungsstörung und eine gesteigerte Proliferationsaktivität. Klinisch präsentiert sich die AML als eine sehr heterogene Erkrankung, wobei dieser Heterogenität verschiedene molekulargenetische Veränderungen zu Grunde liegen. Neben zytogenetischen Aberrationen, die bei ca. 55% der AML Patienten nachzuweisen sind und eine Eingruppierung in prognostische Risikogruppen erlauben, können den Alterationen spezifischer Gene pathogenetische und prognostische Bedeutungen zugewiesen werden.

Die akute T-lymphoblastische Leukämie (T-ALL) stellt hingegen eine seltenere Leukämieform des Erwachsenenalters dar. Während in den letzten Jahren zugrunde liegende pathogenetisch relevante Veränderungen der Leukämogenese entschlüsselt werden konnten, sind bisher nur wenige prognostisch bedeutsame molekulare Marker für T-ALL Patienten charakterisiert.

Molekulargenetische Veränderungen mit prognostischer Relevanz, die mit dem Therapieansprechen wie auch dem Langzeitüberleben der Patienten assoziiert werden können, ermöglichen die Zuordnung zu spezifischen Risikogruppen und erlauben so eine Therapieoptimierung durch den Einsatz von risikostratifizierten Behandlungsprotokollen. Neben der prognostischen Wertigkeit der molekularen Marker bieten diese zudem Einblicke in die der Leukämogenese zugrunde liegenden pathogenetischen Mechanismen und bilden potentielle Zielstrukturen für die Entwicklung von neuen spezifischen Substanzen.

2. AKUTE MYELOISCHE LEUKÄMIE (AML)

Die AML geht auf eine klonale Expansion von frühen, unreifen myeloischen Progenitorzellen des Knochenmarks zurück, die charakterisiert sind durch eine abnorme Proliferationskapazität, verminderte Apoptose und eine Differenzierungsblockierung.

2.1 Epidemiologie

Die AML des Erwachsenen weist eine Inzidenz von 3-5/100.000 pro Jahr auf und umfasst damit ca. 3% aller bösartigen Erkrankungen. Das mediane Alter liegt bei 68 Jahren, wobei die altersadaptierte Inzidenz über dem 65. Lebensjahr bei 17/100.000 pro Jahr liegt, im Gegensatz zu lediglich 1.8/100.000 pro Jahr bei unter den 65-Jährigen (Deschler und Lübbert, 2006; NCI - SEERS Datenbank).

Die Ätiologie ist für die Mehrheit der Fälle unbekannt; diese Form der AML wird als *de novo* AML bezeichnet. Davon abzugrenzen sind sekundäre AML, für die spezifische Risikofaktoren für die Entstehung der AML nachgewiesen werden können.

Eine erhöhte Leukämieinzidenz findet man unter anderem nach Strahlenexposition (vor allem ionisierenden Strahlen), Exposition mit Benzol und zytostatischen Medikamenten. Insbesondere wurde durch die Verbesserung der Langzeitüberlebensraten durch den Einsatz von intensivierten Polychemotherapien bei Patienten mit Morbus Hodgkin die Bedeutung der Induktion von Zweitneoplasien und hier vor allem das vermehrte Auftreten von therapieinduzierten AML (t-AML) offensichtlich. Dabei haben alkylierende Substanzen eine wesentliche Bedeutung, wobei eine t-AML nach 2 bis 7 Jahren einer vorangegangenen Chemotherapie mit Alkylanzien auftreten kann. Diese t-AML sind häufig charakterisiert durch die prognostisch ungünstigen zytogenetischen Veränderungen der Monosomie 5, Monosomie 7 und des komplex-aberranten Karyotyps. Nach Exposition mit Topoisomerase-II Inhibitoren kommt es innerhalb eines kürzeren Intervalls (von 1 bis 5 Jahren) ebenfalls gehäuft zu dem Auftreten von t-AML, charakterisiert durch chromosomale Translokationen mit Beteiligung des *MLL* Gens (11q23; Estey und Döhner, 2006).

Darüber hinaus kann es auf dem Boden von hämatologischen Systemerkrankungen wie dem myeloproliferativen Syndrom (MPS) und dem myelodysplastischen Syndrom (MDS) bei einem Teil der Patienten zu einer Transformation in eine sekundäre AML (sAML) kommen (Deschler und Lübbert, 2006).

Während eine genetisch-familiäre Disposition für die akute Leukämie nicht beobachtet wird, zeigt sich eine Assoziation zwischen dem gehäuftem Auftreten einer AML bzw. einer akuten lymphoblastischen Leukämie (ALL) und spezifischen Krankheitssyndromen wie z. B. beim Down Syndrom, Fanconi Anämie, Bloom Syndrom oder Schwachmann Syndrom.

2.2 Klassifikation

Die morphologische Einteilung der AML wurde erstmals 1976 durch die French-American-British-Klassifikation (FAB) eingeführt (Bennett *et al*, 1976). Diese stützt sich auf die Beurteilung der Knochenmarkzytologie mit einer morphologischen und zytochemischen Charakterisierung der Blasten, welche eine Eingruppierung in 8 verschiedene AML Subtypen (AML FAB M0-M7) erlaubt. Den Limitationen bezüglich der klinischen Relevanz sowie der fehlenden Berücksichtigung zugrunde liegender molekularer Veränderungen einzelner Subgruppen wurde durch die aktuelle WHO Klassifikation mit Integration von morphologisch, klinisch und zytogenetisch relevanten Aspekten Rechnung getragen. Des Weiteren wurde zur Abgrenzung vom MDS in Transformation der prozentuale Blastenanteil von 30% (entsprechend der FAB Klassifikation) auf 20% für die Diagnosestellung einer AML festgelegt (Jaffe *et al*, 2001).

Die vier gebildeten Hauptgruppen der WHO Klassifikation umfassen:

1. AML mit spezifischen zytogenetischen Aberrationen
2. AML mit multilineärer Dysplasie
3. therapieinduzierte AML und MDS
4. AML nicht weiter klassifiziert

2.3 Klinisches Krankheitsbild

Das klinische Erscheinungsbild der Patienten mit neu diagnostizierter akuter Leukämie ist geprägt durch die hämatopoetische Insuffizienz des Knochenmarks. Diese resultiert aus einer Suppression der normalen Resthämatopoese durch die Blastenvermehrung im Knochenmark und ist gekennzeichnet durch eine Zytopenie der reifen hämatopoetischen Zellen im peripheren Blut. Neben einer räumlichen Verdrängung der normalen hämatopoetischen Zellen wird die Zytopenie insbesondere durch die Freisetzung von inhibitorischen Zytokinen der leukämischen Blasten im Knochenmark vermittelt (Youn *et al*, 2000).

Das klinische Erscheinungsbild der Blässe, Abgeschlagenheit und Dyspnoe ist auf eine manifeste Anämie, die gesteigerte Blutungsneigung mit petechialen Blutungszeichen auf eine relevante Thrombozytopenie und eine gesteigerte Infektanfälligkeit auf eine absolute Neutropenie zurückzuführen (Löwenberg *et al*, 1999). In seltenen Fällen, insbesondere bei myelomonozytär oder monozytär differenzierten Leukämien kann es zu einer extramedullären Manifestation mit Infiltration von verschiedenen Geweben durch myeloischen Blasten kommen (Byrd *et al*, 1997).

2.4 Diagnosestellung

Die Verdachtsdiagnose einer akuten Leukämie wird in der Regel auf dem Boden von Veränderungen des Blutbildes geäußert mit Nachweis einer Anämie, Thrombozytopenie und einer Leukozytose mit Ausschwemmung von Blasten; bei ca. 20% der Fälle ist eine Leukopenie führend. Die Stellung der Diagnose wird mit Hilfe der morphologischen Beurteilung des Knochenmarkspirates möglich und erfordert den Nachweis von mindestens 20% myeloischer Blasten. Zur Charakterisierung der AML wird die Morphologie komplettiert durch eine erweiterte Diagnostik mittels Immunphänotypisierung, Zytogenetik und Molekulargenetik (Haferlach *et al*, 2007).

2.5 Therapie und Prognose

Durch die Anwendung von verschiedenen Chemotherapieregimen unter Einsatz von Anthrazyklinen und Cytarabin konnte für jüngere Patienten (18-60 Jahre) ein lang anhaltendes, krankheitsfreies Überleben zu einem Anteil von ca. 33% erzielt werden (Löwenberg *et al*, 1999). In den letzten Jahren wurde auf dem Boden von zytogenetischen wie molekularbiologischen Erkenntnissen eine differenzierte Einteilung in prognostisch relevante Subgruppen vorgenommen, welche Patienten mit Heilungsraten von bis zu 70% identifiziert wie auch Patienten mit einer intermediären und einer sehr ungünstigen Prognose (Slovak *et al*, 2000; Grimwade *et al*, 2001). Hiervon lassen sich risikoadaptierte Therapiekonzepte ableiten, die einer Dosisersparung für Patienten mit günstiger Prognose nachgehen und intensiviertere Therapieregime für Patienten mit einem hohen Rezidivrisiko vorsehen. Diese Therapiekonzepte umfassen neben der Durchführung von Induktions- und Konsolidierungstherapien auch den Einsatz der autologen und allogenen Stammzelltransplantation.

Im Vergleich zu jüngeren Patienten (unter dem 60. Lebensjahr) weisen ältere Patienten eine wesentlich ungünstigere Prognose auf. Diese ist auf eine unterschiedliche zugrunde

liegende Biologie der Leukämie, dem gehäuften Vorkommen von sekundären AML und einer erhöhten Komorbidität der Patienten zurückzuführen. Entsprechend benötigen ältere Patienten ein differenziertes therapeutisches Vorgehen in Abhängigkeit von diesen Parametern (Sekeres und Stone, 2002).

2.6 Pathogenetisches Modell

Pathogenetisch liegt der AML eine klonale Vermehrung von unreifen myeloischen Progenitorzellen/Blasten zugrunde, die sich einer normalen Regulation der Differenzierung und Proliferation entzogen haben.

Ein hypothetisches Modell zur Pathogenese der AML beschreibt die Notwendigkeit von zwei verschiedenen genetischen Alterationen („2-Hit Hypothese“; Kelly und Gilliland 2002; Fröhling *et al*, 2005). Dabei führt ein erster genetischer Defekt (Klasse 1) zu einer konstitutiven Aktivierung von membranständigen Rezeptoren wie den Tyrosinkinase *FLT3* und *KIT* und bzw. dem Onkogen *RAS*. Über nachgeschaltete Regulationsmechanismen resultiert diese Aktivierung der Signaltransduktionskaskade in einer autonomen Proliferation und klonalen Expansion der alterierten hämatopoetischen Progenitorzellen. In Mausmodellen konnte gezeigt werden, dass die alleinige genetische Alteration dieser Signaltransduktionswege zwar eine Myeloproliferation induziert, jedoch nicht ausreicht, um eine leukämische Transformation zu initiieren. Ein zweiter genetischer Defekt (Klasse 2), der für sich genommen ebenfalls insuffizient ist, eine AML zu induzieren, führt über die Alteration von relevanten Transkriptionsfaktoren (u. a. *HOX*, *CEBPa*) zu einem Differenzierungsverlust der Zellen. Hingegen kommt es beim gleichzeitigen Auftreten beider Veränderungen zu einer raschen leukämischen Transformation. Diese 2-Hit Hypothese wird unterstützt durch entsprechende Erkenntnisse aus Mausmodellen sowie der Beobachtung, dass Defekte der Klasse 1 und 2 häufig gemeinsam in AML Blasten eines Patienten nachzuweisen sind, während mehrere Alterationen des gleichen Pathways selten gemeinsam in einem Patienten gefunden werden.

Es ist jedoch anzunehmen, dass für die Pathogenese der AML zusätzliche genetische Veränderungen von Bedeutung sind, die weitere Mechanismen wie das „Selfrenewal“, die Apoptose und das „Microenvironment“ betreffen.

3. Zytogenetische und molekulargenetische Veränderungen bei der AML

Zytogenetische Veränderungen können zum Zeitpunkt der Erstdiagnose bei ca. 55% der AML Patienten nachgewiesen werden (Byrd *et al*, 2003), wobei bei der Hälfte der Patienten nur eine Aberration vorkommt und bei 10-15% der Patienten ein komplex-aberranter Karyotyp vorliegt (Mrozek *et al*, 2004). In verschiedenen Studiengruppen konnte gezeigt werden, dass zytogenetische Veränderungen zu den wichtigsten Prognosefaktoren für das Therapieansprechen, das Gesamtüberleben und das krankheitsfreie Überleben zählen (Grimwade *et al*, 1998; Byrd *et al*, 2003). Diese zytogenetisch basierte Einteilung findet aktuell Verwendung in risikostratifizierten Therapiekonzepten.

Die zytogenetische Risikogruppeneinteilung erlaubt eine Einteilung in drei prognostisch relevante Subgruppen (günstig, intermediär, ungünstig) – Tabelle 1.

Chromosomale Aberration	Zytogenetische Risikogruppe
inv(16)(p13q22) / t(16;16)(p13;q22) t(8;21)(q22;q22) t(15;17)(q22;q12-21)	günstig
keine (normaler Karyotyp) -Y del(7q); del(9q); del(11q); del(20q) isolitierte +8; +11; +13; +21; t(9;11)(p22;q23)	intermediär
komplexer Karyotyp mit = 3 Veränderungen inv(3)(q21q26) / t(3;3)(q21;q26) -7 del(5q); -5; t(6;9)(p23;q34); t(6;11)(q27;q23); t(11;19)(q23;p13.1)	ungünstig

Tabelle 1:
Zytogenetisch basierte Risikogruppeneinteilung der AML

Fettgedruckte Veränderungen sind übereinstimmend in verschiedenen Studiengruppen; für die übrigen Veränderungen wird eine unterschiedliche Eingruppierung in den Studien vorgenommen (in Anlehnung an Mrozek *et al*, 2007a).

Darüber hinaus konnten vor allem durch die nähere Charakterisierung von chromosomalen Aberrationen molekulargenetische Mechanismen, die für die Pathogenese der AML von Bedeutung sind, entschlüsselt werden (Look, 1997). Diese molekularen Erkenntnisse erlaubten im Weiteren die Entwicklung gezielter therapeutischer Substanzen, wie z. B.: All-trans Retinoic-Acid bei der Promyelozyten-Leukämie (APL; Fenaux *et al*, 1993), STI571 bei

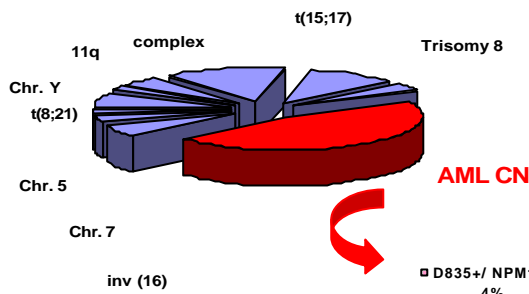
der Philadelphia-Chromosom positiven chronisch myeloischen Leukämie (CML; Drucker *et al*, 2001) und bei der Philadelphia-Chromosom positiven B-lymphatischen Leukämie (B-ALL; Wassmann *et al*, 2004). In den letzten Jahren konnte die molekulare Charakterisierung bei der AML weiter vorangetrieben werden (Mrozek *et al*, 2007b), die insbesondere die Identifizierung von bisher unbekanntem genetischen Veränderungen bei AML Patienten mit normalem Karyotyp offen legten.

3.1 AML mit normalem Karyotyp

Die AML mit normalem Karyotyp umfasst die größte zytogenetisch definierte Subgruppe und schließt ca. 45% der AML Patienten ein (Mrozek *et al*, 2001). Zwar werden diese Patienten in der intermediären Risikogruppe zusammengeschlossen, sie umfassen jedoch ein klinisch sehr heterogenes Patientenkollektiv mit Langzeitüberlebenden sowie Patienten mit einem nur sehr kurzen rezidivfreien Überleben und Gesamtüberleben (Bloomfield *et al*, 1998; Grimwade *et al*, 1998; Flashove *et al*, 2000). Für diese Gruppe der AML Patienten ist die Identifizierung von prognostisch relevanten molekulargenetischen Risikofaktoren von wesentlicher Bedeutung, um eine verbesserte risikoadaptierte Behandlung zu ermöglichen.

In den letzten Jahren wurden verschiedene molekulargenetische Veränderungen entschlüsselt, die für die klinische Heterogenität der AML mit normalem Karyotyp verantwortlich gemacht werden. Eine prognostische Relevanz wurde unter anderem den Mutationen von Genen, die an Signaltransduktionspathways beteiligt sind (z. B. das *FLT3* Gen), sowie Mutationen von Transkriptionsfaktoren, die für hämatopoetische Differenzierungsvorgänge relevant sind (z. B. das *CEBPalpha* Gen), zugeschrieben (Abbildung 1). Darüber hinaus konnte die prognostische Bedeutung einer aberranten mRNA Expression von einzelnen spezifischen Genen (*BAALC*, *ERG*, *MN1*) dargelegt werden (Baldus *et al*, 2007a). In genomweiten, globalen Genexpressionsstudien wurde zudem die prognostische Relevanz von spezifischen Expressionsprofilen beschrieben (Bullinger *et al*, 2004; Valk *et al*, 2004).

A



B

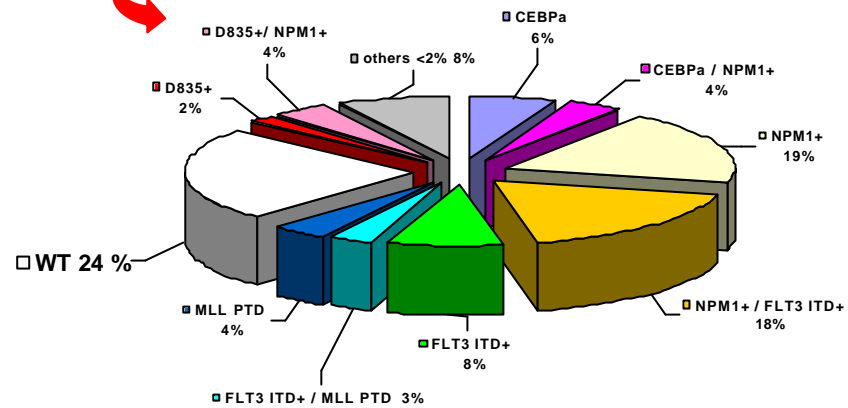


Abbildung 1:

Zytogenetisch und molekulargenetisch definierte Subgruppeneinteilung der AML

A: Einteilung der AML in zytogenetische Subgruppen. **B:** Unterteilung der AML Subgruppe mit normalem Karyotyp (AML CN) in molekulargenetisch charakterisierte Untergruppen basierend auf Mutationsanalysen. Weitere Subgruppen, die auf dem Boden einer aberranten Genexpression charakterisiert wurden, sind nicht dargestellt (in Anlehnung an Baldus *et al*, 2007a).

Neben der prognostischen Relevanz dieser molekularen Marker mit Integration in risikostratifizierte Therapiekonzepte erlaubt die Entschlüsselung von pathogenetisch relevanten Regulationsmechanismen die Entwicklung von zielgerichteten molekularen Therapien.

3.1.1 Genetische Alterationen mit prognostischer Relevanz bei AML mit normalem Karyotyp

Prognostisch relevante Genalterationen, die für die AML mit normalem Karyotyp eine Rolle spielen, werden nachfolgend dargestellt (Baldus *et al*, 2007a; Tabelle 2).

FLT3 (Fms-related tyrosine kinase 3): Das *FLT3* Gen, lokalisiert auf Chromosom 13q12, kodiert einen membrangebundenen Tyrosinkinase-Rezeptor, der involviert ist in die Regulation von Proliferation, Differenzierung und Apoptose hämatopoetischer Vorläuferzellen. Eine interne Tandemduplikation (ITD) des *FLT3* Gens ist eine der häufigsten Mutationen bei AML Patienten mit normalem Karyotyp (ca. 28-33%) und kennzeichnet Patienten mit einer ungünstigen Prognose (Whitman *et al*, 2001; Fröhling *et al*, 2002; Thiede *et al*, 2002).

Das aktivierte FLT3 Protein stellt ein sehr gutes Zielmolekül für den Einsatz von Tyrosinkinase-Inhibitoren dar (wie z. B. PKC412, Lestaurtinib, Tandutinib), welche bereits in klinischen Studien erfolgsversprechende Ergebnisse vorweisen konnten (Fiedler *et al*, 2003; Giles *et al*, 2003; Smith *et al*, 2004; DeAngelo *et al*, 2006).

NPM1 (Nucleophosmin1): Das *NPM1* Gen, lokalisiert auf Chromosom 5q35, kodiert ein Nukleus-Zytoplasma-Transporterprotein. Dieses multifunktionale Protein ist in der Regulation von ribosomalen Proteinen, der Initiation der Zentrosomen Duplikation und der *p53* und *ARF* Tumorsuppressor abhängigen Regulationsmechanismen involviert (Falini *et al*, 2005; Grisendi *et al*, 2006). *NPM1* Mutationen können bei etwa 53% der AML Patienten mit normalem Karyotyp nachgewiesen werden und charakterisieren Patienten mit einer günstigen Prognose (Schnittger *et al*, 2005). Insbesondere ist der *NPM1* mutierte / *FLT3*-Wildtyp Status mit einer günstigen Prognose assoziiert (Döhner *et al*, 2005; Thiede *et al*, 2006).

MLL (Mixed lineage leukemia): Das *MLL* Gen (Chromosom 11q23) ist ein Regulator der *HOX* Genexpression und besitzt darüber hinaus eine Histonmethyltransferaseaktivität. Eine partielle Tandemduplikation (PTD) der Exons 5 bis 11 kann bei ca. 8% der erwachsenen Patienten mit *de novo* AML und normalem Karyotyp nachgewiesen werden (Caligiuri *et al*, 1996; Schnittger *et al*, 2000; Döhner *et al*, 2002). Die *MLL* PTD war die erste molekulargenetische Veränderung, die bei AML Patienten mit normalem Karyotyp identifiziert und mit einer ungünstigen Prognose assoziiert wurde (Bloomfield *et al*, 2006).

C/EBPa (CCAAT Enhancer Binding Protein Alpha): C/EBPa stellt einen wesentlichen hämatopoetischen Transkriptionsfaktor dar, der vor allem in der Differenzierungsregulation der Granulopoese involviert ist (Pabst *et al*, 2001). Mutationen von C/EBPa treten bei ca. 15% der AML Patienten mit normalem Karyotyp auf (Fröhling *et al*, 2004; Bienz *et al*, 2005; Boissel *et al*, 2005) und konnten mit einer günstigen Prognose korreliert werden.

MN1 (Meningioma 1): Das MN1 Gen, lokalisiert auf Chromosom 22q11, wurde auf dem Boden der t(4;22)(p16;q11) Translokation bei einem Meningiom identifiziert. Eine aberrante MN1 Expression konnte bei AML Patienten mit einer erhöhten Rezidivrate und einem verkürzten Überleben assoziiert werden (Heuser *et al*, 2006).

MOLEKULARE ALTERATION	PROGNOSTISCHE BEDEUTUNG	% - ANTEIL
FLT3 Internal tandem duplication (ITD)	kürzeres Überleben für FLT3-ITD+ Patienten	30%
NPM1 Mutation	verlängertes Überleben für Patienten mit NPM1 Mutation	53%
NPM1 Mutation & FLT3 ITD	verlängertes Überleben für Patienten mit NPM1 Mutation/FLT3 Wildtyp	45%
MLL Partial tandem duplication (PTD)	kürzer anhaltende Remission für MLL PTD+ Patienten	9%
CEBPA Mutation	verlängertes Überleben für Patienten mit CEBPA Mutation	15%
MN1 Expression	kürzeres Überleben für Patienten mit hoher MN1 Expression	50%
BAALC Expression	kürzeres Überleben für Patienten mit hoher BAALC Expression	50%
ERG Expression	kürzeres Überleben für Patienten mit hoher ERG Expression	25%

Tabelle 2:

Prognostisch relevante Genalterationen bei AML mit normalem Karyotyp

Der prozentuale Anteil der einzelnen Subgruppen ist bezogen auf die Gesamtkohorte der AML mit normalem Karyotyp.

Die Bedeutung der Gene BAALC (*Brain And Acute Leukemia, Cytoplasmic*) und ERG in der normalen Hämatopoese und die prognostische Bedeutung bei der akuten Leukämie wird im Rahmen der eigenen Arbeiten näher erläutert.

4. Akute T-lymphoblastische Leukämie (T-ALL)

Die T-ALL stellt eine seltene Form der akuten Leukämie im Erwachsenenalter dar und umfasst ca. 25% der erwachsenen ALL (Hoelzer *et al*, 2002). Pathogenetisch ist die T-ALL auf eine klonale Expansion transformierter T-lymphatischer Vorläuferzellen zurückzuführen.

Klinisch präsentiert sich die T-ALL in dem überwiegenden Anteil der Patienten mit einer hohen Leukozytenzahl; zudem weist ein Teil der Patienten bei Erstdiagnose eine Beteiligung des zentralen Nervensystems sowie eine mediastinale Raumforderung auf. Die Heterogenität der Erkrankung lässt sich zudem am klinischen Verlauf ablesen. Prognostisch relevante Risikofaktoren umfassen in erster Linie klinische Merkmale wie eine hohe Leukozytenzahl und den Immunphänotyp (Yanada *et al*, 2006; Vitale *et al*, 2006).

Während in den letzten Jahren das Überleben von Kindern mit T-ALL wesentlich verbessert wurde und Überlebensraten von bis zu 80% (Breit *et al*, 2006) erzielt werden konnten, betragen die Langzeitüberlebensraten bei der T-ALL im Erwachsenenalter lediglich 30-40% (für die unter 60-jährigen Patienten; Thomas *et al*, 2004).

In molekularbiologischen Untersuchungen wurden in den letzten Jahren Schlüsselgene identifiziert, die einen wesentlichen Beitrag für die Leukämogenese der T-ALL leisten. Dabei ist die leukämische Transformation der T-lymphatischen Vorläuferzellen auf eine multifaktorielle Mutagenese zurückzuführen, die die Abfolge unterschiedlicher genetischer Alterationen umfasst. Ausgehend von der molekularen Charakterisierung von chromosomalen Translokationen konnten pathogenetische Mechanismen entschlüsselt werden. Gene, die in diese Translokationen involviert sind, umfassen Gene, die in der normalen embryonalen Entwicklung von wesentlicher Bedeutung sind, vor allem *HOX* (*Homeobox*) Gene. Eine Alteration dieser Gene führt zur Dysregulation von zellulären Proliferations- und Differenzierungsvorgängen der hämatopoetischen Vorläuferzellen. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass unabhängig von chromosomalen Aberrationen eine aberrante Expression dieser spezifischen Gene eine leukämische Transformation induzieren kann (Ferrando *et al*, 2002).

Gene, die einen wesentlichen Beitrag in der Pathogenese der T-ALL leisten, umfassen das Onkogen *MYC*, Gene des *HOXA* Clusters und die Gene *HOX11*, *HOX11L2*, *TAL1*, *TAL2*, *LYL1*, *LMO1* und *LMO2*.

Darüber hinaus konnte das *NOTCH1* Gen, welches als Fusionsgen in der seltenen Translokation t(7;9) beteiligt ist, als ein wichtiger Regulator der T-Zell-Differenzierung identifiziert werden (Ellisen *et al*, 1991). Interessanterweise wurden Mutationen von *NOTCH1* bei über 50% der kindlichen T-ALL Patienten nachgewiesen. Hierbei handelt es sich um aktivierende Mutationen, welche zu einer autonomen Stimulation der *NOTCH1* abhängigen Regulationskaskade führen (Weng *et al*, 2004).

Während diese genetischen Alterationen zum Verständnis der Pathogenese der T-ALL einen wesentlichen Betrag leisten, konnte eine prognostische Relevanz nur wenigen dieser molekularen Marker zugeschrieben werden. So lassen sich bisher molekulargenetisch definierte Risikogruppen, die für eine Therapieoptimierung im Sinne einer Risikostratifizierung herangezogen werden könnten, nur bedingt von diesen Erkenntnissen ableiten. Auf Grund der klinischen Heterogenität der T-ALL ist jedoch anzunehmen, dass spezifische genetische Veränderungen mit prognostischer Relevanz der T-ALL zu Grunde liegen.

5. Neue Therapiekonzepte

Basierend auf den molekulargenetischen Veränderungen, die der Leukämie pathogenetisch zugrunde liegen und mit einer Alteration des Proliferations- und Differenzierungsverhaltens assoziiert werden, wurden neue Substanzen zur spezifischen Modulation dieser Regulationsmechanismen entwickelt und bereits in klinischen Studien eingesetzt. Insbesondere wird durch die Kombination dieser neuen Substanzen mit konventionellen Zytostatika eine Therapieoptimierung angestrebt.

Epigenetische Veränderungen wie Hypermethylierung und Histondeacetylierung, die zu einer alterierten Genregulation in leukämischen Blasten führen, können durch den Einsatz von Methyltransferaseinhibitoren und Histondeacetylaseinhibitoren moduliert werden. Dabei wurde für diese Substanzen nachgewiesen, dass sie Einfluss auf die zelluläre Proliferations- und Differenzierungsregulation von hämatopoetischen Zellen nehmen. Der erfolgreiche Einsatz dieser Substanzen zeigt sich bereits im Rahmen von klinischen Studien zur Behandlung der AML (Kuendgen *et al*, 2006).

Substanzen, die gegen spezifische zelluläre Zielstrukturen der leukämischen Blasten gerichtet sind, umfassen Inhibitoren von aktivierten Tyrosinkinasen. Diese Tyrosinkinaseinhibitoren richten sich hierbei gegen die durch Mutation oder Überexpression alterierten Zielmoleküle und blockieren die so konstitutiv aktivierten Signaltransduktionskaskaden. Verschiedene Substanzen, die sich gegen die Tyrosinkinasen cKIT und FLT3 richten, sowie Farnesyltransferase Inhibitoren zur RAS Inhibition sind in klinischer Erprobung (Bernasconi *et al*, 2004).

Des Weiteren werden antikörperbasierte Therapien, die gegen spezifische und hoch exprimierte Zielmoleküle der leukämischen Blasten gerichtet sind (z. B. CD33), verfolgt, ebenso wie die Modulation von Resistenzmechanismen (MDR-1, BCL2; Tallmann *et al* 2005). Der *NOTCH1* Pathway stellt zudem für die T-ALL eine interessante Zielstruktur dar. Da sich aktivierende *NOTCH1* Mutationen bei einem Grossteil der T-ALL Patienten nachweisen lassen, wird der Einsatz von Y-Sekretaseinhibitoren zur Inhibition der *NOTCH1* abhängigen Signaltransduktion in Studien geprüft (Shih *et al*, 2007).

Von besonderem Interesse für die Entwicklung von weiteren spezifischen Substanzen sind molekulare Marker mit prognostischer Relevanz, da durch deren therapeutische Modulation ein verbessertes Therapieansprechen für spezifische Risikogruppen anzunehmen ist.

6. Fragestellung und Zielsetzung

Im Mittelpunkt der Arbeiten steht die Identifikation und Charakterisierung von neuen molekularen Markern bei der akuten Leukämie. Hierbei sind die AML mit normalem Karyotyp und die T-ALL von besonderem Interesse, da für beide Leukämieformen keine zytogenetischen Aberrationen mit prognostischer Relevanz für eine Risikostratifizierung zur Verfügung stehen und bisher für diese Patienten nur wenige molekulare Marker mit prognostischer Wertigkeit charakterisiert werden konnten. Darüber hinaus erlaubt die Entschlüsselung des Zusammenspiels der relevanten Gene, Einblicke in die Leukämogenese zu geben.

Durch jeweils verschiedene molekulargenetische Ansätze konnten die beiden Kandidatengene *BAALC* und *ERG* identifiziert werden. Auf Grund der spezifischen Genexpression in der normalen Hämatopoese und der differentiellen Expression bei Leukämien stellte sich die Frage nach der Bedeutung und der prognostischen Relevanz einer aberranten Genexpression von *BAALC* und *ERG* bei akuten Leukämien. Entsprechend wurde in klinischen Studien die prognostische Relevanz dieser beiden Gene für AML Patienten mit normalem Karyotyp untersucht. Insbesondere wurde der Frage nachgegangen, inwieweit diese prognostisch relevanten molekularen Marker für risikostratifizierte Therapiekonzepte herangezogen werden können.

Auf Grund der sehr spezifischen Expression von *ERG* während der frühen T-Zell Differenzierung im Rahmen der normalen Hämatopoese untersuchten wir die Bedeutung von *ERG* bei der T-ALL. Die prognostische Relevanz einer aberrant gesteigerten *ERG* Expression sollte hier bei neu diagnostizierten T-ALL Patienten untersucht und in Bezug zu klinischen wie auch molekularen Merkmalen gesetzt werden. Die Ähnlichkeiten im Expressionsmuster von *BAALC* und *ERG* während der normalen hämatopoetischen Differenzierung, aber auch das ähnliche Expressionsprofil bei akuten Leukämien legte die Frage nahe, inwieweit neben der *ERG* auch die *BAALC* Expression von prognostischer Relevanz für die T-ALL sein würde. Die kombinierte Analyse der Genexpression von *BAALC* und *ERG*, beide Marker einer frühen stammzellnahen Leukämie, könnte so eine spezifischere Risikogruppeneinteilung ermöglichen.

Über die Identifikation von neuen Risikofaktoren hinaus erlauben die Untersuchungen von Kandidatengenen Einblicke in pathogenetisch relevante Pathways und bieten somit die Option, neue therapeutische Zielstrukturen offen zu legen.

7. Eigene Arbeiten

Die Gene *BAALC* und *ERG* werden im Folgenden auf dem Boden der eigenen Arbeiten dargestellt und ihre prognostische Bedeutung für die AML und die T-ALL ausgeführt.

7.1 Das Gen *BAALC* (*Brain and acute leukemia, cytoplasmic*)

Auf der Suche nach bisher unbekannt Genen, die für die AML von Bedeutung sind, wurde das Gen *BAALC*, lokalisiert auf Chromosom 8q23, im Jahr 2001 kloniert und die Expression weiter charakterisiert (Tanner *et al*, 2001). Eine hohe *BAALC* mRNA Expression konnte vor allem bei AML Patienten mit einer Trisomie 8 nachgewiesen werden, jedoch zeigte sich eine gesteigerte Expression auch bei einem Teil der AML Patienten mit normalem Karyotyp. Während bei einer Subgruppe von Patienten mit ALL eine gesteigerte *BAALC* Expression nachzuweisen war, wiesen die reiferen chronischen Leukämieformen der CML und chronisch lymphatischen Leukämie (CLL) keine *BAALC* Expression auf.

Die Bedeutung von *BAALC* im Rahmen der Hämatopoese und Leukämogenese ist bisher nur wenig untersucht. Auf Grund der fehlenden Homologie der Proteinsequenz zu bekannten funktionellen Domänen ist eine Zuordnung der mechanistischen Bedeutung von *BAALC* erschwert, so dass die Schlüsselfunktion von *BAALC* und die Auswirkungen der aberranten Expression bei der akuten Leukämie zu untersuchen bleiben.

Nachfolgend wurde gezeigt, dass *BAALC* in der normalen Hämatopoese einen neuen molekularen Marker der frühen hämatopoetischen Progenitorzellen darstellt und im Rahmen der zellulären Differenzierung spezifisch herunterreguliert wird (Baldus *et al*, 2003a).

Für Patienten mit AML mit normalem Karyotyp konnte die prognostische Relevanz einer gesteigerten *BAALC* Expression erstmals charakterisiert (Baldus *et al*, 2003b) und in einer zweiten unabhängigen Studie verifiziert werden (Baldus *et al*, 2006a).

7.1.1 *BAALC*, ein neuer Marker der hämatopoetischen Progenitorzellen

(Baldus CD, Tanner SM, Kusewitt D, Liyanarachchi S, Choi C, Caligiuri MA, Bloomfield CD, de la Chapelle A. *BAALC*, a novel marker of human hematopoietic progenitor cells. *Experimental Hematology*. 2003a;31:1051-1056)

Das Gen *BAALC* zeichnet sich durch eine hohe mRNA Expression bei einem Teil der Patienten mit akuter Leukämie aus. Um die bisher unbekannte Bedeutung von *BAALC* im Rahmen der normalen Hämatopoese und Leukämogenese weiter zu untersuchen, wurde die *BAALC* Expression in verschiedenen Subpopulationen hämatopoetischer Progenitorzellen sowie während der hämatopoetischen Differenzierung untersucht. Mittels quantitativer real-time RT-PCR konnte gezeigt werden, dass *BAALC* eine sehr hohe Expression in CD34 positiven Zellen des Knochenmarkes und des peripheren Blutes von gesunden Probanden aufweist. Expressionsstudien der mittels FACS selektierten Zellpopulationen zeigten hohe *BAALC* Expressionswerte in allen untersuchten CD34 positiven Zellfraktionen, einschließlich der unreifen CD34⁺/CD38⁻, der myeloischen CD34⁺/CD33⁺, der B-lymphatischen CD34⁺/CD19⁺/CD10⁺, der T-lymphatischen CD34⁺/CD7⁺ und der erythroiden CD34⁺/CD71⁺/CD45⁻ Vorläuferzellen. Die *BAALC* Expression der korrespondierenden CD34 negativen Zellpopulationen war signifikant niedriger. Während einer *in vitro* Differenzierung von CD34 positiven Knochenmarkzellen zeigte sich eine Herunterregulation der *BAALC* und *CD34* Transkripte ab dem Tag 4 der Suspensionskulturen unter dem Zusatz von linienspezifischen Zytokinen (G-CSF, M-CSF, EPO). Ohne den Zusatz dieser linienspezifischen Zytokine (d. h. nur mit Zugabe von IL-3, SCF, GM-CSF) konnten *BAALC* Transkripte bis zum Tag 20 nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse unterstreichen die auf das Progenitorzellkompartiment beschränkte *BAALC* Expression und die Herunterregulation mit Einsetzung der Zelldifferenzierung. Zusammenfassend deuten die Daten darauf hin, dass *BAALC* einen neuen molekularen Marker der frühen Progenitorzellen einschließlich der myeloischen, lymphatischen und erythroiden Ziellinien darstellt.

7.1.2 Die prognostische Bedeutung der *BAALC* Expression bei Patienten mit *de novo* akuter myeloischer Leukämie mit normalem Karyotyp

(Baldus CD, Tanner SM, Ruppert AS, Whitman SP, Archer KJ, Marcucci G, Caligiuri MA, Carroll AJ, Vardiman JW, Powell BL, Allen SL, Moore JO, Larson RA, Kolitz JE, de la Chapelle A, Bloomfield CD. *BAALC* expression predicts clinical outcome of *de novo* acute myeloid leukemia patients with normal cytogenetics: a Cancer and Leukemia Group B Study. *Blood*. 2003b;102:1613-1618)

Zytogenetische Veränderungen sind von prognostischer Bedeutung für Patienten mit AML. Für die Patientengruppe mit einem normalen Karyotyp (ca. 45% der erwachsenen Patienten mit *de novo* AML) ist die Identifikation von molekularen Markern mit prognostischer Relevanz wesentlich, um eine verbesserte Therapiestratifikation zu ermöglichen. Auf diesem Hintergrund wurde die prognostische Bedeutung von *BAALC* bei 86 Patienten mit neu diagnostizierter *de novo* AML und normalem Karyotyp, die innerhalb des Cancer and Leukemia Group B Therapieprotokolls 9621 behandelt worden waren, untersucht. Die *BAALC* Expression wurde mittels einer quantitativen real-time RT-PCR in diagnostischen Blutproben analysiert. Die Patienten wurden auf dem Boden der medianen *BAALC* Expression in eine Gruppe mit niedriger (low *BAALC*) und hoher *BAALC* (high *BAALC*) Expression eingeteilt. Patienten der low *BAALC* Gruppe zeigten höhere Leukozytenzahlen ($P=0.03$) und überwiegend eine FAB M5 Morphologie ($P=0.007$). Im Vergleich zu der low *BAALC* Gruppe wiesen Patienten mit einer hohen *BAALC* Expression ein signifikant verkürztes Gesamtüberleben (OS; Median: 1.7 versus 5.8 Jahre, $P=0.02$), ereignisfreies Überleben (EFS; Median: 0.8 versus 4.9 Jahre, $P=0.03$) und krankheitsfreies Überleben (DFS; Median: 1.4 versus 7.3 Jahre, $P=0.03$) auf. Die multivariate Analyse bestätigte eine hohe *BAALC* Expression als einen unabhängigen Risikofaktor, der mit einem signifikant erhöhten relativen Risiko (HR) für das Eintreten eines Rezidives und/oder des Todes (HR für OS: 2.7; HR für EFS: 2.6, HR für DFS: 2.2) assoziiert war. Zusammenfassend lässt sich hieraus ableiten, dass eine hohe *BAALC* Expression einen neuen Risikofaktor bei der AML mit normalem Karyotyp darstellt.

7.1.3 Die prognostische Bedeutung der *BAALC* Expression und der internen Tandemduplikation von *FLT3* bei AML Patienten mit normalem Karyotyp

(Baldus CD, Thiede C, Soucek S, Bloomfield CD, Thiel E, Ehninger G. *BAALC* expression and *FLT3* internal tandem duplication mutations in acute myeloid leukemia patients with normal cytogenetics: prognostic implications. J Clin Oncol. 2006a;24:790-797)

Das Ziel dieser Untersuchung war es, die prognostische Bedeutung der *BAALC* Expression und der internen Tandemduplikation (ITD) des *FLT3* Gens bei AML Patienten mit normalem Karyotyp in einer unabhängigen und größeren Patientenkohorte zu untersuchen. Hierzu wurde die *BAALC* Expression mittels real-time RT-PCR in diagnostischen Blutproben von 307 erwachsenen Patienten (= 60 Jahre) mit AML und einem normalem Karyotyp analysiert. Patienten wurden für die statistischen Auswertungen entsprechend der medianen *BAALC* Expression in eine niedrige und eine hohe *BAALC* Gruppe eingeteilt. Das Verhältnis des mutierten Allels zum Wildtyp-Allel des *FLT3* Gens (*FLT3* ITD mutant-wildtype-ratio) wurde mittels der Genescan Analyse bestimmt. Patienten mit hoher *BAALC* Expression wiesen im Vergleich zu Patienten mit niedriger *BAALC* Expression eine niedrigere Rate an kompletten Remissionen (62% versus 73%; $P=0.038$) und eine höhere Rate einer primär therapierefraktären Erkrankung auf (16% versus 6%; $P=0.006$). Eine hohe *BAALC* Expression war zudem assoziiert mit einer höheren kumulativen Rezidivinzidenz (CIR, $P=0.018$) und einem verkürzten Gesamtüberleben (OS, 3-Jahres OS: 36% versus 54%; $P=0.001$). In der multivariablen Analyse erwies sich eine hohe *BAALC* Expression als ein unabhängiger Faktor für eine primär therapierefraktäre Erkrankung ($P=0.019$). Zudem waren eine hohe *BAALC* Expression und eine hohe *FLT3* ITD mutant-wild-type-ratio die einzigen Faktoren, die eine erhöhte kumulative Rezidivwahrscheinlichkeit (CIR; *BAALC*: $P=0.0096$; *FLT3* $P=0.002$) und ein verkürztes OS vorhersagten (*BAALC*: $P=0.001$; *FLT3*: $P=0.012$). Der Einsatz einer autologen Stammzelltransplantation besaß in Abhängigkeit von der *BAALC* Expression keinen Einfluss auf die Prognose. Im Gegensatz dazu zeigte sich für Patienten, die einer allogenen Stammzelltransplantation unterzogen wurden, eine niedrige 3-Jahres CIR, welche vergleichbar war für Patienten mit hoher *BAALC* bzw. niedriger *BAALC* Expression (16% versus 14%). Diese Studie unterstreicht die Wertigkeit der *BAALC* Expression als einen der wichtigsten Prognosefaktoren für AML Patienten mit normalem Karyotyp. Entsprechend sollte die *BAALC* Expression und der *FLT3* Mutationsstatus für die Therapiestratifizierung der Induktions- und Postremissionstherapie herangezogen werden.

7.2 AML mit komplex aberranten Karyotyp

Die molekulargenetischen Veränderungen, die der AML mit komplex-aberranten Karyotyp zugrunde liegen, sind bisher nur wenig untersucht. Klinisch zeichnen sich AML Patienten mit einem komplexen Karyotyp durch eine sehr ungünstige Prognose aus (Byrd *et al*, 2003). Die Identifizierung von molekularen Regulationsmechanismen, die bei dieser AML Subgruppe alteriert sind, ist für das Verständnis der Leukämogenese und für eine risikoadaptierte Therapiestratifizierung wesentlich. Molekulargenetische Aberrationen können zudem als potentielle therapeutische Angriffspunkte von wesentlicher Bedeutung sein.

Zur detaillierten molekulargenetischen Charakterisierung auf DNA und RNA Ebene kommen Technologien wie Spectral Karyotyping (SKY), Comparative Genomic Hybridization (CGH) und Mikroarray basierte Genexpressionsanalysen zum Einsatz. Im Rahmen einer SKY basierten Untersuchung bei AML mit komplex-aberrantem Karyotyp konnte eine Überrepräsentation von Chromosom 21 nachgewiesen werden (Mrozek *et al*, 2002). In unabhängigen Untersuchungen wurden zudem ähnliche Beobachtungen verzeichnet (Hilgenfeld *et al*, 2001; Schoch *et al*, 2002; Van Limbergen *et al*, 2002).

Die Amplifikation von genomischer DNA resultiert üblicherweise in einer gesteigerten Expression der beteiligten Gene; dieses ist vor allem bei der Beteiligung von Onkogenen von großem Interesse ist. Für die Leukämogenese scheint die Amplifikation der Gene *MYC* (lokalisiert: 8q24.12) und *MLL* (lokalisiert: 11q23) von besonderer Bedeutung zu sein (Kim *et al*, 2001). Dagegen ist die Überrepräsentation von Genen, die auf dem Chromosom 21 lokalisiert sind, bisher nur wenig untersucht.

7.2.1 Die gesteigerte Expression der Gene *APP*, *ETS2* und *ERG* bei AML mit komplex aberranten Karyotyp und Chromosom 21 Aberration ist auf eine genomische Amplifikation zurückzuführen

(**Baldus CD**, Liyanarachchi S, Mrozek K, Auer H, Tanner SM, Guimond M, Ruppert AS, Mohamed N, Davuluri RV, Caligiuri MA, Bloomfield CD, de la Chapelle A. Acute myeloid leukemia with complex karyotypes and abnormal chromosome 21: Amplification discloses overexpression of *APP*, *ETS2*, and *ERG* genes. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004;101:3915-3920)

Die molekulargenetischen Mechanismen der Leukämogenese konnten durch die Charakterisierung der Gene, die innerhalb von chromosomalen Aberrationen (insbesondere reziproke Translokationen und Inversionen) beteiligt sind, offen gelegt werden. Im Gegensatz dazu gibt es nur limitierte Erkenntnisse über Gene, die im Rahmen von komplex-aberranten chromosomalen Veränderungen alteriert sind. Wir untersuchten genetische Veränderungen bei AML Patienten mit komplex aberranten Karyotyp und alteriertem Chromosom 21 mittels einer BAC Array basierten, vergleichenden genomischen Hybridisierung zur hochauflösenden Kartierung des Chromosoms 21. Es konnten Amplifikationen überwiegend in den Regionen entschlüsselt werden, die das Gen *APP* (26.3 MB) und die ETS Transkriptionsfaktoren *ERG* und *ETS2* (Position 38.7-39.1 MB) einschlossen. Mittels globaler Genexpressionsanalysen wurde *APP* als eines der am höchsten exprimierten Gene (im Mittel: 19.74-fach; P=0.0003; verglichen zu der Kontrollgruppe von AML mit normalem Karyotyp) identifiziert. *ERG* und *ETS2* waren ebenfalls unter den am höchsten exprimierten Chromosom 21 Genen. Die gesteigerte Expression von *APP* und *ETS2* korrelierte mit dem Grad der genomischen Amplifikation. Für das Gen *APP* konnte darüber hinaus eine gesteigerte Expression auch in einer Subpopulation von AML Patienten mit normalem Karyotyp nachgewiesen werden (in 10 der 64 Proben, 16%). Das *APP* Gen kodiert ein Glykoprotein mit unbekannter Funktion, welches bei der Alzheimer Erkrankung von Bedeutung ist, aber bisher nicht in Zusammenhang mit der AML gebracht wurde. Es wird die Hypothese aufgestellt, dass *APP* und die Transkriptionsfaktoren *ERG* und *ETS2* in noch unbekanntem molekularen Mechanismen der Leukämogenese involviert sind. Die Ergebnisse unterstreichen die Bedeutung der molekularen Charakterisierung von komplex aberranten Veränderungen bei der AML.

7.3 *ERG* - v-ets avian erythroblastosis virus e26 oncogene related gene

Die Alteration von Transkriptionsfaktoren, die Einfluss auf die Proliferations-, Differenzierungs- und Apoptoseregulation nehmen, kann maßgebliche Auswirkungen auf zelluläre Regulationsvorgänge haben. Der ETS Transkriptionsfaktor *ERG* ist an der Regulation der linienspezifischen Differenzierung von hämatopoetischen Progenitorzellen, insbesondere von lymphatischen Vorläuferzellen beteiligt. Darüber hinaus wurde eine hohe *ERG* Expression in T-lymphatischen, endothelialen und myeloischen Vorläuferzellen nachgewiesen. Die pathogenetische Bedeutung von *ERG* in der Kanzerogenese und Leukämogenese wird durch die Beteiligung von *ERG* im Rahmen von verschiedenen krankheitsspezifischen chromosomalen Translokationen unterstrichen:

Ewing Sarkom	t(21;22)(q22;q12)	<i>EWS/ERG</i>	(Sorensen <i>et al</i>, 1994)
Ewing Sarkom	t(16;21)(p11;q22)	<i>FUS/ERG</i>	(Shing <i>et al</i>, 2003)
Prostata Karzinom	t(21;21)(q22.2)	<i>TMPRSS2/ERG</i>	(Tomlins <i>et al</i>, 2005)
AML	t(16;21)(p11;q22)	<i>FUS/ERG</i>	(Kong <i>et al</i>, 1997)
AML	t(X;21)(q25-26;q22)	<i>ELF4/ERG</i>	(Moore <i>et al</i>, 2006).

In *in-vitro* Studien konnten das onkogene Potential und eine Apoptose-Inhibition von *ERG* und dem Fusionsprotein FUS-ERG nachweisen (Hart *et al*, 1995). Die Bedeutung von *ERG* in der Differenzierungsregulation der Myelopoese wird unterstrichen durch die Induktion seiner Expression im Rahmen der megakaryozytären Differenzierung und die Beobachtung, dass eine forcierte *ERG* Expression einen Phänotypwandel von der Erythropoese zur Megakaryopoese bedingt (Rainis *et al*, 2005). Dies könnte erklären, warum bei Patienten mit Down Syndrom (Trisomie 21 - Überrepräsentation von *ERG*) gehäuft Leukämien mit megakaryozytärer Differenzierung auftreten.

7.3.1 Bedeutung der *ERG* Expression in AML

Auf der Beobachtung aufbauend, dass AML Patienten der prognostisch ungünstigen Subgruppe mit komplex-aberrantem Karyotyp eine hohe *ERG* Expression aufweisen (Baldus *et al*, 2004), stellten wir die Hypothese auf, dass eine gesteigerte *ERG* Expression auch bei Patienten mit einem normalen Karyotyp mit einer ungünstigen Prognose assoziiert ist. Nachfolgend konnte gezeigt werden, dass eine gesteigerte *ERG* Expression einen unabhängigen, prognostisch ungünstigen Risikofaktor bei erwachsenen Patienten mit neu diagnostizierter AML und normalem Karyotyp darstellt (Marcucci *et al*, 2005; Marcucci *et al*, 2007).

7.3.1.1 Eine gesteigerte Expression des ETS Transkriptionsfaktors *ERG* ist assoziiert mit einer ungünstigen Prognose bei AML mit normalem Karyotyp

(Marcucci G*, **Baldus CD***, Ruppert AS, Radmacher MD, Mrozek K, Whitman SP, Kolitz JE, Edwards CG, Vardiman JW, Powell BL, Baer MR, Moore JO, Perrotti D, Caligiuri MA, Carroll AJ, Larson RA, de la Chapelle A, Bloomfield CD. Overexpression of the ETS transcription factor *ERG* predicts a worse outcome in acute myeloid leukemia with normal karyotype: a Cancer and Leukemia Group B Study. J Clin Oncol. 2005;23:9234-9242)

*gleichwertige Kontribution

Das Ziel dieser Studie war es, die prognostische Relevanz der gesteigerten *ERG* Expression bei AML mit normalem Karyotyp zu untersuchen. Hierzu wurden diagnostische Blutproben von 84 AML Patienten unter 60 Jahren, welche in die CALGB Therapiestudie 9621 eingeschlossen und bereits für die Gene *BAALC*, *FLT3* und *MLL* molekulargenetisch charakterisiert waren, auf die mRNA Expression von *ERG* mittels quantitativer real-time RT-PCR untersucht. Für die statistische Auswertung erfolgte eine Einteilung der Patienten in vier Quartilen entsprechend der *ERG* Expressionswerte. Darüber hinaus wurden globale Genexpressionsstudien (Affymetrix U133 plus 2.0 GeneChips) durchgeführt und differentiell exprimierte Gene von Patienten mit hoher und niedriger *ERG* Expression verglichen. Innerhalb eines medianen Beobachtungszeitraums von 5.7 Jahren wiesen Patienten mit *ERG* Expressionswerten der oberen 25% der *ERG* Messwerte eine erhöhte kumulative Rezidivinzidenz (CIR; $P < 0.001$) und ein verkürztes Gesamtüberleben (OS; $P = 0.011$) im Vergleich zu den übrigen 75% der Patienten auf. In der multivariaten Analyse waren eine hohe *ERG* Expression ($P < 0.001$) und der Nachweis einer partiellen Tandemduplikation des *MLL* Gens (*MLL* PTD) ($P = 0.027$) unabhängige prognostisch ungünstige Faktoren der CIR. Für die Untersuchung des OS zeigte sich eine statistische Interaktion zwischen den beiden Faktoren *ERG* und *BAALC* ($P = 0.013$), wobei eine gesteigerte *ERG* Expression ($P = 0.002$) nur bei Patienten mit niedriger *BAALC* Expression mit einer ungünstigen Prognose assoziiert war. Eine gesteigerte *ERG* Expression war auch unter Einschluss der prognostisch ungünstigen Patientengruppe, charakterisiert durch eine interne Tandemduplikation (ITD) des *FLT3* Gens bei gleichzeitigem Verlust des *FLT3* Wildtypallels, ein unabhängiger prognostischer Faktor. In den globalen Genexpressionsstudien konnte die *ERG* Expression mit der gesteigerten Expression von 112 Genen assoziiert werden, von denen viele involviert sind in Zellproliferation, Differenzierung und Apoptose. Zusammenfassend stellt *ERG* einen neuen Prognosefaktor bei der AML mit normalem Karyotyp dar, der zudem charakterisiert ist durch eine spezifische Genexpressionssignatur.

7.3.2 Bedeutung der *ERG* Expression bei der T-ALL

ERG spielt eine wesentliche Rolle in der frühen T-Zellentwicklung: während hohe Expressionswerte in frühen T-lymphatischen Vorläuferzellen nachgewiesen werden, nimmt die *ERG* Expression mit Einsetzen der T-Zell-Reifung abrupt ab (Anderson *et al*, 1999). *ERG* ist überwiegend in CD4/CD8 doppelt negativen Zellen (DN1 und DN2) exprimiert und eine forcierte Expression von *ERG* in Progenitorzellen führt zu einer Akkumulation der Zellen im DN3 Stadium (Lefebvre *et al*, 2005).

Zur Identifikation von pathogenetisch relevanten Veränderungen werden Mausmodelle herangezogen. Zur Frage der Relevanz von genomischen Defekten, die in murinen Modellen identifiziert werden, für die Erkrankungen beim Menschen wurde ein Abgleich der im murinen T-Zell-Lymphom gefundenen genomischen Alterationen mit Veränderungen, die in humanen T-ALL Blasten identifiziert wurden, vorgenommen. Interessanterweise war der *ERG* Locus einer von den 6 amplifizierten Regionen, die sowohl im murinen wie im humanen System nachzuweisen waren (Maser *et al*, 2007). Dieses unterstreicht die Spezies übergeordnete Bedeutung von *ERG* als Onkogen für T-Zell Neoplasien.

Auf Grund der hohen Expression von *ERG* in der frühen T-Zell Entwicklung mit spezifischer Regulation während der T-Zell Differenzierung, des onkogenen Potentials sowie der prognostischen Relevanz von *ERG* bei AML untersuchten wir den prognostischen Stellenwert der *ERG* Expression bei Patienten mit T-ALL. In diesen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass eine gesteigerte *ERG* Expression einen neuen und von anderen Faktoren unabhängigen Marker darstellt, der mit einer ungünstigen Prognose assoziiert ist.

7.3.2.1 Eine hohe Expression des ETS Transkriptionsfaktors *ERG* ist assoziiert mit einer ungünstigen Prognose bei erwachsenen Patienten mit akuter T-lymphoblastischer Leukämie

(Baldus CD, Burmeister T, Martus P, Schwartz S, Gökbuget N, Bloomfield CD, Hoelzer D, Thiel E, Hofmann WK. High expression of the ETS transcription factor *ERG* predicts adverse outcome in acute T-lymphoblastic leukemia in adults. J Clin Oncol. 2006b;24:4714-4720)

Der Anteil von erwachsenen Patienten mit T-ALL, für die ein lang anhaltendes krankheitsfreies Überleben erzielt werden kann, beträgt lediglich 32-46%. Zytogenetische wie molekulargenetische Veränderungen mit prognostischer Relevanz sind bisher nicht bekannt. Im Rahmen dieser Studie untersuchten wir die prognostische Bedeutung des onkogenen ETS Transkriptionsfaktors *ERG* in der T-ALL. Die *ERG* Expression wurde mittels real-time RT-PCR in diagnostischen Knochenmarkproben von 105 erwachsenen T-ALL Patienten, die innerhalb der deutschen ALL Therapiestudie behandelt wurden, untersucht. Entsprechend der medianen *ERG* Expression wurden die Patienten in eine Gruppe mit niedriger *ERG* Expression (low *ERG*; n=52) und in eine mit hoher *ERG* Expression (high *ERG*; n=53) eingeteilt. Zudem wurden die Patienten auf die Expression der *HOX* Gene *HOX11* und *HOX11L2* mittels real-time PCR untersucht. Patienten mit hoher *ERG* Expression hatten im Vergleich zu low *ERG* Patienten ein verkürztes Gesamtüberleben (OS, P=0.02; 5-Jahres OS: high *ERG* 26% versus low *ERG* 58%) und rezidivfreies Überleben (RFS, P=0.003; 5-Jahres RFS: high *ERG* 34% versus low *ERG* 72%). In der multivariablen Analyse waren eine hohe *ERG* Expression (P=0.005), die immunphänotypischen Subgruppen (early versus mature versus thymic T-ALL; P=0.04), die *HOX11L2* Expression (P=0.055) und die fehlende *HOX11* Expression (P=0.017) von unabhängiger prognostischer Relevanz für ein verkürztes RFS. Patienten mit hoher *ERG* Expression hatten ein relatives Risiko (HR) von 3.2, ein Rezidiv zu erleiden. Innerhalb der prognostisch günstigen Subgruppe der thymischen T-ALL (n=57) waren die gesteigerte *ERG* (HR 4.1; P=0.02) und *HOX11L2* Expression (HR 6.6; P=0.008) von unabhängiger prognostischer Relevanz für ein verkürztes RFS. Zusammenfassend stellt eine gesteigerte *ERG* Expression einen prognostisch ungünstigen Marker bei erwachsenen Patienten mit T-ALL dar. Innerhalb der thymischen T-ALL, welche bisher als Standardrisiko eingestuft wurde, charakterisiert eine hohe *ERG* Expression Patienten mit einem 4fach höheren Risiko für das Erleiden eines Rezidives. *ERG* kann als neuer molekularer Prognosefaktor zu einer optimierten Therapiestratifizierung beitragen und unterstreicht die Notwendigkeit für neue therapeutische Konzepte.

7.3.3 Untersuchungen zur *ERG* und *BAALC* Expression in T-ALL

Die Ähnlichkeiten im Expressionsmuster der Gene *ERG* und *BAALC* im Rahmen der normalen hämatopoetischen Differenzierung sowie deren prognostische Relevanz bei AML Patienten veranlassten uns, die prognostische Bedeutung von *BAALC* bei der T-ALL zu untersuchen. Die kombinierte Analyse der *ERG* und *BAALC* Expression ermöglichte hier eine spezifische molekulare Risikogruppeneinteilung, die für risikostratifizierte Therapiekonzepte herangezogen werden kann. Die Expression beider Gene in den unreifen AML und T-ALL Subtypen sowie die prognostische Bedeutung von *BAALC* und *ERG* bei AML und T-ALL zeigt, dass beide Gene einen frühen, linienunabhängigen Pathway in der Leukämogenese kennzeichnen und dies deutet auf eine leukämische Transformation im Stammzellkompartiment hin.

7.3.3.1 Die niedrige Expression von *ERG* und *BAALC* identifiziert eine neue Subgruppe von erwachsenen Patienten mit akuter T-lymphoblastischer Leukämie mit einer sehr günstigen Prognose

(Baldus CD, Martus P, Burmeister T, Schwartz S, Gökbuget N, Bloomfield CD, Hoelzer D, Thiel E, Hofmann WK. Low *ERG* and *BAALC* expression identifies a new subgroup of adult acute T-lymphoblastic leukemia with a highly favorable outcome. J Clin Oncol. 2007b;25:3739-3745)

Die Gene *ERG* und *BAALC* weisen Ähnlichkeiten in ihrem Expressionsmuster während der hämatopoetischen Differenzierung auf und sind beide von prognostischer Relevanz für Patienten mit AML. Entsprechend stellten wir die Hypothese auf, dass ähnlich wie für *ERG* auch die Expression von *BAALC* von prognostischer Signifikanz für die T-ALL ist und dass die kombinierte Analyse von *ERG* und *BAALC* eine genauere Charakterisierung des Risikoprofils der T-ALL Patienten erlauben würde. Die Expression von *ERG* und *BAALC* wurde mittels real-time RT-PCR in 153 diagnostischen Knochenmarkproben von erwachsenen Patienten mit T-ALL analysiert und nachfolgend wurden die Patienten in Gruppen von niedriger (low *ERG*) und hoher *ERG* (high *ERG*) bzw. niedriger (low *BAALC*) und hoher (high *BAALC*) *BAALC* Expression eingeteilt. Eine hohe *BAALC* Expression korrelierte mit dem Immunphänotyp der early T-ALL ($P < 0.0001$), einer CD34 Positivität ($P < 0.0001$), der Koexpression von myeloischen Markern ($P = 0.0001$) und einer erhöhten *ERG* Expression ($P = 0.03$). Patienten mit hoher *BAALC* wiesen im Vergleich zu Patienten mit niedriger *BAALC* Expression ein verkürztes rezidivfreies Überleben (RFS, $P = 0.0008$) und Gesamtüberleben (OS; $P = 0.0001$) auf. Im Gegensatz dazu wiesen Patienten mit niedriger *ERG* und niedriger *BAALC* Expression (41% aller T-ALL Patienten) eine sehr günstige Prognose auf ($P < 0.0001$, 4-Jahres RFS: low *ERG* / low *BAALC* 81%; $P < 0.0001$, 4-Jahres OS: low *ERG* / low *BAALC* 69%). In der multivaribalen Analyse war ein low *ERG* / low *BAALC* Expressionsstatus ein unabhängiger Faktor, der mit einer günstigen Prognose assoziiert war (RFS, $P = 0.001$; OS, $P = 0.003$). Die niedrige Expression beider Gene, *ERG* und *BAALC*, identifizierte T-ALL Patienten mit einem sehr günstigen Verlauf.

8. Diskussion

Akute Leukämien stellen klinisch wie molekulargenetisch heterogene Erkrankungen dar. Pathogenetisch sind die akuten Leukämien auf eine klonale Vermehrung unreifer myeloischer bzw. lymphatischer Blasten zurückzuführen, die gekennzeichnet sind durch einen Differenzierungsverlust und ein autonomes Proliferationsverhalten. Bisher wurden auf dem Boden von chromosomalen Translokationen Gene mit für die Leukämogenese pathogenetischer Relevanz identifiziert. Darüber hinaus konnten in den letzten Jahren auch unabhängig von zytogenetischen Veränderungen Mutationen und alterierte Expressionsmuster spezifischen Schlüsselgenen der Leukämogenese zugeordnet werden. Diese Veränderungen sind nicht nur von pathogenetischer, sondern auch prognostischer und therapeutischer Relevanz.

In dieser Hinsicht wurden in der vorliegenden Habilitationsschrift zwei neue Gene mit prognostischer Relevanz für die AML und die T-ALL charakterisiert.

Zum einen konnte das Gen *BAALC* als neuer molekularer Marker der frühen, normalen hämatopoetischen Progenitorzellen identifiziert werden. Die Expression von *BAALC* ist restriktiert auf die CD34 positive Population von hämatopoetischen Progenitorzellen, schließt aber alle Differenzierungslinien ein und wird mit Einsetzen der Zellreifung herunterreguliert. Während die Funktion von *BAALC* nicht bekannt ist, lässt das Expressionsverhalten auf die Bedeutung für den Erhalt des Stammzellpools schließen.

Die prognostische Relevanz der *BAALC* Expression wurde bei AML Patienten mit normalem Karyotyp dargestellt. Hierbei ist von Bedeutung, dass die Ergebnisse der ersten Studie im Rahmen der CALGB in einem zweiten unabhängigen Patientenkollektiv (DSIL) bestätigt wurden. Des Weiteren bleibt hervorzuheben, dass die prognostische Wertigkeit der gesteigerten *BAALC* Expression unabhängig von dem Vorliegen der *FLT3* ITD Mutation, einem der wichtigsten Prognosefaktoren, war. Zudem legen die Untersuchungen nahe, dass durch den Einsatz der allogenen Stammzelltransplantation im Rahmen der Konsolidierungstherapie die ungünstige Prognose der Patienten mit hoher *BAALC* Expression kompensiert werden kann.

Der zweite molekulare Marker mit prognostischer Relevanz wurde durch eine detaillierte Charakterisierung der Amplifikation des Chromosoms 21 bei AML mit einem komplex aberranten Karyotyp identifiziert. Für den ETS-Transkriptionsfaktor *ERG* zeigten diese Untersuchungen eine relevante genomische Amplifikation. In weiterführenden Studien wurde

ERG als neuer, unabhängiger Prognosefaktor bei der AML mit normalem Karyotyp dargestellt. Diese Ergebnisse konnten ebenfalls in einer unabhängigen Untersuchung bestätigt werden und unterstreichen die prognostische Relevanz von *ERG*.

Die Studien zur prognostischen Relevanz von *ERG* bei der T-ALL stützen sich auf die Untersuchungen zur Expression von *ERG* im Rahmen der normalen T-Zell-Entwicklung, in der für *ERG* ein sehr spezifisches Expressionsmuster nachgewiesen werden konnte. In Analogie zu der physiologischen *ERG* Expression mit hohen Expressionswerten in unreifen T-Progenitorzellen weisen unreife, wenig differenzierte T-ALL Blasten hohe *ERG* Expressionswerte auf. Die prognostische Relevanz einer gesteigerten *ERG* Expression war zudem unabhängig von den immunologischen Subgruppen und diese unterstreicht den übergeordneten Einfluss von *ERG* auf das Therapieansprechen.

Weiterführende Untersuchungen konnten darlegen, dass die *BAALC* Expression nicht nur für Patienten mit AML mit normalem Karyotyp, sondern auch bei der T-ALL von prognostischer Bedeutung ist. Ähnlich wie bei der AML, so war auch bei der T-ALL eine gesteigerte *BAALC* Expression zum Zeitpunkt der Erstdiagnose assoziiert mit einem erhöhten Anteil an primär refraktären Erkrankungen. Dies deutet auf eine *BAALC* vermittelte multi-drug Resistenz hin. Die kombinierte Analyse der *BAALC* und *ERG* Expression erlaubte zudem eine detaillierte molekulare Risikogruppeneinteilung, wobei Patienten, die sich durch eine niedrige Expression beider Gene auswiesen, durch eine sehr gute Prognose gekennzeichnet waren. Vergleichbare Ergebnisse lassen sich bei der AML mit normalem Karyotyp ableiten und zeigen ebenfalls, dass lediglich für Patienten mit einer niedrigen Expression für *BAALC* und *ERG* ein lang anhaltendes rezidivfreies Überleben unter Einsatz von konventionellen Therapieregimen erzielt werden kann.

Die pathophysiologischen Aspekte, die einer gesteigerten *BAALC* und *ERG* Expression zu Grunde liegen und mit einem klinisch aggressiveren Leukämiephänotyp einhergehen, sind weiterhin zu untersuchen. Herauszuheben bleibt, dass die prognostische Relevanz von *BAALC* und *ERG* in den zwei unterschiedlichen Leukämieformen der AML und T-ALL auf einen linienunabhängigen Pathomechanismus für die Leukämogenese hinweisen. Hierbei ist zu klären, ob das Expressionsmuster in den leukämischen Blasten die Expression der normalen hämatopoetischen Differenzierung widerspiegelt, wobei es sich um einen Surrogat-Marker einer frühen hämatopoetischen Progenitorzelle handeln könnte. Die aktive Rolle dieser beiden Gene für die Vermittlung der Therapierefraktärität und einer erhöhten Rezidivrate bleibt zu untersuchen. Einblicke in die *BAALC* und *ERG* zugrunde liegenden Regulationsmechanismen bieten zudem die Chance, die Entwicklung gezielter Substanzen

zu ermöglichen, die eine therapeutische Modulation dieser molekularen Risikofaktoren erzielen könnten.

Aus klinischer Sicht lässt sich von diesen Daten ableiten, dass für diese neuen molekulargenetisch definierten Risikogruppen der AML und T-ALL die Integration neuer, risikostratifizierter Therapiekonzepte sinnvoll erscheint. Für Patienten mit einem ungünstigen Risikoprofil sollte entsprechend einer Therapieintensivierung der Stellenwert der allogenen Stammzelltransplantation und neuer Substanzen geprüft werden, wohingegen eine mögliche Doseinsparung für Patienten mit einem niedrigen Risiko diskutiert werden kann. Während die prognostische Relevanz der beiden Gene für die AML in jeweils unabhängigen Untersuchungen verifiziert wurde, steht die Bestätigung der Ergebnisse bei der T-ALL durch eine unabhängige Studie aus. Zudem muss, bevor diese Erkenntnisse zur Risikostratifizierung in klinischen Therapiestudien eingebracht werden können, eine Standardisierung der real-time RT-PCR basierten Messungen erfolgen, um eine Vergleichbarkeit von Ergebnisse in verschiedenen Laboren zu gewährleisten.

Des Weiteren bleibt die Interaktion der verschiedenen molekularen Marker, die für die AML mit normalem Karyotyp identifiziert wurde, zu berücksichtigen. So ist die prognostische Wertigkeit eines Risikofaktors immer in Bezug zu weiteren Veränderungen zu setzen, die gleichzeitig bei einem Patienten auftreten können. Zur definitiven Klärung dieses Netzwerkes von prognostischen Faktoren werden große Studien notwendig sein, um allen Subgruppen Rechnung zu tragen.

9. Zusammenfassung

Die molekulare Heterogenität der akuten Leukämien kann neben zytogenetischen Veränderungen unter anderem einer Aberrationen von einzelnen Genen zugeschrieben werden. Hierbei sind Genmutationen aber auch die gestörte Expression von spezifischen Genen, die zu einer Alteration von Regulationsmechanismen führen, von wesentlicher Bedeutung.

Auf der Suche nach neuen Kandidatengenen, die für die Pathogenese und auch aus klinischer Sicht für die akuten Leukämien von Bedeutung sind, konnten in den vorgestellten Arbeiten die beiden Gene *BAALC* und *ERG* näher charakterisiert werden. Insbesondere konnte folgendes dargestellt werden:

- ✍ Das Gen *BAALC* ist durch eine spezifische Expression in der normalen hämatopoetischen Differenzierung charakterisiert und stellt einen neuen molekularen Progenitorzellmarker dar.
- ✍ Eine differentielle *BAALC* Expression konnte bei unterschiedlichen Leukämienformen nachgewiesen werden. Insbesondere wurde in zwei unabhängigen Studien gezeigt, dass eine gesteigerte *BAALC* Expression bei der AML mit normalem Karyotyp eine neue molekular definierte Risikogruppe mit einem ungünstigen klinischen Verlauf charakterisiert.
- ✍ Der ETS-Transkriptionsfaktor *ERG* wurde auf dem Boden einer genomischen Amplifikation von Chromosom 21 bei AML Patienten mit komplex aberranten Karyotyp identifiziert.
- ✍ In klinischen Untersuchungen wurde ausgeführt, dass eine gesteigerte *ERG* Expression einen neuen unabhängigen prognostisch ungünstigen Risikofaktor bei der AML mit normalem Karyotyp darstellt.
- ✍ Kongruent zu dem Expressionsmuster während der normalen T-Zell Entwicklung ist eine gesteigerte *ERG* Expression auch bei der T-ALL mit einem unreifen Phänotyp assoziiert. Darüber hinaus wurde eine gesteigerte *ERG* Expression als neuer molekularer Marker, der mit einer ungünstigen Prognose bei T-ALL Patienten unabhängig vom Immunphänotyp assoziiert ist, etabliert.

- ✍ Die gesteigerte Expression von *BAALC* und *ERG* kennzeichnen Patienten mit einem ungünstigen klinischen Verlauf, und dies konnte sowohl für AML Patienten mit normalem Karyotyp wie auch für T-ALL Patienten gezeigt werden. Während bei beiden Leukämietypen die Gene *BAALC* und *ERG* für sich genommen jeweils von prognostischer Relevanz sind, erlaubt die kombinierte Analyse beider Gene eine Einteilung in molekular definierte Risikogruppen.

Die Beobachtung, dass beide Gene neben der spezifischen, mit einer auf das Progenitorzellkompartiment beschränkten Expression, eine differentielle Expression bei AML und T-ALL mit prognostischer Relevanz aufweisen, deutet auf eine linienübergeordnete Relevanz in der Leukämogenese hin und unterstreicht die pathogenetische Bedeutung von *BAALC* und *ERG*. Beide Gene erlauben so eine molekular basierte Risikostratifizierung für AML wie auch T-ALL Patienten. Darüber hinaus stellen beide Gene neue molekulare Zielstrukturen dar, die für mögliche therapeutische Konzepte herangezogen werden können.

10. Literaturverzeichnis

Anderson MK, Hernandez-Hoyos G, Diamond RA, Rothenberg EV. Precise developmental regulation of Ets family transcription factors during specification and commitment to the T cell lineage. *Development*. 1999;126:3131-3148.

Baldus CD, Burmeister T, Martus P, Schwartz S, Gökbüget N, Bloomfield CD, Hoelzer D, Thiel E, Hofmann WK. High expression of the ETS transcription factor *ERG* predicts adverse outcome in acute T-lymphoblastic leukemia in adults. *J Clin Oncol*. 2006b;24:4714-4720.

Baldus CD, Liyanarachchi S, Mrozek K, et al. Acute myeloid leukemia with complex karyotype: amplification of two chromosome 21 regions discloses overexpression of APP, ETS2 and ERG genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101:3915-3920.

Baldus CD, Martus P, Burmeister T, et al. Low ERG and BAALC expression identifies a new subgroup of adult acute T-lymphoblastic leukemia with a highly favorable outcome. *J Clin Oncol*. 2007b;25:3739-3745.

Baldus CD, Mrozek K, Marcucci G, Bloomfield CD. Clinical outcome of de novo acute myeloid leukaemia patients with normal cytogenetics is affected by molecular genetic alterations: a concise review. *Br J Haematol*. 2007a;137:387-400.

Baldus CD, Tanner SM, Kusewitt D, et al. BAALC, a novel marker of human hematopoietic progenitor cells. *Experimental Hematology*. 2003a;31:1051-1056.

Baldus CD, Tanner SM, Ruppert AS, et al. BAALC expression predicts clinical outcome of de novo acute myeloid leukemia patients with normal cytogenetics: a Cancer and Leukemia Group B study. *Blood*. 2003b;102:1613-1618.

Baldus CD, Thiede C, Soucek S, Bloomfield CD, Thiel E, Ehninger G. BAALC expression and FLT3 internal tandem duplication mutations in acute myeloid leukemia patients with normal cytogenetics: prognostic implications. *J Clin Oncol*. 2006a;24:790-797

Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, et al. Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. *Br J Haematol*. 1976;33:451-458.

Bernasconi P, Boni M, Cavigliano PM, et al. Molecularly targeted therapy in acute myeloid leukemia. *Ann N Y Acad Sci*. 2004;1028:409-422.

Bienz M, Ludwig M, Oppliger Leibundgut E, et al. Risk assessment in patients with acute myeloid leukemia and a normal karyotype [Erratum in: *Clinical Cancer Research*, 2005, 11, 5659]. *Clinical Cancer Research*. 2005;11:1416-1424.

Bloomfield CD, Lawrence D, Byrd JC, et al. Frequency of prolonged remission duration after high-dose cytarabine intensification in acute myeloid leukemia varies by cytogenetic subtype. *Cancer Res*. 1998;58:4173-4179.

Bloomfield CD, Mrozek K, Caligiuri MA. Cancer and Leukemia Group B Leukemia Correlative Science Committee: major accomplishments and future directions. *Clinical Cancer Research*. 2006;12:3564-3571.

Boissel N, Renneville A, Biggio V, et al. Prevalence, clinical profile and prognosis of NPM mutations in AML with normal karyotype. *Blood*. 2005;106:3618-3620.

Breit S, Stanulla M, Flohr T, et al. Activating NOTCH1 mutations predict favorable early treatment response and long-term outcome in childhood precursor T-cell lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2006;108:1151-1157.

Bullinger L, Döhner K, Bair E, et al. Use of gene-expression profiling to identify prognostic subclasses in adult acute myeloid leukemia. *New England Journal of Medicine*. 2004;350:1605-1616.

Byrd JC, Mrózek K, Dodge RK, et al. Pretreatment cytogenetic abnormalities are predictive of induction success, cumulative incidence of relapse, and overall survival in adult patients with de novo acute myeloid leukemia: results from Cancer and Leukemia Group B (CALGB 8461). *Blood*. 2003;100:4325-4336.

Byrd JC, Weiss RB, Arthur DC, et al. Extramedullary leukemia adversely affects hematologic complete remission rate and overall survival in patients with t(8;21)(q22;q22): results from Cancer and Leukemia Group B 8461. *J Clin Oncol*. 1997;15:466-475.

Caligiuri MA, Strout MP, Schichman SA, et al. Partial tandem duplication of ALL1 as a recurrent molecular defect in acute myeloid leukemia with trisomy 11. *Cancer Res*. 1996;56:1418-1425.

DeAngelo DJ, Stone RM, Heaney ML, et al. Phase 1 clinical results with tandutinib (MLN518), a novel FLT3 antagonist, in patients with acute myelogenous leukemia or high-risk myelodysplastic syndrome: safety, pharmacokinetics, and pharmacodynamics. *Blood*. 2006;108:3674-3681.

Deschler B and Lübbert M. Acute myeloid leukemia: epidemiology and etiology. *Cancer*. 2006;107:2099-2107.

Döhner K, Schlenk RF, Habdank M, et al. Mutant nucleophosmin (NPM1) predicts favorable prognosis in younger adults with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics - interaction with other gene mutations. *Blood*. 2005;106:3740-3746.

Döhner K, Tobis K, Ulrich R, et al. Prognostic significance of partial tandem duplications of the MLL gene in adult patients 16 to 60 years old with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: a study of the Acute Myeloid Leukemia Study Group Ulm. *Journal of Clinical Oncology*. 2002;20:3254-3261.

Druker BJ, Talpaz M, Resta DJ, et al. Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2001;344:1031-1037.

Ellisen LW, Bird J, West DC, Soreng AL, Reynolds TC, Smith SD, Sklar J. TAN-1, the human homolog of the Drosophila notch gene, is broken by chromosomal translocations in T lymphoblastic neoplasms. *Cell*. 1991;66:649-661.

Estey E and Döhner H. Acute myeloid leukaemia. *Lancet*. 2006;368:1894-1907.

Falini B, Mecucci C, Tiacci E, et al. Cytoplasmic nucleophosmin in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype. *N Engl J Med*. 2005;352(3):254-266.

Fenaux P, Le Deley MC, Castaigne S, et al. Effect of all transretinoic acid in newly diagnosed acute promyelocytic leukemia. Results of a multicenter randomized trial. European APL 91 Group. *Blood*. 1993;82:3241-3249.

Ferrando AA, Neuberg DS, Staunton J, et al. Gene expression signatures define novel oncogenic pathways in T cell acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Cell*. 2002;1:75-87.

Fiedler W, Mesters R, Tinnefeld H, et al. A phase 2 clinical study of SU5416 in patients with refractory acute myeloid leukemia. *Blood*. 2003;102:2763-2767.

Flasshove M, Meusers P, Schutte J, et al. Long-term survival after induction therapy with idarubicin and cytosine arabinoside for de novo acute myeloid leukemia. *Ann Hematol*. 2000;79:533-542.

Fröhling S, Schlenk RF, Breitnick J, et al. Prognostic significance of activating FLT3 mutations in younger adults (16 to 60 years) with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: a study of the AML Study Group Ulm. *Blood*. 2002;100:4372-4380.

Fröhling S, Schlenk RF, Stolze I, et al. CEBPA mutations in younger adults with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: prognostic relevance and analysis of cooperating mutations. *J Clin Oncol*. 2004;22:624-633.

Fröhling S, Scholl C, Gilliland DG, Levine RL. Genetics of myeloid malignancies: pathogenetic and clinical implications. *J Clin Oncol*. 2005;23:6285-6295.

Giles FJ, Stopeck AT, Silverman LR, et al. SU5416, a small molecule tyrosine kinase receptor inhibitor, has biologic activity in patients with refractory acute myeloid leukemia or myelodysplastic syndromes. *Blood*. 2003;102:795-801.

Grimwade D, Walker H, Harrison G, et al. The predictive value of hierarchical cytogenetic classification in older adults with acute myeloid leukemia (AML): analysis of 1065 patients entered into the United Kingdom Medical Research Council AML11 trial. *Blood*. 2001;98:1312-1320.

Grimwade D, Walker H, Oliver F, et al. The importance of diagnostic cytogenetics on outcome in AML: analysis of 1,612 patients entered into the MRC AML 10 trial. *Blood*. 1998;92:2322-2333.

Grisendi S, Mecucci C, Falini B, Pandolfi PP. Nucleophosmin and cancer. *Nat Rev Cancer*. 2006;6:493-505.

Haferlach T, Bacher U, Kern W, Schnittger S, Haferlach C. Diagnostic pathways in acute leukemias: a proposal for a multimodal approach. *Ann Hematol*. 2007;86:311-327.

Hart AH, Corrick CM, Tymms MJ, Hertzog PJ, Kola I. Human ERG is a proto-oncogene with mitogenic and transforming activity. *Oncogene*. 1995;10:1423-1430.

Heuser M, Beutel G, Krauter J, et al. High meninoma 1 (MN1) expression as a predictor for poor outcome in acute myeloid leukemia with normal cytogenetics. *Blood*. 2006;108:3898-3905.

Hilgenfeld E, Padilla-Nash H, McNeil N, et al. Spectral karyotyping and fluorescence in situ hybridization detect novel chromosomal aberrations, a recurring involvement of chromosome 21 and amplification of the MYC oncogene in acute myeloid leukaemia M2. *Br J Haematol*. 2001;113:305-317.

Hoelzer D, Goekbuget N, Ottmann O, et al. Acute lymphoblastic leukemia. *Hematology (Am Soc Hematol Educ Program)* 2002;162-192.

Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW. Eds. World Health Organization: classification of tumours – pathology and genetics of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. Lyon: IARC Press, 2001.

Kelly LM and Gilliland DG. Genetics of myeloid leukemias. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2002;3:179-198.

Kim MH, Stewart J, Devlin C, Kim YT, Boyd E, Connor M. The application of comparative genomic hybridization as an additional tool in the chromosome analysis of acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes. *Cancer Genet Cytogenet.* 2001;126:26-33.

Kong XT, Ida K, Ichikawa H, et al. Consistent detection of TLS/FUS-ERG chimeric transcripts in acute myeloid leukemia with t(16;21)(p11;q22) and identification of a novel transcript. *Blood.* 1997;90:1192-1199.

Kuendgen A, Schmid M, Schlenk R, et al. The histone deacetylase (HDAC) inhibitor valproic acid as monotherapy or in combination with all-trans retinoic acid in patients with acute myeloid leukemia. *Cancer.* 2006;106:112-119.

Lefebvre JM, Haks MC, Carleton MO, et al. Enforced expression of Spi-B reverses T lineage commitment and blocks beta-selection. *J Immunol.* 2005;174:6184-6194.

Look AT. Oncogenic transcription factors in the human acute leukemias. *Science.* 1997;278:1059-1064.

Löwenberg B, Downing JR, Burnett A. Acute myeloid leukemia. *N Engl J Med.* 1999;341:1051-1062.

Marcucci G, Baldus CD, Ruppert AS, et al. Overexpression of the ETS-related gene, ERG, predicts a worse outcome in acute myeloid leukemia with normal karyotype: a Cancer and Leukemia Group B study. *J Clin Oncol.* 2005;23:9234-9242.

Marcucci G, Maharry K, Whitman SP, et al. High ETS-related gene (ERG) expression levels predict adverse outcome and improve molecular risk-based classification of cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a Cancer and Leukemia Group B study. *J Clin Oncol.* 2007;25:3337-3343.

Maser RS, Choudhury B, Campbell PJ, et al. Chromosomally unstable mouse tumours have genomic alterations similar to diverse human cancers. *Nature.* 2007;447:966-971.

Moore SD, Offor O, Ferry JA, Amrein PC, Morton CC, Dal Cin P. ELF4 is fused to ERG in a case of acute myeloid leukemia with a t(X;21)(q25-26;q22). *Leuk Res.* 2006;30:1037-1042.

Mrozek K, Baldus CD, Bloomfield CD. Molecular biology, pathology, and cytogenetics of acute myeloid leukemia. In *Clinical malignant hematology*. Sekeres, Kalaycio, Bolwell eds. My Grow Hill 2007a:9-23

Mrozek K, Heerema NA, Bloomfield CD. Cytogenetics in acute leukemia. *Blood Reviews,* 2004;18:115-136.

Mrozek K, Heinonen K, Bloomfield CD. Clinical importance of cytogenetics in acute myeloid leukaemia. *Best Pract Res Clin Haematol.* 2001;14:19-47.

Mrozek K, Heinonen K, Theil KS, Bloomfield CD. Spectral karyotyping in patients with acute myeloid leukemia and a complex karyotype shows hidden aberrations, including recurrent overrepresentation of 21q, 11q, and 22q. *Genes Chromosomes Cancer*. 2002;34:137-153.

Mrozek K, Marcucci G, Paschka P, Whitman SP, Bloomfield CD. Clinical relevance of mutations and gene-expression changes in adult acute myeloid leukemia with normal cytogenetics: are we ready for a prognostically prioritized molecular classification? *Blood*. 2007b;109:431-448.

National Cancer Institute. Acute myeloid Leukemia. <http://www.seer.cancer.gov/statistics/>

Pabst T, Mueller BU, Zhang P, et al. Dominant-negative mutations of CEBPA, encoding CCAAT/enhancer binding protein-a (C/EBPa), in acute myeloid leukemia. *Nature Genetics*. 2001;27:263-270.

Rainis L, Toki T, Pimanda JE, et al. The proto-oncogene ERG in megakaryoblastic leukemias. *Cancer Res*. 2005;65:7596-7602.

Schnittger S, Kinkelin U, Schoch C, et al. Screening for MLL tandem duplication in 387 unselected patients with AML identify a prognostically unfavorable subset of AML. *Leukemia*. 2000;14:796-804.

Schnittger S, Schoch C, Kern W et al. Nucleophosmin gene mutations are predictors of favorable prognosis in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype. *Blood*. 2005;106:3733-3739.

Schoch C, Haferlach T, Bursch S, et al. Loss of genetic material is more common than gain in acute myeloid leukemia with complex aberrant karyotype: a detailed analysis of 125 cases using conventional chromosome analysis and fluorescence in situ hybridization including 24-color FISH. *Genes Chromosomes Cancer*. 2002;35:20-29.

Sekeres MA and Stone R. Older adults with acute myeloid leukemia. *Curr Oncol Rep*. 2002;4:403-409.

Shih IeM and Wang TL. Notch signaling, gamma-secretase inhibitors, and cancer therapy. *Cancer Res*. 2007;67:1879-1882.

Shing DC, McMullan DJ, Roberts P, et al. FUS/ERG gene fusions in Ewing's tumors. *Cancer Res*. 2003;63:4568-4576.

Slovak ML, Kopecky KJ, Cassileth PA, et al. Karyotypic analysis predicts outcome of preremission and postremission therapy in adult acute myeloid leukemia: a Southwest Oncology Group/Eastern Cooperative Oncology Group Study. *Blood*. 2000;96:4075-4083.

Smith BD, Levis M, Beran M, et al. Single-agent CEP-701, a novel FLT3 inhibitor, shows biologic and clinical activity in patients with relapsed or refractory acute myeloid leukemia. *Blood*. 2004;103:3669-3676.

Sorensen PH, Lessnick SL, Lopez-Terrada D, Liu XF, Triche TJ, Denny CT. A second Ewing's sarcoma translocation, t(21;22), fuses the EWS gene to another ETS-family transcription factor, ERG. *Nat Genet*. 1994;6:146-151.

Stirewalt DL, Meshinchi S, Kussick SJ, et al. Novel FLT3 point mutations within exon 14 found in patients with acute myeloid leukaemia. *British Journal of Haematology*. 2004;124:481-484.

- Tallman MS, Gilliland DG, Rowe JM. Drug therapy for acute myeloid leukemia. *Blood*. 2005;106:1154-1163.
- Tanner SM, Austin JL, Leone G, et al. BAALC, the human member of a novel mammalian neuroectoderm gene lineage, is implicated in hematopoiesis and acute leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98:3901-3906.
- Thiede C, Koch S, Creutzig E, et al. Prevalence and prognostic impact of NPM1 mutations in 1485 adult patients with acute myeloid leukemia (AML). *Blood*. 2006;107:4011-4020.
- Thiede C, Steudel C, Mohr B, et al. Analysis of FLT3-activating mutations in 979 patients with acute myelogenous leukemia: association with FAB subtypes and identification of subgroups with poor prognosis. *Blood*. 2002;99:4326-4335.
- Thomas X, Boiron JM, Huguet F, et al. Outcome of treatment in adults with acute lymphoblastic leukemia: analysis of the LALA-94 trial. *J Clin Oncol*. 2004;22:4075-4086.
- Tomlins SA, Rhodes DR, Perner S, et al. Recurrent fusion of TMPRSS2 and ETS transcription factor genes in prostate cancer. *Science*. 2005;310:644-648.
- Valk PJM, Verhaak, RGW, Beijen MA, et al. Prognostically useful gene-expression profiles in acute myeloid leukemia. *New England Journal of Medicine*. 2004;350:1617-1628.
- Van Limbergen H, Poppe B, Michaux L, et al. Identification of cytogenetic subclasses and recurring chromosomal aberrations in AML and MDS with complex karyotypes using M FISH. *Genes Chromosomes Cancer*. 2002;33:60-72.
- Vitale A, Guarini A, Ariola C, et al. Adult T-cell acute lymphoblastic leukemia: biologic profile at presentation and correlation with response to induction treatment in patients enrolled in the GIMEMA LAL 0496 protocol. *Blood*. 2006;107:473-479
- Wassmann B, Pfeifer H, Goekbuget N, et al. Alternating versus concurrent schedules of imatinib and chemotherapy as front-line therapy for Philadelphia-positive acute lymphoblastic leukemia (Ph+ ALL). *Blood*. 2006;108:1469-1477.
- Weng AP, Ferrando AA, Lee W, et al. Activating mutations of NOTCH1 in human T cell acute lymphoblastic leukemia. *Science*. 2004;306:269-271.
- Whitman SP, Archer KJ, Feng L et al. Absence of the wild-type allele predicts poor prognosis in adult de novo acute myeloid leukemia with normal cytogenetics and the internal tandem duplication of FLT3: a Cancer and Leukemia Group B study. *Cancer Research*. 2001;61:7233-7239.
- Yanada M, Jinnai I, Takeuchi J, et al. Clinical features and outcome of T-lineage acute lymphoblastic leukemia in adults: A low initial white blood cell count, as well as a high count predict decreased survival rates. *Leuk Res*. 2007;31:907-914.
- Youn BS, Mantel C, Broxmeyer HE. Chemokines, chemokine receptors and hematopoiesis. *Immunol Rev*. 2000;177:150-174.

11. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. med. Dr. h. c. Eckhard Thiel. Er hat meinen Werdegang seit Beginn meiner wissenschaftlichen und ärztlichen Tätigkeit jederzeit großzügig unterstützt. Nach der Rückkehr aus meiner Postdoc-Zeit hat er mich erneut in seine Abteilung aufgenommen und mir die Rahmenbedingungen und Freiräume für den Aufbau einer eigenen Arbeitsgruppe gegeben. So unterstütze er mich, selbstständig und eigenständig meinen klinischen und wissenschaftlichen Werdegang zu gestalten.

Prägend war insbesondere der Forschungsaufenthalt bei Herrn Professor Albert de la Chapelle und Frau Professor Clara Bloomfield in Columbus, Ohio. Neben der umfangreichen wissenschaftlichen Förderung habe ich die nachhaltige Betreuung als außergewöhnlich erleben dürfen und bin ihnen beiden für die vielen Erfahrungen, Eindrücke und das Erleben ihrer einzigartigen Persönlichkeiten sehr dankbar. Ganz besonders freut es mich, dass diese Freundschaft auch weiterhin über den Atlantik fortbesteht.

Von ganzem Herzen möchte ich mich bei Herrn Professor Wolf-Karsten Hofmann bedanken, der mir mit unbegrenzter wissenschaftlicher und persönlicher Unterstützung seit der Rückkehr aus Ohio immer konstruktiv und ermutigend zur Seite stand und steht; ohne ihn wäre vieles so nicht möglich gewesen. Darüber hinaus hat er den gemeinsamen wissenschaftlichen und klinischen Alltag mit Freuden und viel Humor stets bereichert.

Besonderer Dank gilt auch meiner Arbeitsgruppe für die Unterstützung bei den bisherigen Forschungsprojekten, wie auch für das Vorantreiben der ausstehenden Vorhaben: Ebru Coskun, Sandra Heesch, Liliana Mochmann, Cornelia Schlee, Jutta Ortiz Sanchez, Julia Thibaut.

12. ERKLÄRUNG

§ 4 Abs. 3 (k) der HabOMed der Charité

Hiermit erkläre ich, dass

weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wird bzw. wurde,

welchen Ausgang ein durchgeführtes Habilitationsverfahren hatte,

die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden,

mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

.....

Datum

.....

Unterschrift