

Ressortforschungsberichte zur kerntechnischen Sicherheit und zum Strahlenschutz

**Nachweis von chromosomalen Translokationen durch
genomische PCR zur Identifizierung prä-leukämischer Zellen
bei Kindern - Pilotstudie zur Entwicklung und Validierung
geeigneter Sonden
Vorhaben 3612S70019**

**Auftragnehmer:
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Medizinische Fakultät**

**A. Borkhardt
R. Slany**

**Das Vorhaben wurde mit Mitteln des Bundesministeriums für Umwelt, Naturschutz, Bau und
Reaktorsicherheit (BMUB) und im Auftrag des Bundesamtes für Strahlenschutz (BfS) durchgeführt.**

Dieser Band enthält einen Ergebnisbericht eines vom Bundesamt für Strahlenschutz im Rahmen der Ressortforschung des BMUB (UFOPLAN) in Auftrag gegebenen Untersuchungsvorhabens. Verantwortlich für den Inhalt sind allein die Autoren. Das BfS übernimmt keine Gewähr für die Richtigkeit, die Genauigkeit und Vollständigkeit der Angaben sowie die Beachtung privater Rechte Dritter. Der Auftraggeber behält sich alle Rechte vor. Insbesondere darf dieser Bericht nur mit seiner Zustimmung ganz oder teilweise vervielfältigt werden.

Der Bericht gibt die Auffassung und Meinung des Auftragnehmers wieder und muss nicht mit der des BfS übereinstimmen.

BfS-RESFOR-112/16

Bitte beziehen Sie sich beim Zitieren dieses Dokumentes immer auf folgende URN:
urn:nbn:de:0221-2016082614074

Salzgitter, Sep. 2016

BfS-Vorhaben:

**Validierung der GIPFEL-Methodik an Leukämie-
Primärmaterial von Kindern mit Translokation t(1;19);
t(4;11), t(9;11); t(11;19) und t(12;21)**

Lisa Füller¹, Daniel Schäfer², Ute Fischer², Pina Krell², Arndt Borkhardt², Robert Slany¹

¹ Institut für Genetik, FAU Erlangen;

² Klinik für Kinder-Onkologie, -Hämatologie und Klinische Immunologie,
Universitätsklinikum Düsseldorf, Düsseldorf

Inhalt:

	Seite
I. Kurze Darstellung	
1. Aufgabenstellung	4
2. Voraussetzungen, unter denen das FE-Vorhaben durchgeführt wurde	5
3. Planung und Ablauf des Vorhabens	6
4. Stand der Wissenschaft und Technik	8
II. Eingehende Darstellung	
1. Erzielte Ergebnisse	12
2. Voraussichtlicher Nutzen, Verwertbarkeit der Ergebnisse	23
III. Anhang	25
1. Tabellen	25
Tabelle 1: GIPFEL PCR-Primer	25
Tabelle 2: Multiplexing-Strategie für die GIPFEL-Analysen	29
Tabelle 3: Joining Sequenzen für jedes Primerpaar	31
2. Literatur	35

I.1 Aufgabenstellung

Es soll eine Methode zur verlässlichen und hochsensitiven Detektion von chromosomalen Translokationen $t(1;19)$; $t(4;11)$, $t(9;11)$; $t(11;19)$ und $t(12;21)$ in klinischen Proben zum Screenen gesunder Kinder lange vor Ausbruch einer akuten Leukämie auf Basis einer genomischen PCR entwickelt werden.

AP1: Aufarbeitung des relevanten Standes von Wissenschaft und Technik

In AP1 sollen die laufenden Arbeiten zur Detektion von genomischen Translokationsbruchpunkten und ihre Anwendbarkeit mit Vor- und Nachteilen zusammengefasst werden. Durch Datenbankrecherche soll eine Gesamtübersicht von bereits veröffentlichten Bruchpunkten und ihre Evaluierung im Hinblick auf die neu konzipierte GIPFEL Methode („*genomische inverse PCR für die Erfassung von ligierten Bruchpunkten*“, Englisch: „*genomic inverse PCR for evaluation of ligated breakpoints*“) erfolgen. Es sollen genomische Restriktionskarten der betroffenen Regionen für die Translokationen $t(4;11)$, $t(11;19)$, $t(9;11)$, $t(12;21)$, und $t(1;19)$ angefertigt werden, um nachfolgend genaue Vorhersagen der entsprechenden Ligationsprodukte aus diesen Karten ableiten zu können. Ein computergestütztes Design von bis zu 3 Primerpaaren pro Translokations-Bruchpunkt und je einem zugeordneten „nested inner“ Primerpaar und eine Abschätzung der Abdeckung (d.h. des Prozentsatzes der damit detektierbaren Translokationsereignisse) anhand der veröffentlichten Bruchpunkte erfolgen. Die Analyse soll durch das Design von Kontrollprimern, die das nicht rearrangierte genomische (Wildtyp-)Fragment nachweisen, intern kontrolliert werden.

AP2: Entwicklung geeigneter Primer für häufig auftretende Translokationen bei Leukämie im Kindesalter

Zur Entwicklung und Optimierung der GIPFEL Methode sollen folgende Einzelschritte durchgegangen werden, die in der Ausarbeitung eines standardisierten sensitiven Experimentalprotokolls für jede der fünf Translokationen münden sollen. Es sollen die Experimentalbedingungen für: (1) die Ausgangsmenge an Zellen, (2) den Restriktionsenzymverdau (Dauer, Konzentration Enzym), (3) die Ligationsbedingungen (Dauer, Menge Enzym, Temperatur), (4) den

Exonukleaseverdau (Konzentration Enzym, Art der Exonuklease), (5) die DNA-Reinigung, und (6) die PCR Bedingungen optimiert werden. Der Test von bis zu drei Primerpaaren pro Translokation auf Generierung von Amplifikaten unter obigen optimierten Bedingungen sowie die analoge Überprüfung der Kontrollprimer soll danach erfolgen.

AP3: Validierung der GIPFEL-Methodik an Leukämie-Primärmaterial von Kindern mit Translokation t(1;19); t(4;11), t(9;11); t(11;19) und t(12;21)

Zur Vorbereitung von populationsbasierten Untersuchungen in verschiedenen Bevölkerungsgruppen und in Ländern mit unterschiedlichem Industrialisierungsgrad soll die GIPFEL-Methodik an primären Leukämieproben und entsprechenden Negativkontrollen validiert werden. Es sollen Zellen oder genomische DNA von Leukämie-Primärproben verwendet werden, deren Translokationen standardisiert mittels Zytogenetik, RT-PCR und FISH von einem zytogenetischen Labor nachgewiesen wurden.

Hierbei soll das qualitative Ergebnis der GIPFEL-Methode (PCR Bande von erwarteter Länge) dokumentiert und anhand eines internen Standards und einer Korrelation zu den bekannten Parametern der Evaluationsproben (% Blastenzellen in der Probe) quantifiziert werden. Die Sensitivität und Spezifität der Methode soll bestimmt werden. Abschließend soll ein zusammenfassender Bericht erstellt werden, in dem das GIPFEL-Protokoll an das BfS für populationsbasierte Folgeuntersuchungen übergeben wird.

2. Voraussetzungen, unter denen das FE-Vorhaben durchgeführt wurde

Die Antragsteller besitzen durch Veröffentlichungen in internationalen Fachzeitschriften nachgewiesene klinische Expertise in pädiatrischer Hämatologie und Onkologie, sowie experimentelle Expertise im molekularbiologischen Nachweis genomischer Translokationen. Geschultes Personal und technische Expertise in den Methoden, die der GIPFEL-Methode zu grunde liegen (Ganz-Genom-Amplifizierung, Restriktionsverdau, Zirkularisierung genomischer DNA-Fragmente, DNA-Präzipitation, PCR, RealTime-PCR) ist in den Laboren der Antragsteller vorhanden. Zugang zu den geforderten primären Translokations-positiven Leukämieproben und

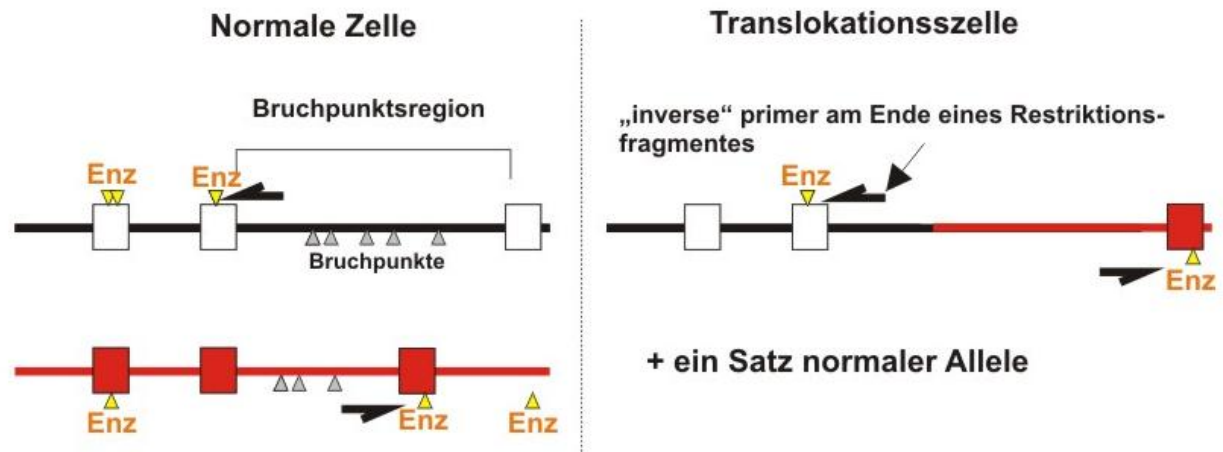
entsprechenden negativen Kontrollen ist durch die Kooperation mit Prof. Martin Stanulla und der BFM-Studiengruppe gegeben. Translokations-tragende und negative Zelllinien zur Austestung der Methode waren bereits vorhanden. Ein Ethikvotum mit der Erlaubnis zur Verwendung des Probandenmaterials zur Durchführung des Translokations-Screenings lag vor.

3. Planung und Ablauf des Vorhabens

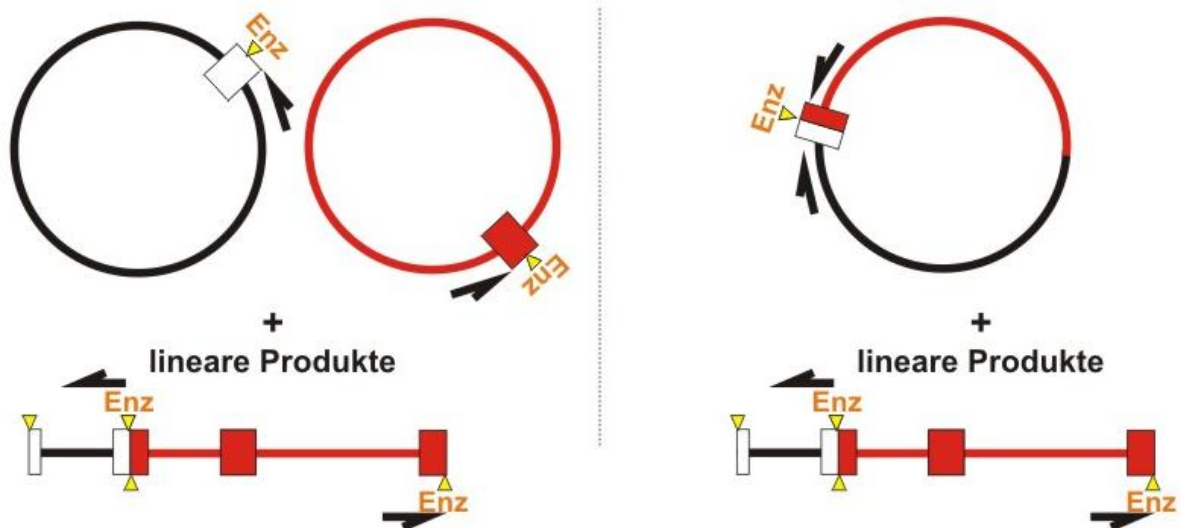
Zur verlässlichen und hochsensitiven Detektion von chromosomalen Translokationen in klinischen Proben lange vor Ausbruch einer akuten Leukämie wurde im Rahmen dieses Projektes die Methode der „*genomischen inversen PCR für die Erfassung von ligierten Bruchpunkten*“ (GIPFEL) (Englisch: „*genomic inverse PCR for evaluation of ligated breakpoints*“) entwickelt und optimiert.

Diese Methode ist in Abbildung 1 graphisch dargestellt. Der Schlüsselschritt der GIPFEL Methode ist die Detektion eines, für jede Translokation charakteristischen, Ligationsproduktes, das nach Restriktionsspaltung und Religation von genomischer DNA entsteht und dessen Sequenz exakt und unabhängig von der genauen Lage des Bruchpunktes vorhergesagt werden kann. Damit werden kurze Amplikons möglich, die sich auch über TaqMan Proben oder SYBR-Green basierte Methoden sehr genau quantifizieren lassen. Die Primer, sowie die Methode sollen zunächst an einer beliebigen Zelllinie mit der entsprechenden Translokation optimiert, sowie Sensitivität, und Genauigkeit exakt bestimmt werden. Dies ist möglich, da für die Entstehung des Ligations- und Amplifikationsproduktes die genaue individualspezifische genomische Lage des Bruchpunktes keine Rolle spielt. In einem zweiten Schritt soll die Methode an primären Patientenproben von Leukämien mit bekannten Translokationen sowie entsprechenden negativen Kontrollen in einer Blind-Studie getestet werden.

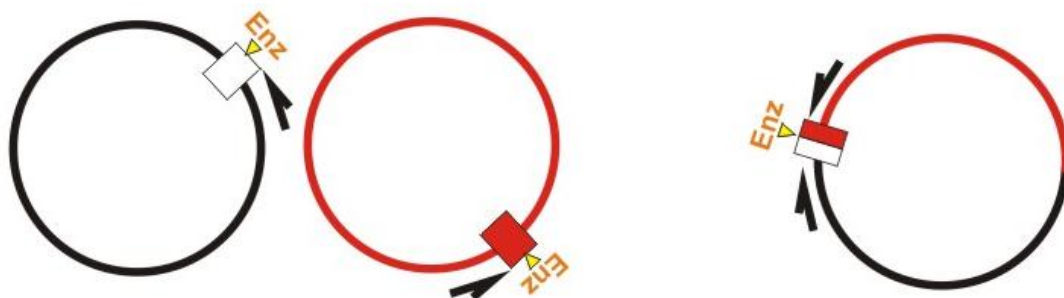
a. Ausgangssituation:



b. Restriktionsverdau und Rezirkularisierung:



c. Entfernung linearer Produkte durch Exonukleaseverdau:



d. Quantifizierung der Bruchpunkts DNA mit real time PCR

Abbildung 1: Ablaufdiagramm der genomischen, inversen PCR für die Erfassung von ligierten Bruchpunkten (GIPFEL).

4. Stand der Wissenschaft und Technik

Vom BfS/BMU wurde eine Studie zu Kinderkrebs in der Nähe von Kernkraftwerken (KiKK) gefördert, bei der ein Zusammenhang zwischen der Nähe des Wohnorts zu einem Atomkraftwerk und der Entstehung von Leukämie bei Kindern unter 5 Jahren festgestellt wurde ¹. Daneben gibt es aus epidemiologischen Studien konsistente Hinweise, dass sich das Leukämierisiko bei Kindern erhöht, wenn diese mit niederfrequenten Magnetfeldern in einem Intensitätsbereich deutlich unterhalb der Grenzwerte exponiert sind. In beiden Fällen lässt sich das erhöhte Risiko mit dem derzeitigen wissenschaftlichen Kenntnisstand über Strahlenwirkung nicht erklären. Daher ist es notwendig, durch weitere Studien die Entstehung und Entstehungsmechanismen von Leukämie im Kindesalter zu untersuchen, um einen Zusammenhang mit ionisierender und nicht-ionisierender Strahlung zu erkennen oder auszuschließen. Dazu wurden vom BfS bereits Workshops zu Ursachen der Leukämie und zur Erarbeitung einer Forschungsagenda ² durchgeführt.

Die akute lymphoblastische Leukämie (ALL) bei Kindern ist gekennzeichnet durch das Auftreten wiederkehrender chromosomaler Translokationen.³ Die häufigste dieser Translokationen, die in 25% der B-Zell ALLs im Kindesalter nachzuweisen ist führt zur Fusion der Gene ETV6 und RUNX1 zu dem chimären Transkriptionsfaktor ETV6-RUNX1. So ein Ereignis scheint der erste Anstoß zu sein, damit sich eine normale hämatopoietische Vorläufer- oder Stammzelle in eine prä-leukämische Zelle umwandelt. Man geht davon aus, dass prä-leukämische Vorläufer-Zellen über lange Zeit persistieren können, bevor sie durch eine sekundäre Mutation zum Ausbruch einer akuten Leukämie führen können. Diese sekundären Mutationen entstehen möglicherweise spontan oder durch Umwelteinwirkungen, weshalb das Alter der Kinder bei Ausbruch einer Leukämie erheblich variieren kann. In einer retrospektiven Studie konnte gezeigt werden, dass prä-leukämische Klone, die sich durch spezifische Translokationen auszeichnen, bereits in neonatalen Blutproben von Kindern vorhanden waren, bei denen erst Monate oder Jahre später eine ALL diagnostiziert wurde.⁴ Daraus wurde geschlossen, dass das Vorhandensein Leukämie-spezifischer Translokationen 100fach höher sein könnte als die allgemeine Inzidenzrate für ALL. Dies würde bedeuten, dass Translokationen tragende Klone natürlicherweise ausgelöscht werden, bzw. durch weitere Faktoren zur Entwicklung von Leukämie führen können. Die Daten weisen auf eine bimodale

Ereigniskette hin, die zur Entwicklung von ALL bei Kindern führt. Allerdings wurde die Studie von Mori et al. bisher nicht erweitert oder wiederholt und neue Daten von Lausten-Thomsen et al.⁵⁻⁷, Olsen et al.⁸ und Kusk et al.⁹, sowie eine Studie von Olsen et al.¹⁰ an Erwachsenen Blutspendern bestätigen die Daten bisher nicht. Um diese Ergebnisse zu überprüfen, ist es notwendig, bevölkerungsbasierte Studien an Blutproben durchzuführen, um die Häufigkeit prä-leukämischer Translokationen festzustellen.

Eine Reihe von Methoden ist bereits entwickelt worden, um Translokationen nachzuweisen. Cytogenetik und *fluorescent in situ hybridization* (FISH) werden allgemein verwendet, um das Vorhandensein und die Struktur genetischer Alterationen nachzuweisen.¹¹⁻¹³ Allerdings werden für beide Methoden mitotische Zellen benötigt und es sind aufwändige experimentelle Verfahren sowie erfahrenes Fachpersonal für die Durchführung erforderlich. Alternative Methoden, die archiviertes Material nutzen können wurden ebenfalls entwickelt. Da die meisten klinisch relevanten Translokationen Fusionsproteine mit einem durchgängigen Leseraster generieren, wird nur eine limitierte Zahl an Exonen verbunden und die Länge der resultierenden mRNA ist relativ kurz. Ein geeignetes Verfahren das RNA/cDNA als Template nutzen kann, ist die PCR-Technik, durch die zudem relativ schnell viele Proben untersucht werden können. Die Zahl an nötigen Primerpaaren zur Untersuchung einer bestimmten Translokation auf RNA/cDNA-Ebene ist hierbei begrenzt und die Größe der Amplifikationsprodukte kann berechnet werden.

Die Detektion von niedrig frequenten chromosomalen Translokationen in klinischen Proben vor Entstehung einer akuten Leukämie ist allerdings eine methodisch-technische Herausforderung. RNA ist sehr instabil und nicht geeignet für den retrospektiven Nachweis von Translokationsereignissen.¹⁴ Deshalb sind auch die auf RNA basierenden, entwickelten RT-PCR-Methoden hier nicht einsetzbar.¹⁵⁻²⁴ Im Gegensatz ist DNA sehr stabil und kann auch retrospektiv aus archivierten und fixierten Proben gewonnen werden. Daher muss der Nachweis auf DNA-Ebene erfolgen. Auch die Viabilität der Spenderzellen spielt keine Rolle. In der Praxis der geplanten weiterführenden Studie, die populationsbasiert eine große Anzahl von Proben untersuchen möchte, die notwendigerweise eine Probennahme durch eine Vielzahl von nicht mit RNA Konservierung vertrauten Personen erfordert, eignet sich daher unserer Auffassung nach nur DNA als Untersuchungsmaterial. Schlussendlich sind nur DNA-Fusionsbruchpunkte individual-bzw. patientenspezifisch und lassen

damit Kontaminationen bzw. unspezifische Amplifikationen als „falsch-positive“ Befunde erkennen. Aufgrund der Natur der chromosomalen Translokationen, die oft innerhalb eines mehrere Kilobasen-großen Bruchpunktbereiches stattfinden, entstehen an der Bruchstelle DNA Sequenzen, die zunächst nicht individualspezifisch auf 1 Basenpaarniveau vorhersagbar sind. Dies setzt die Verwendung einer unhandlichen Zahl an Primern oder den Einsatz von PCR-Techniken voraus, die einen großen DNA-Bereich amplifizieren. Es wurden verschiedene Methoden entwickelt, die dieses Faktum in Erwägung ziehen und die versuchen, über besondere Abwandlungen der PCR alleine mit den bekannten Sequenzen eines Translokationspartners die Translokation nachzuweisen.

Hierzugehört auch die sogenannte „long distance inverse“ LDI-PCR.^{25, 26} Dabei wird über einen Restriktionsverdau die genomische DNA gespalten, danach zirkularisiert und mit Hilfe von sogenannten inversen Primern im bekannten Bereich eines Partners die genomische Sequenz des anderen fusionierten Bereiches amplifiziert. Während diese Methode den Vorteil hat auch unbekannte sehr selten vorkommende Partnergene (z.B. im MLL-Gen-Locus) identifizieren zu können, ist sie unserer Meinung nach für die geplante Studie aus folgenden Gründen nicht geeignet.

Es müssen sehr lange Fragmente im Bereich von einigen Kilobasen amplifiziert werden und die Länge der erwarteten Amplikons ist unbekannt. Da PCR Methoden bekanntermaßen mit der Länge der zu amplifizierenden DNA unzuverlässig und wenig sensitiv werden, kann die Abwesenheit eines PCR-Produktes nicht a priori als Abwesenheit der Translokation interpretiert werden. Es gibt auch keinerlei methodische Möglichkeit, dies mit einer anderen, unabhängigen Methode zu überprüfen. Alle bisherigen Studien mit dieser Methode wurden zudem erst nach eindeutiger Diagnose der Translokation durch andere Techniken (z.B. FISH) retrospektiv in Material aus einer akuten Erkrankung mit hohem Blastenzellgehalt (= viele translokationstragende Zellen angereichert) durchgeführt. Im Lichte dieser Faktoren ist die LDI-PCR ein zu wenig sensitives und damit untaugliches Verfahren für prospektive Screeninguntersuchungen in denen nur sehr wenige translokationstragende Zellen nachgewiesen werden sollen.

Da jede individuelle Translokation selbst zwischen identischen Translokationspartnern ein Amplikon unterschiedlicher Länge ergibt, ist eine exakte Quantifizierung der Anzahl von translokationstragenden Zellen, sowie eine valide Berechnung der Sensitivität und Qualität dieses Ansatzes praktisch unmöglich.

Daher war die Entwicklung einer neuen Nachweisttechnik (GIPFEL) und eine Evaluierung der genomischen Primer notwendig.

II. Eingehende Darstellung

1. Erzielte Ergebnisse

Zur Vorbereitung der GIPFEL-Analysen wurden zunächst genomische Restriktionskarten der untersuchten Translokationen angefertigt. Durch Literaturrecherche wurden die Regionen identifiziert, die bei Translokation der Gene von Strangbrüchen betroffen sind, die Bruchpunktregionen (*breakpoint cluster regions*, BCR). Die Translokation t1;19 fusioniert die Gene PBX1 und TCF3 (syn. E2A), wobei die Bruchpunkte zwischen Exon 1 und 2 beim PBX1- bzw. zwischen Exon 13 und 14 beim TCF3-Gen liegen (Abbildung 2).²⁷⁻³¹ Die Fusion codiert für den chimären Transkriptionsfaktor TFC3-PBX1. Das Restriktionsenzym *SacI* erkennt spezifische Schnittstellen oberhalb (TCF3, 1151 bp) bzw. unterhalb (PBX1, 1131 bp) der jeweiligen BCR. In Kombination mit spezifischen Primer, die über die Schnittstellen PCR-Produkte generieren können, kann eine Translokation nach *SacI* Restriktionsenzymsschnitt, Ligation des DNA-Fragmentes und anschließender PCR über die Ligationsstelle hinaus ohne Kenntnis der exakten Bruchpunkte mittels GIPFEL nachgewiesen werden.

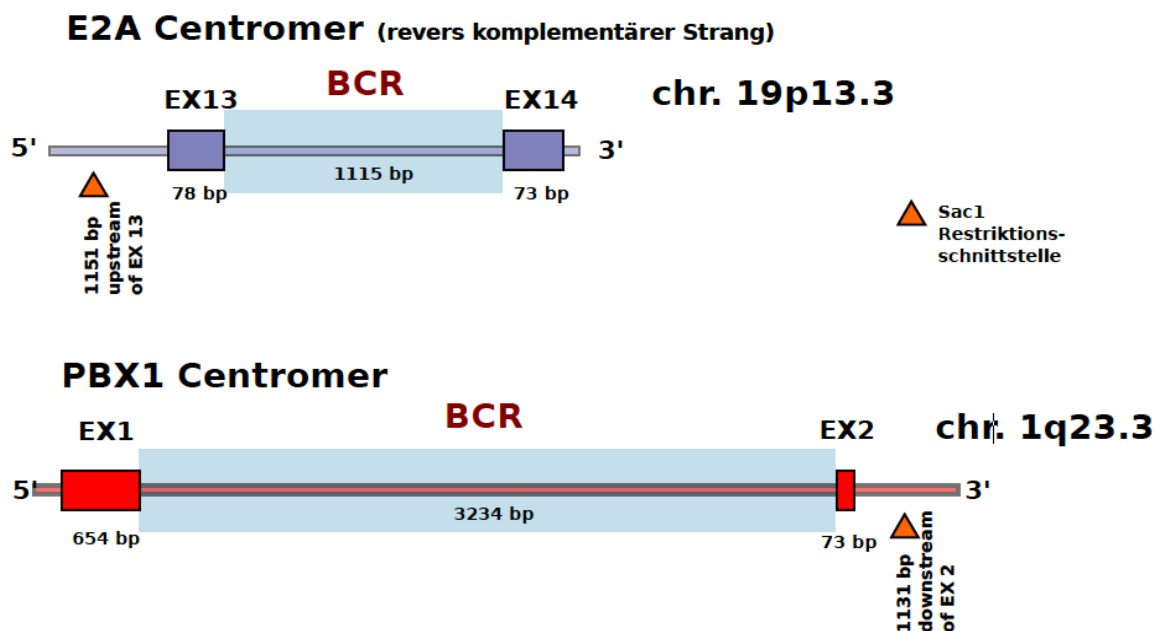


Abbildung 2: Genomische Restriktionskarte der Gene TCF3 (syn. E2A) und PBX1. Die Bruchpunktregionen (BCR) sind in hellblau unterlegt. Exone sind durch Boxen gekennzeichnet. *SacI*-Schnittstellen sind durch Pfeilköpfe markiert. Die Distanzen sind in Basenpaaren (bp) angegeben.

Die TEL-AML1-Fusion ist die häufigste und damit für zukünftige populationsbasierte Fragestellungen wichtigste Rearrangement. Durch Literaturrecherche wurden zunächst die BCRs in beiden Genen identifiziert.^{32, 33} Bioinformatische Analysen haben die Restriktionsenzyme **Mlu1**, **Asc1** als ideal für die GIPFEL-Methodik zum genomischen TEL-AML1 Nachweis angezeigt. Sie erzeugen bei Restriktion denselben 5' Überhang und lassen somit eine leichte Zirkularisierung der DNA-Enden von TEL-AML1 erwarten. Mit der Auswahl von **Mlu1**, **Asc1** ist außerdem sichergestellt, dass keines der beiden Enzyme eine Restriktion in der BCR des jeweils anderen Translokationspartners vornimmt.

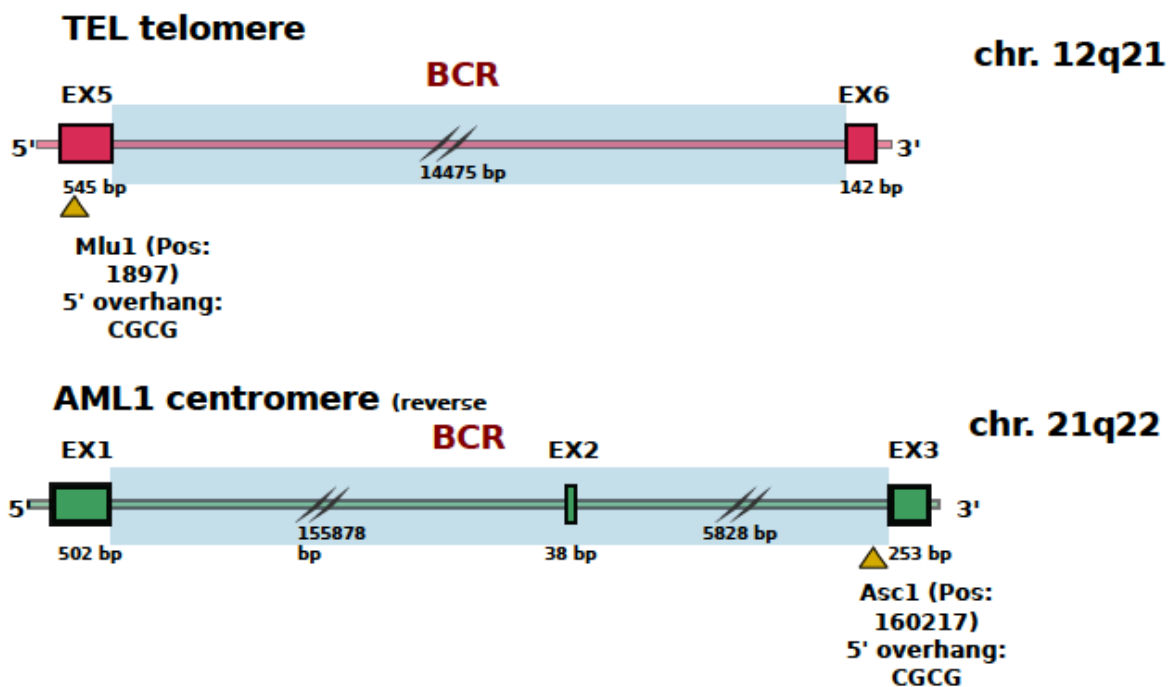


Abbildung 3: Genomische Restriktionskarten der Translokationspartner ETV6-RUNX1 (syn. TEL-AML1). BCR: Breakpoint Cluster Region – Bruchpunkt Cluster Region (hinterlegt in blau), TEL (ETV6), AML1 (RUNX1) - In Klammern die offiziellen Namen des Humanen Genom Konsortium Komitee (HGNC: <http://www.genenames.org/>).

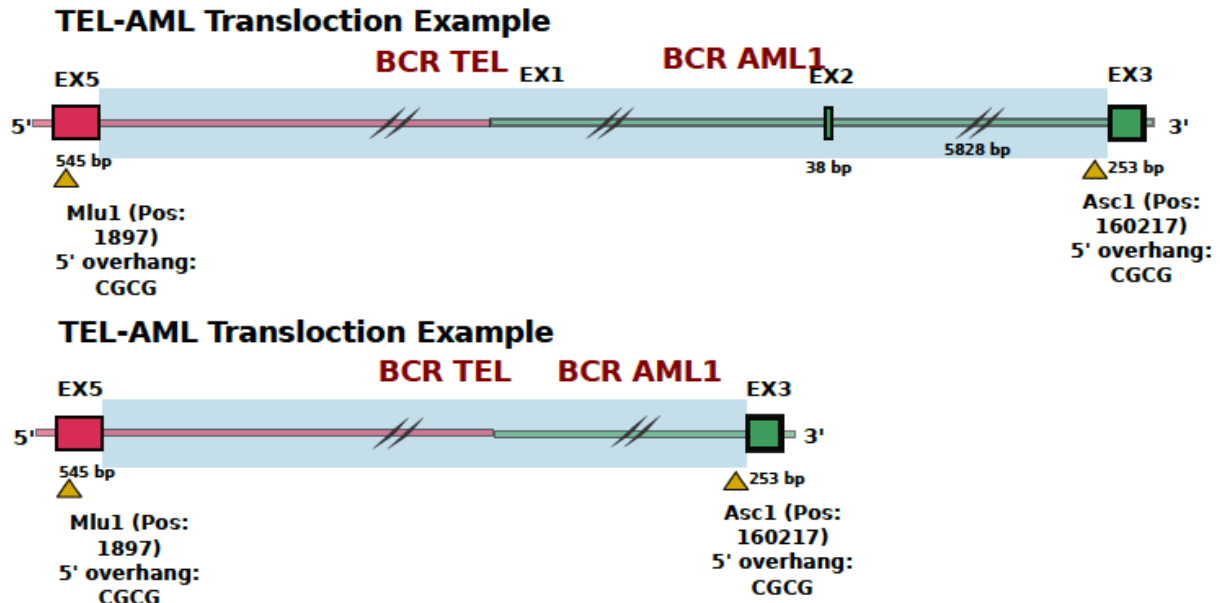


Abbildung 4: Mögliche Translokationsergebnisse am Beispiel ETV6-RUNX1 (syn. TEL-AML1). Abhängig von der Position des Bruchs im RUNX1-Gen (in Intron 1 oder in Intron 2), kann Exon 2 in das entstehende Produkt eingeschlossen (obere Abbildung) oder ausgeschlossen (untere Abbildung) werden.

Nach Analyse der BCRs des MLL-Locus und der rearrangierten Partnergene AF4, AF9 und ENL wurde BamHI als geeignetes Restriktionsenzym für die GIPFEL-Methode ausgewählt.³⁴⁻⁴³ Die bioinformatisch ausgewählten Restriktionsenzyme wurden experimentell getestet. Hier zeigte sich, dass die Enzyme BamHI und SacI für die Analyse der MLL- bzw. TCF3-PBX1-Translokationen geeignet waren. Allerdings musste für die Translokationen t12;21 mit MfeI ein neues Enzym ausgesucht werden, da die Effizienz des Restriktionsverdau mit MluI und AscI nicht ausreichend war.

Die konzipierte Methode deckt die BCRs der Translokationspartner zu >98% ab. Es entstehen nur sehr kurze „blind spots“ von <1 kb an denen ein Bruch nicht detektiert werden könnte. In diesen Regionen wurde bisher kein Bruch publiziert.

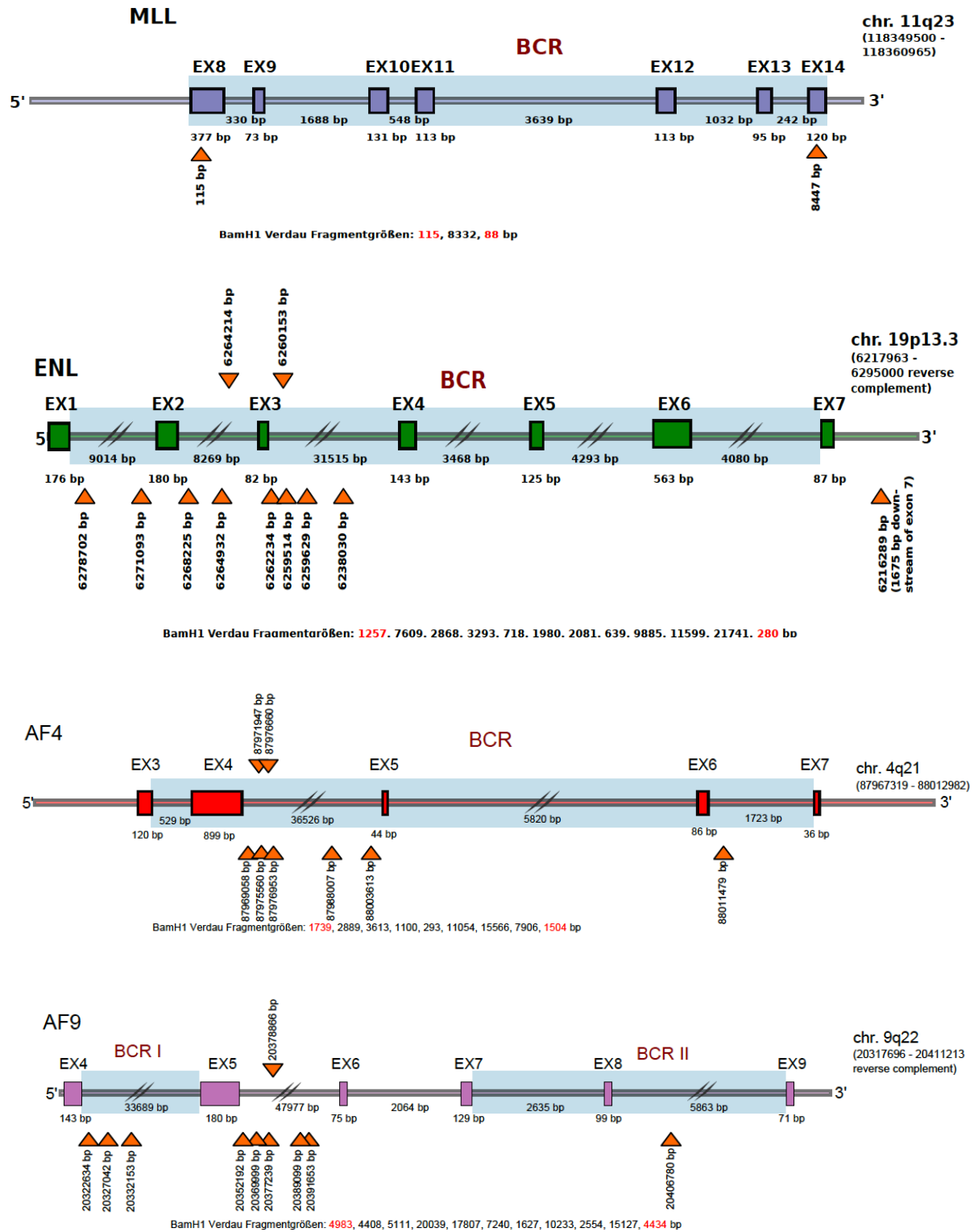


Abbildung 5: Restriktionskarte MLL und Translokationspartner ENL, AF4 und AF9.

Zur verlässlichen und hochsensitiven Detektion von chromosomalen Translokationen in klinischen Proben lange vor Ausbruch einer akuten Leukämie wurde im Rahmen dieses Projektes die GIPFEL-Methode entwickelt und optimiert. Ein finales Protokoll wurde erstellt und ist im Folgenden beschrieben.

GIPFEL-Protokoll:

1. DNA-Isolation

Zwischen 1 und 5 Millionen Zellen pro Probe wurden in PBS gewaschen. Mit dem QIAamp® DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Hilden) wurde die genomische DNA extrahiert. Die Elution der DNA erfolgte in 200 µl des im Kit enthaltenen Puffers AE.

2. BamHI/SacI/MfeI-Restriktion

Die genomische DNA wurde einem Restriktionsverdau unterzogen. Dabei wurde BamHI für die MLL-Translokationen, SacI für die Translokation t(12;21) und MfeI für die Translokation t(1;19) eingesetzt.

Puffer NEB4	10 µl
DNA 2,5 µg	x µl
BamHI or SacI or MfeI HF	10 µl (200 U)
H ₂ O	x µl
finales Volumen	100 µl

Die Reaktionsansätze wurden 2 h bei 37°C im Wasserbad inkubiert. (Restriktionsenzyme und Puffer wurden von New England Biolabs (NEB, Frankfurt/Main) bezogen.)

3. Aufreinigung des Restriktionsansatzes

Zur Durchführung der Folgereaktionen war es nötig den Restriktionsansatz mit Hilfe des QIAquick® Gel Extraction Kits nach Angaben des Herstellers (Qiagen)

aufzureinigen. Dazu wurden zunächst 500 µl des im Kit enthaltenen Puffers PB zu den Restriktionsfragmenten pipettiert. Um die Ausbeute an längeren DNA-Fragmenten zu verbessern, wurde die DNA im letzten Schritt in 50 µl auf 60°C vorgewärmten, deionisiertem H₂O eluiert. Auch die verwendeten Säulen wurden vor dem Zentrifugationsschritt zur Elution der Probe 5 min auf 60°C vorgewärmt.

4. Ligation

Zur anschließenden Ligation der Fragmente wurde der aufgereinigte Restriktionsansatz vollständig eingesetzt und nach Herstellerangaben mit 800 U DNA-T4-Ligase (NEB) ligiert.

Aufgereinigter Restriktionsansatz	48 µl
H ₂ O, deionisiert	40 µl
Ligasepuffer (NEB)	10 µl
T4 DNA Ligase (400.000U/ml)	2 µl (800 U)
Finales Volumen	100 µl

Die Ligation wurde 2 h bei 24°C in einem Heizblock durchgeführt.

5. Exonuclease-Verdau

Im Ligationsansatz verbliebene, nicht ligierte lineare Fragmente wurden durch Inkubation mit Exonuclease III hydrolysiert. Zu 100 µl des Ligationsansatzes wurden 100 U (1 µl) Exonuclease III (NEB) gegeben und 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Exonuklease III 5 min bei 95°C inaktiviert. Die Inkubationen wurden im Wasserbad bzw. Heizblock durchgeführt.

6. DNA-Präzipitation

Die zirkularisierte DNA wurde durch anschließende Standard Ethanol- bzw. Isopropanol-Präzipitation gereinigt und konzentriert. Dazu wurden nach der Ligation zu dem Ansatz 10 µl 3 M Natriumacetat und 60 µl Isopropanol pipettiert und der Ansatz durch Invertieren gemischt. Es wurde 10 min bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend 30 min bei 20.000 x g und 4°C zentrifugiert, der Überstand verworfen.

Es wurde 200 µl kalter 70%-iger Ethanol zugegeben, 15 min bei 20.000 x g und 4°C zentrifugiert, der Überstand verworfen. Dieser Schritt wurde wiederholt. Das Pellet wurde 15 min bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend in 10 µl deionisiertem H₂O resuspendiert.

7. Semi-nested PCR

Zum indirekten Nachweis der chromosomalen Rearrangements wurden Real-Time-PCRs über die Ligationsstellen der zirkularisierten Fragmente durchgeführt. 5 µl der zirkularisierten, gereinigten DNA wurden als Template eingesetzt, das entspricht etwa $1,9 \times 10^5$ Genom-Äquivalenten.

PCR I, Prä-Amplifikation

Die erste PCR wurde mit dem Mastermix aus dem Brilliant II SYBR® Green QPCR Master Mix Kit (Agilent Technologies, St. Clara, CA) nach Herstellerangaben angesetzt.

Reaktionsansatz:		PCR-Programm:	
Mastermix	12,5 µl	95°C	12:30
Fw-Primer (1 µM)	2,5 µl	95°C	00:15
Rev-Primer (1 µM)	2,5 µl	64°C	00:30 x 22 bzw. x 25
DNA	5 µl	72°C	00:30
H ₂ O _{deion.}	2,5 µl		
Gesamtvolumen	25 µl		

MLL-Translokationen wurden mit 22, alle anderen Translokationen mit 25 Zyklen voramplifiziert. Aus dieser ersten PCR wurde jeweils 1 µl in die zweite PCR eingesetzt. Die Sequenzen, der jeweils verwendeten Primer und die Multiplexing-Strategie sind in Tabelle 1 und 2 im Appendix angegeben.

PCR II (Real-Time PCR)

Reaktionsansatz:		PCR-Programm:	
Mastermix	12,5 µl	95°C	12:30
Fw-Primer (1 µM)	2,5 µl	95°C	00:15
Rev-Primer (1 µM)	2,5 µl	64°C	00:30 x 45
Ref. Dye (1:500)	0,375 µl	72°C	00:30
Template aus PCR I	1 µl	95°C	00:30
H ₂ O _{deion.}	6,125 µl	70°C	00:30
Gesamtvolumen	25 µl	95°C	00:30

Zur Vorbereitung der populationsbasierten Untersuchungen wurde die GIPFEL-Methodik an primären Leukämieproben und entsprechenden Negativkontrollen validiert. Die Primärproben wurden von Prof. Dr. Martin Stanulla (MHH, Hannover) zur Verfügung gestellt und stammen aus dem zentralen Patientenkollektiv des BFM Studienregisters. Die Primärproben mit Blastenzahl von $\geq 70\%$ wurden im Vorfeld mittels Zytogenetik, RT-PCR und FISH charakterisiert.

Zur Validierung der GIPFEL-Methodik eingesetzte Primärproben:

Translokation	Fusionsgen	Primärproben	Detektion
t(4;11)	<i>MLL-AF4</i>	n=23	83%
t(9;11)	<i>MLL-AF9</i>	n=17	65%
t(11;19)	<i>MLL-ENL</i>	n=17	24%
t(1;19)	<i>TCF3-PBX1</i>	n=31	39%
t(12;21)	<i>ETV6-RUNX1</i>	n=61	64%

Die Validierungsexperimente wurden von dem Ausführenden „blind“, d.h. ohne Kenntnis der Probenidentität durchgeführt. Hierzu wurde je 1 µg genomische DNA wie im Protokoll beschrieben behandelt und die PCRs mit den entsprechenden Primerpaaren durchgeführt. Die Verifizierung der Proben, erfolgte in drei Schritten: (1) Produktentstehung in der RealTime-PCR, (2) Überprüfung der Masse des

entstandenen Produktes in der Agarosegelelektrophorese und (3) Sequenzierung des Produktes zur Überprüfung der DNA-Sequenz (Abbildung 6).

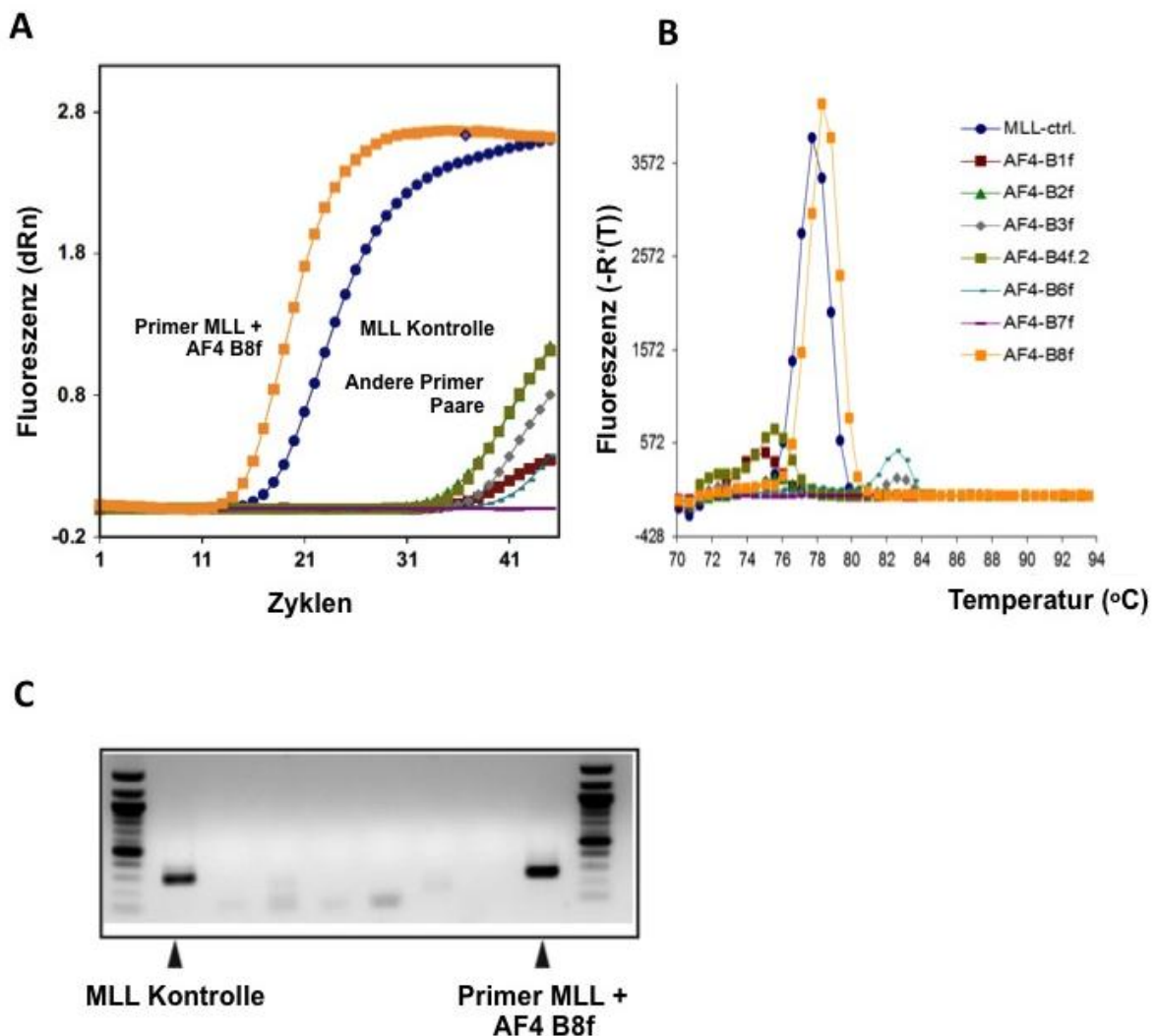


Abbildung 6: Die Abbildung zeigt das Ergebnis der GIPFEL-Analyse einer Patientenprobe mit MLL-AF4 Translokation. (A) RealTime-PCR Amplifikationskurven, (B) RealTime-PCR Dissoziationskurven. Verwendung des Primers AF4 B8f führt zur Synthese eines spezifischen Produktes das bereits nach 13 Zyklen den Schwellenwert übersteigt (gelbe Kurve). Eine positive Kontrolle (Nachweis des endogenen MLL-Gens als interner Standard, blaue Kurve) wird in jedem Versuch mitgeführt. Andere Primerpaare führen nicht zur Synthese spezifischer Produkte. Die zugehörigen Amplifikationskurven übersteigen den Schwellenwert daher erst nach mehr als 30 Zyklen und sind in der Dissoziationskurvendarstellung gut von spezifischen Signalen zu unterscheiden. (C) Validierung des Ergebnisses in der Agarosegelelektrophorese. Spezifische Produkte

wurden nur mit dem Primerpaar MLL und AF4 B8f, sowie dem internen Standard (MLL) nachgewiesen.

Durch die Amplifikation eines Produktes mit Primer AF4-B8f lässt sich der Bruchpunkt auf den Bereich zwischen den Schnittstellen B7 und B8 im AF4-Gen festlegen.

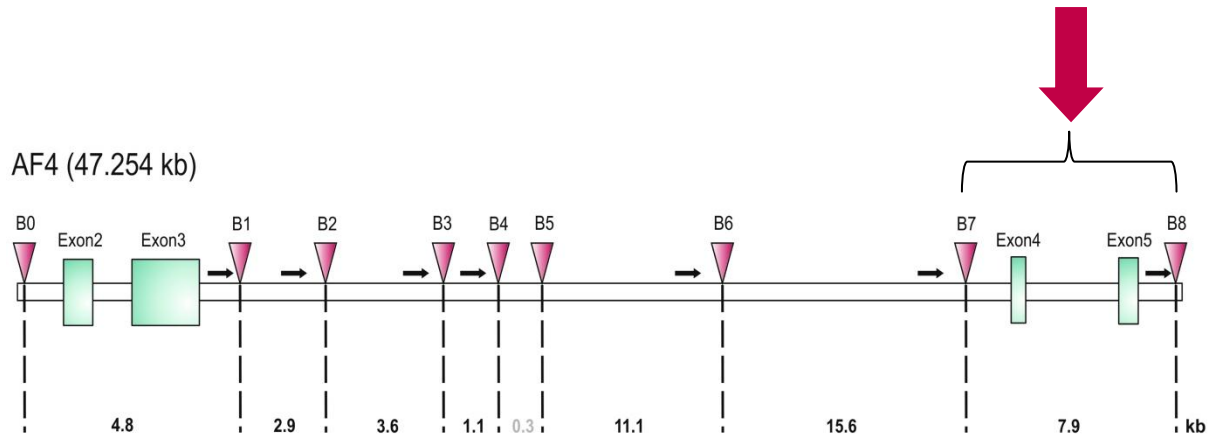


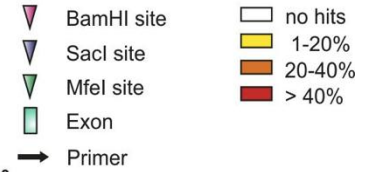
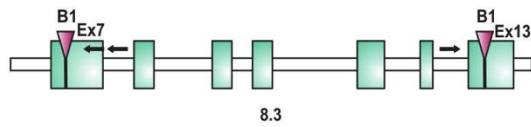
Abbildung 7: Approximierte Lage des Bruchpunktes in der analysierten Patientenprobe aus Abb. 6 zwischen den BamHI-Schnittstellen B7 und B8 (roter Pfeil). AF4-Exone sind als grüne Kassetten gekennzeichnet, BamHI-Restriktionsschnittstellen als rote Dreiecke und die verwendeten Primer in dem Genabschnitt als schwarze Pfeile.

Die Sensitivität des GIPFEL-Protokolls liegt bei 10^{-4} , d. h. unter 10.000 Zellen kann eine Translokation-tragende Zelle nachgewiesen werden. Die Detektionsrate in den Primärproben (24-83%, Tabelle 1) war abhängig von der untersuchten Translokation, d.h. hier spielen wahrscheinlich Sequenz-spezifische Unterschiede in das Ergebnis mit ein. In jeder der 5 Translokations-Kohorten befanden sich jeweils 5 negative Proben. Keine dieser Proben wurde als positiv detektiert, d.h. das GIPFEL-Protokoll ist sehr spezifisch. Die detektierten Bruchpunkte verteilten sich nicht zufällig, sondern traten in Clustern auf (Abbildung 8).

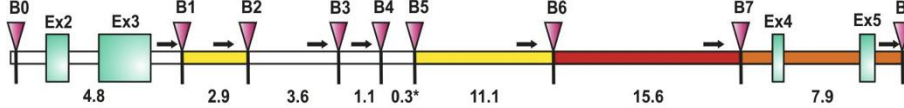
Das folgende Diagramm zeigt die Verteilung der von uns detektierten Bruchpunkte in den unterschiedlichen Translokationspartnergenen.

A

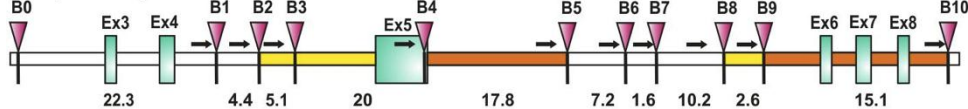
MLL (8.3 kb)



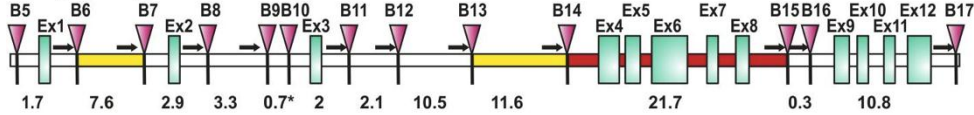
AF4 (47.254 kb)



AF9 (106.3 kb)

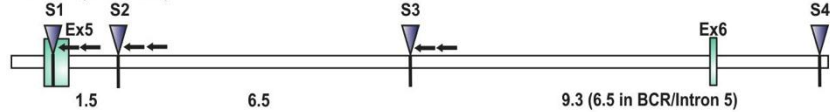


ENL (75.2 kb)

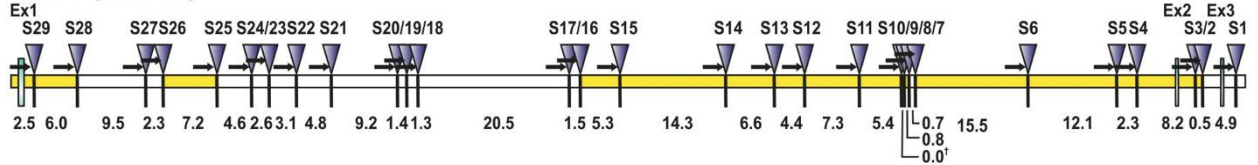


B

ETV6⁺ (14.5 kb)

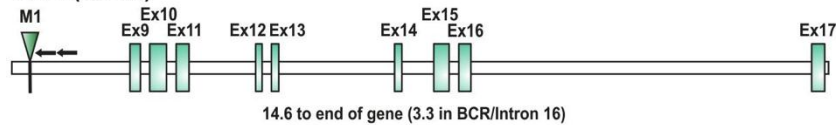


RUNX1 (156.0 kb)



C

TCF3 (3.3 kb)



PBX1 (229.2 kb)

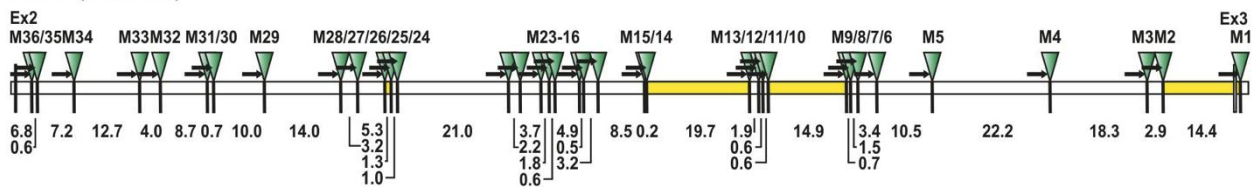


Abbildung 3: Darstellung der Häufigkeit der detektierten Bruchpunkte als Heatmap in der jeweils analysierten Region.

2. Voraussichtlicher Nutzen, Verwertbarkeit der Ergebnisse

Bisherige Untersuchungen weisen auf eine bimodale Ereigniskette bei der Entstehung der Leukämie im Kindesalter hin, bei der Translokations-tragende präleukämische Zellen spontan oder durch Umwelteinflüsse sekundäre Veränderungen erfahren, die zum Ausbruch der Leukämie führen. Erste Daten wiesen auf ein sehr hohes Vorkommen präleukämischer Klone bei Kindern hin, das mit den bisherigen Techniken nicht bestätigt werden konnte. Daher sollen in Zukunft unter Verwendung von Geburtskohorten retrospektiv populationsbasierte Untersuchungen anhand von archivierten Proben von Neugeborenen durchgeführt werden. Für diese weitergehenden Untersuchungen wird die GIPFEL-Methodik zur Verfügung gestellt.

Darüberhinaus stellt GIPFEL eine experimentell und klinisch interessante neue Methode zur Detektierung und Quantifizierung von Translokationen ohne vorherige Kenntnis der Bruchpunkte dar. 40% aller B-Zell-Leukämien und 30% aller Leukämien im Kindesalter können damit charakterisiert werden. Ähnlich aktueller Techniken zum Nachweis minimaler Tumor-Resterkrankungen kann GIPFEL sensitiv und sehr spezifisch 1 leukämische Zelle unter 10.000 normalen Zellen nachweisen. Dies ist in klinischen Settings z.B. für die prospektive Überprüfung von Patienten mit einem hohen Risiko zur Leukämieentwicklung (z.B. nach Behandlung mit Topoisomerase-Inhibitoren oder nach Bestrahlung), als zusätzliches diagnostisches Werkzeug von Interesse.

Die GIPFEL-Methode kann auch für jede andere rekurrente Translokation adaptiert werden, vorausgesetzt die Bruchpunktregion ist bekannt. Nachteilig ist, dass Brüche außerhalb der prädefinierten Bruchpunktregion nicht detektiert werden können. Auch

komplexere genomische Translokation unter Beteiligung mehrerer Gene⁴⁴ können der Detektion durch GIPFEL entgehen.

III. Anhang

1. Tabellen

Tabelle 1: GIPFEL PCR-Primer

Bezeichnung	detektiert	Sequenz (5'-3')	GC %	T _M °C	Länge [b]	PCR Produkt [bp]
MLL						
MLL-B1r.4	MLL äußerer P.	GCTTTCGTGGAGGAGGCTCAC	61.9	69.5	21	
MLL-B1r-n	MLL innerer P.	CTGCTTTTCTTTGGGGCAGGATC	52.2	62.4	23	
MLL-B2f.4	MLL Kontroll-P.	TGGGTGAGTTATACACATGATGC	43.4	63.5	23	301
AF4						
AF4-B1f	Bruchpunkte	CTGAAGATGCCTTCTCAGTCAG	50	60.3	22	361
AF4-B2f		TGTGGATTCTTTACTCCCTGTCC	47.8	60.6	23	336
AF4-B3f		GCCACACCATGTGCAGAGACC	61.9	63.7	21	402
AF4-B4f.2		CTTATAGTAGCCCAAGAGGAAAG	43.5	58.9	23	219
AF4-B6f		GTGTGTGTGCTTGTAGTCTTAGC	47.8	60.6	23	426
AF4-B7f		TTGTTCTATTGATTACCTTCGAC	37.5	63.0	24	257
AF4-B8f		GTATGGCAGGCATTGCATCCAC	54.5	70.5	23	265
AF9						
AF9-B1f.2	Bruchpunkte	TGTTTGTATTTTGCTTGTGTAAAGG	32	62.7	25	199
AF9-B2f.3		GTAATTTAATATAGATTATTGCAGG	24	54.1	25	169
AF9-B3f		ACAGTACAACCATCCAAGTCAGG	47.8	60.6	23	462
AF9-B4f		AGTGGACAAGATAAGAAGGCTCC	47.8	60.6	23	281
AF9-B5f		GTACCTGGCACATAGTTGGTAG	50	60.3	22	429
AF9-B6f.2		CCCCTGGAATGTCACGTTAGG	54.5	67.5	22	183
AF9-B7f		TGTCTTTAAGGAATGGAAAACCTGC	37.5	57.6	24	470
AF9-B8f		GAGGAATTACAGCTCTGAGCCC	54.5	62.1	22	287
AF9-B9f		TCGCTAGTGCATAGATTGTTAGG	43.5	58.9	23	318
AF9-B10f		GTTGTACCAGTTACAGTTCAACTG	41.6	59.2	24	317
ENL						
ENL-B6f	Bruchpunkte	GAGCTCCTCTGACTCCCTAGG	61.9	63.4	21	337
ENL-B7f		CTCTGCCTTCTTCTTGGAACC	54.5	67.1	22	369
ENL-B8f.2		CTCTCTGGACTCCTCTTAATACC	47.8	59	23	243
ENL-B9f		CACTTAGTGCTATGAAGGCGTTG	47.8	60.6	23	324
ENL-B11f		ACTTTGCCGTGGAAGTCAATCC	50	60.3	22	286
ENL-B12f		TGCTGTTTGCTGCTTGTCATCC	50	60.3	22	398

ENL-B13f.2		TCATTGCAGACTCCACCTCTCC	54.5	62.1	22	371
ENL-B14f		CCTAACCACAATATCATTCTGGC	43.4	63.2	23	350
ENL-B15f.7		CTGGGTCTGCAGTGATTGTGG	57.1	61.8	21	94
ENL-B16f.2		GGTGGCATCCCTCCTCGTGG	70	65.5	20	186
ENL-B17f		GTGGAATTCAGGGACAGTTCAG	50	60.3	22	313
ETV6						
ETV6-S1r	ETV6	GATGTGGTTCATGTAAGCCAGGTCTTC	48	68.2	27	
	äußerer P.					
ETV6-S1r-n	ETV6	GGAGGACGCTGGGCAGTGATTATTC	56	69.1	25	
	innerer P.					
ETV6-S2r	ETV6	AAAGGGACAGTACCTCAAGGCAGAAG	50	67.9	26	
	äußerer P.					
ETV6-S2r-n	ETV6	TGGCAGCACCTTGATGGTCAGCTAG	56	69.1	25	
	innerer P.					
ETV6-S3r	ETV6	GGGACATTATGCACCTGCTTGGGAG	56	69.1	25	
	äußerer P.					
ETV6-S3r-n	ETV6	TAGGACTGTTCGGGGCCATCTGTC	58	68.5	24	
	innerer P.					
RUNX1						ETV6-S1/2/3r-n
RUNX1-S1f	Bruchpunkte					512/444
		CAGAGGCAAGACGGGCTGATAACC	58	68.5	24	/449
RUNX1-S2f						196/128
		AGGGACTCATGGTGACGGGAGC	64	67.9	22	/133
RUNX1-S3f						257/189
		GACTCTATATTGGAACCTCGGAAACGC	48	68.2	27	/194
RUNX1-S4f						267/199
		TTATCTGGTGGGCTGTTAGGAGGCTC	54	69.5	26	/204
RUNX1-S5f						169/101
		GGTGTGTTTCATAGGGAAGTGGTTTTGC	46	68.5	28	/106
RUNX1-S6f						131/63/
		CCCACACCCTAGTTGCATCGGTTTG	54	69.5	26	68
RUNX1-S7f						670/602
		GAGGTGGAAGTAGTCATTATGGGATAACC	45	69.1	29	/607
RUNX1-S8f						193/125
		TGGTGACAAGTTGCTTCAGGCTGATG	50	67.9	26	/130
RUNX1-S10f						142/74/
		CCGGGATGACAACAGTTCAAGGAATAC	48	68.2	27	79
RUNX1-S11f						229/161
		ACCAGGCACTTGACTCTTAGGATGTTTG	46	68.5	28	/166
RUNX1-S12f		GTGTCATCTCAACCATGGAAAGGGTAC	48	68.2	27	323/255

						/260
RUNX1-S13f						159/91/
		GGAGGACCTAGTGGGATGCAAGTG	58	68.5	24	96
RUNX1-S14f						217/149
		CTGACTGGGCAGCTCCACTATGTC	58	68.5	24	/154
RUNX1-S15f						174/106
		CCTAGTGAGTTCAGTGTGGTTTTGTCAG	46	68.5	28	/111
RUNX1-S16f						173/105
		AGTGAGCTGGGGAATCCATTCAAGTG	50	67.9	26	/110
RUNX1-S17f						296/228
		CGTTTCTAGAAGGAGTGCCGGCAG	58	68.5	24	/233
RUNX1-S18f						202/134
		GCTACCAGTCAAGTTTCCTTTCGGGC	54	69.5	26	/139
RUNX1-S19f						314/246
		AGACACAAAAGGTCAGACGCATGACAC	48	68.2	27	/251
RUNX1-S20f						274/206
		TTGGGGAGAGAAGGATGATGGTCTTG	50	67.9	26	/211
RUNX1-S21f						152/84/
		AGTGGAAGAGGAGGTGGCAAGTACAG	50	67.9	26	89
RUNX1-S22f						272/204
		AAGGAAAGAAGCTAGTTGGGGTAGCG	50	67.9	26	/209
RUNX1-S23f						231/163
		AACAGAGAAGTCGCAATAGTGCAGCAG	48	68.2	27	/168
RUNX1-S24f						230/162
		TCTCATGTTTTCCAGTTGCTTAGGCGTG	46	68.5	28	/167
RUNX1-S25f						185/117
		TGTCTTGGGGATCATTCTCGCCTGC	56	69.1	25	/122
RUNX1-S26f						177/109
		CATCAGGCAGAAAGGAAGAAGGGAAG	50	67.9	26	/114
RUNX1-S27f						715/647
		TGCAGTCACTTAGAAGCACCCATCTG	50	67.9	26	/652
RUNX1-S28f						163/95/
		CAGAAAATCTTGCAGCAGTCAGCTTGC	48	68.2	27	100
RUNX1-S29f						135/67/
		TCGGTTAGCTTTCACGGAGGCAGTG	56	69.1	25	72
RUNX1-S0f	RUNX1					404
	Kontroll-P.	CTTGGTTCAGAGTGATCTCACCCCTTG	48	68.2	27	
RUNX1-S1r	RUNX1					404
	Kontroll-P.	GTGAAGCCAGGGACACACACTAAATG	50	67.9	26	
TCF3						
TCF3-M1r	TCF3	CTGTGCTGGAGCGGGAAGTATGC	61	68.3	23	
	äußerer P.					
TCF3-M1r-n	TCF3	AGCGAGATGAGACCGCAGGAGTG	61	68.3	23	

innerer P.						
PBX1						
PBX1-M1f	Bruchpunkte	ACTTAAACTTGGCCCTAGAGTCCCTC	48	68.2	27	164
PBX1-M2f		GTGAAGCTGAGAAAACATGTGTGTCG	45	69.1	29	320
PBX1-M3f		ATGGTGTAAGGATGGGGTGAGTGCTG	54	69.5	26	295
PBX1-M4f		CAAGGATGTAACCTGATGGGGAATAGTG	46	68.5	28	542
PBX1-M5f		TTGGTCTGTGCCTACATGTATGTGCTC	48	68.2	27	217
PBX1-M6f		CCAGGTGTGAGAGGCAGTGTAACATC	54	69.5	26	192
PBX1-M7f		CCATCTGTAAAATTGGGTGGCAGTGTAG	46	68.5	28	228
PBX1-M8f		TCAAGGTAAAGCTCTGAAATCCCACGC	48	68.2	27	239
PBX1-M9f		GATGGTGTCCCAGGAGCAAGCAAC	58	68.5	24	273
PBX1-M10f		GGATTGACACAGACCAAGGGGTCTTG	54	69.5	26	356
PBX1-M11f		AGAGAGGTGAGGAAGGGAAAGGGATG	54	69.5	26	186
PBX1-M12f		CGATCCCACCATTTGGTCAACACAGAC	54	69.5	26	247
PBX1-M13f		TAGAATGAGGCAGAGCTTCCAGGATAG	48	68.2	27	224
PBX1-M14f		GAGAGAGACTCAGCTTCAGTAACCTG	50	67.9	26	177
PBX1-M15f		CCCTAGGCTGAACGAAACGAAAACCTC	50	67.9	26	727
PBX1-M16f		TCAAAGGCAGGAGTGAGATGTCATCC	50	67.9	26	218
PBX1-M17f		TCTCTGACCTTCTGTCTCTGGGCAC	56	69.1	25	257
PBX1-M18f		CTCTGAGACACGGAACACTAGTTGTG	50	67.9	26	192
PBX1-M19f		TCCCTCTAGTCATATGTCTGTGCTGC	50	67.9	26	183
PBX1-M20f		CAAAGTATGTTGAAGTGTGTTGGCGCC	48	68.2	27	158
PBX1-M21f		GTACATAGGCGTTATCACCTCATTGGAAG	45	69.1	29	279
PBX1-M22f		GACCCCTTCTCTCTTAACCTATAATGGC	46	68.5	28	276
PBX1-M23f		CAGGAACAAGAACAAGAAGGCATGTAGG	46	68.5	28	199
PBX1-M24f		AGCATCATAGGTGACAAGGGGCCATG	54	69.5	26	164
PBX1-M25f		TGCCTGGTGCATGTTAAGCCTCACAG	54	69.5	26	234
PBX1-M26f		TAGAACATGCAGAATGCCCACCGTGG	54	69.5	26	183
PBX1-M27f		TGAGTGTGTTGGTACCGATGTGTGGC	54	69.5	26	147
PBX1-M28f		GTGAATGCCTGTGTGTACACTTAACGTG	46	68.5	28	253
PBX1-M29f		CTGGCGTCATAACAGAAGTAGTCACAG	48	68.2	27	268
PBX1-M30f		TGGCATCTGAAGCACCTGTCCTAATG	50	67.9	26	205
PBX1-M31f		CTGAGCTTGACCTTCCAGTCGTCTTC	54	69.5	26	204
PBX1-M32f		TTGGCATTGTGACCAGGAGATCTATTGC	46	68.5	28	243
PBX1-M33f		GATGCAAGGGAACAATTACTGGACTGTTT	45	69.1	29	346
PBX1-M34f		ACATTCTGAGGAAGATACATGGTTGTTCC	41	67.4	29	177
PBX1-M35f		TGGTGGTAATGGGGTTGGTGGGATAG	54	69.5	26	328
PBX1-M36f		ATACACACATGCACGTAACACCCCAAAG	46	68.5	28	167
PBX1-M0f	PBX1					
	Kontroll-P.	GCCCTGTAACTGGGAGGTCTATTAG	54	69.5	26	298
PBX1-M1r	PBX1					
	Kontroll-P.	AACCATCTGTGGAGTGCCCGGATTAG	54	69.5	26	298

(P., Primer; T_M, Schmelztemperatur; GC, Gehalt an G und C; f, Vorwärts-Primer; r, reverser Primer)

Tabelle 2: Multiplexing-Strategie für die GIPFEL-Analysen.

MLLAF4 * PCR1	ancho r pr.	#1 B1f+B2f+B3f				#2 B4f.2+B6f+B7f				#3 B8f				#4 control MLL- B2f.4
	MLL- B1r.4 +													
PCR2	ancho r pr.	#1 B1f	#2 B2f	#3 B3 f	#4 B4f. 2	#5 B6f	#6 B7f	#7 B8f						#8 control MLL- B2f.4
	MLL- B1r.n +													
MLLAF9 * PCR1	ancho r pr.	#1 B1f.2+B2f.3+B3f				#2 B4f+B5f+B6f.2				#3 B7f+B8f+B9f	#4 B10f			#5 control MLL- B2f.4
	MLL- B1r.4 +													
PCR2	ancho r pr.	#1 B1f.	#2 B2f.	#3 B3 f	#4 B4f	#5 B5f	#6 B6f. 2	#7 B7f	#8 B8f	#9 B9f	#10 B10f		#11 control MLL- B2f.4	
	MLL- B1r.n +	2	3											
MLLENL * PCR1	ancho r pr.	#1 B6f+B7f+B8f.2				#2 B9f+B11+B12f				#3 B13f.2+B14f+15f.7	#4 B16f.2+B17f			#5 control MLL- B2f.4
	MLL- B1r.4 +													
PCR2	ancho r pr.	#1 B6f	#2 B7f	#3 B8 f	#4 B9f	#5 B11 f	#6 B12f	#7 B13f. 2	#8 B14 f	#9 B15f. 7	#10 B16f. 2	#11 B17 f	#12 control MLL- B2f.4	
	MLL- B1r.n +													
ETV6- RUNX1 PCR1	ancho r pr.	#1 S12f + S15f + S17f + S22f + S23f + S26f + S28f				#2 S1f + S4f + S10f + S11f + S14f + S24f + S27f				#3 S2f + S6f + S7f + S8f + S18f + S20f + S29f	#4 S3f + S5f + S13f + S16f + S19f + S21f + S25f			#5 control RUNX1 -S0f + S1r (no anchor)
	ETV6- S1r + S2r + S3r +													
PCR2†	ancho r pr.	#1 S12f + S15f + S17f + S22f +				#2 S1f + S4f + S10f + S11f + S14f + S24f				#3 S2f + S6f + S7f + S8f + S18f + S20f + S29f	#4 S3f + S5f + S13f + S16f			#5 control RUNX1
	ETV6-													

	S1r-n + S2r- n + S3r-n +	S23f + S26f + S28f	+ S27f		+ S19f + S21f + S25f	-S0f + S1r (no anchor)
TCF3- PBX1 PCR1	ancho r pr. TCF3- M1r	#1 M1f + M6f + M12f + M13f + M26f + M29f + M33f + M36f #5 M7f + M15f + M17f + M22f + M27f + M30f + M31f	#2 M4f + M8f + M9f + M10f + M16f + M21f + M23f	#3 M2f + M11f + M20f + M25f + M28f + M34f + M35f	#4 M3f + M5f + M14f + M18f + M19f + M24f + M32f	#6 control PBX1- M0f + M1r (no anchor)
PCR2†	ancho r pr. TCF3- M1r-n	#1 M1f + M6f + M12f + M13f + M26f + M29f + M33f + M36f #5 M7f + M15f + M17f + M22f + M27f + M30f + M31f	#2 M4f + M8f + M9f + M10f + M16f + M21f + M23f	#3 M2f + M11f + M20f + M25f + M28f + M34f + M35f	#4 M3f + M5f + M14f + M18f + M19f + M24f + M32f	#6 control PBX1- M0f + M1r (no anchor)

(anchor pr., Anker-Primer; control, Kontrolle, f, Vorwärts-Primer, r, reverser Primer)

* Zum Nachweis von MLL-Fusionsgenen wurden Primer nur in der ersten Runde der semi-nested PCR ge-multiplext.

† Aufgrund der größeren Bruchpunktregion wurden die Primer für den Nachweis der ETV6-RUNX1 und TCF3-PBX1 Fusionsgene in beiden PCR-Runden gemultiplext. Für positive Proben wurde dann eine dritte PCR zur Identifizierung der exakten Bruchpunktregion mit nur einem Primerpaar jeweils angeschlossen.

Tabelle 3: Joining Sequenzen für jedes Primerpaar (Restriktionsschnittstellen in Fettdruck markiert.)

Primer Paar	AF4_Restriktionsschnittstelle _MLL		
MLL-B1r-n +			
AF4-B1f	AAAAAATAGATACACCTATA GGATCC	TGCCCCAAAGAAAAGCAG	
AF4-B2f	AGAACTCCGCGATCTCACGT GGATCC	TGCCCCAAAGAAAAGCAG	
AF4-B3f	TTGGGAGAAGCACAGGAGTG GGATCC	TGCCCCAAAGAAAAGCAG	
AF4-B4f.2	GATGTTTGTGGATGGTTATT GGATCC	TGCCCCAAAGAAAAGCAG	
AF4-B6f	ATCCTCATCCCCTAGAGCCA GGATCC	TGCCCCAAAGAAAAGCAG	
AF4-B7f	ATGCTAGAGATGATTCCAGT GGATCC	TGCCCCAAAGAAAAGCAG	
AF4-B8f	CAATACGTTCTCTCATTTGA GGATCC	TGCCCCAAAGAAAAGCAG	
AF9_Restriktionsschnittstelle _MLL			
MLL-B1r-n +			
AF9-B1f.2	ATATGACCAGCAAGGTAGTT GGATCC	TGCCCCAAAGAAAAGCAG	
AF9-B2f.3	GGACAGATTGAGTGAGATAA GGATCC	TGCCCCAAAGAAAAGCAG	
AF9-B3f	CCTTTATTTTGATAGCAAAA GGATCC	TGCCCCAAAGAAAAGCAG	
AF9-B4f	CCGCCATTTGATGATATTGT GGATCC	TGCCCCAAAGAAAAGCAG	
AF9-B5f	CCTATGCTGTCCTGAACACA GGATCC	TGCCCCAAAGAAAAGCAG	
AF9-B6f.2	TCGTGAGAACTGTCTTGAA GGATCC	TGCCCCAAAGAAAAGCAG	
AF9-B7f	CTGCCAACTCTTGCTATAGA GGATCC	TGCCCCAAAGAAAAGCAG	
AF9-B8f	ATTCTCAAAGCTCTTAACAA GGATCC	TGCCCCAAAGAAAAGCAG	
AF9-B9f	CTCAAACCTCCTGGGCTCAGG GGATCC	TGCCCCAAAGAAAAGCAG	
AF9-B10f	CTGGTTAACTAGAAAATTTG GGATCC	TGCCCCAAAGAAAAGCAG	
ENL_Restriktionsschnittstelle _MLL			
MLL-B1r-n +			
ENL-B6f	TTGGGCCCTCTCCGCCCTG GGATCC	TGCCCCAAAGAAAAGCAG	
ENL-B7f	TGGGAAGTCTCAGGAGCAGA GGATCC	TGCCCCAAAGAAAAGCAG	
ENL-B8f.2	TGTGAGCCTGTTTACCTTTG GGATCC	TGCCCCAAAGAAAAGCAG	
ENL-B9f	CCTCTCTTTTTTTCTTTCTG GGATCC	TGCCCCAAAGAAAAGCAG	
ENL-B11f	TGCACTTCAAAAACAAGGTA GGATCC	TGCCCCAAAGAAAAGCAG	
ENL-B12f	AATCCCTGCCTGCTCTTTTG GGATCC	TGCCCCAAAGAAAAGCAG	
ENL-B13f.2	GGCTCCAGCTCTTCAAGGGG GGATCC	TGCCCCAAAGAAAAGCAG	
ENL-B14f	CTCGAACTCCTGGGCTTAAG GGATCC	TGCCCCAAAGAAAAGCAG	
ENL-B15f.7	CCCTGGGAGGGCCAAAGCAG GGATCC	TGCCCCAAAGAAAAGCAG	
ENL-B16f.2	ACCTGCCTTACATGGGGCGA GGATCC	TGCCCCAAAGAAAAGCAG	
ENL-B17f	GTCCTGAGGACTCTTCCTTG GGATCC	TGCCCCAAAGAAAAGCAG	

RUNX1_ Restriktionsschnittstelle _ETV6			
ETV6-S1r-n +			
RUNX1-S1f	CTACTAAAAATCCAAATACA	GAGCTC	AGGGACCCAGGCCGCACC
RUNX1-S2f	GACCGGGGGCGGGGCCCTCC	GAGCTC	AGGGACCCAGGCCGCACC
RUNX1-S3f	CGCCGTCGGGGGCGTTCCGG	GAGCTC	AGGGACCCAGGCCGCACC
RUNX1-S4f	GTATGTGGCTTCCTGCTACT	GAGCTC	AGGGACCCAGGCCGCACC
RUNX1-S5f	GCTTTTGTAAATATTGTTTCC	GAGCTC	AGGGACCCAGGCCGCACC
RUNX1-S6f	TTGCATCGGTTTGGAATGTT	GAGCTC	AGGGACCCAGGCCGCACC
RUNX1-S7f	AAGAACTCAGTATAAACCTA	GAGCTC	AGGGACCCAGGCCGCACC
RUNX1-S8f	AGAATTTAAGAGAGAAGGGG	GAGCTC	AGGGACCCAGGCCGCACC
RUNX1-S10f	TACCTGGATGGCAGCTTCAG	GAGCTC	AGGGACCCAGGCCGCACC
RUNX1-S11f	AAATCATGGCAGTGGAAGGA	GAGCTC	AGGGACCCAGGCCGCACC
RUNX1-S12f	AATAATGGACACTTGTACCT	GAGCTC	AGGGACCCAGGCCGCACC
RUNX1-S13f	ACGAGCTTGCCTTTTCTCTG	GAGCTC	AGGGACCCAGGCCGCACC
RUNX1-S14f	GTGGCCAGGATGGCTGCCT	GAGCTC	AGGGACCCAGGCCGCACC
RUNX1-S15f	ATTTGAGACCCTGCTAGGGA	GAGCTC	AGGGACCCAGGCCGCACC
RUNX1-S16f	TTCCATGAAGTACACAACAA	GAGCTC	AGGGACCCAGGCCGCACC
RUNX1-S17f	AAGGTCCAGCCAAACACAGT	GAGCTC	AGGGACCCAGGCCGCACC
RUNX1-S18f	CCTGTTACGGGCCTGTCTG	GAGCTC	AGGGACCCAGGCCGCACC
RUNX1-S19f	TAGGCAGAGTTATCACACCT	GAGCTC	AGGGACCCAGGCCGCACC
RUNX1-S20f	AAAGCATCTCCACACAGAAA	GAGCTC	AGGGACCCAGGCCGCACC
RUNX1-S21f	GACTGTCTTGGGTGAATCAG	GAGCTC	AGGGACCCAGGCCGCACC
RUNX1-S22f	ATTCCACTTGACAGTCAGCA	GAGCTC	AGGGACCCAGGCCGCACC
RUNX1-S23f	CCGTCTGTGGCTGGAAAGCA	GAGCTC	AGGGACCCAGGCCGCACC
RUNX1-S24f	CGGCACCCTTTGTTCACCTG	GAGCTC	AGGGACCCAGGCCGCACC
RUNX1-S25f	TTTTGGAAGCATTGAGAGAA	GAGCTC	AGGGACCCAGGCCGCACC
RUNX1-S26f	TGGTGGAGAGAGGCCACCAA	GAGCTC	AGGGACCCAGGCCGCACC
RUNX1-S27f	TTCCCACCAAGAGTGTGCAA	GAGCTC	AGGGACCCAGGCCGCACC
RUNX1-S28f	AAAAGAGCAAACAGAAAGTCA	GAGCTC	AGGGACCCAGGCCGCACC
RUNX1-S29f	AGGCAGTGTAGGGAGGGCCT	GAGCTC	AGGGACCCAGGCCGCACC
RUNX1_ Restriktionsschnittstelle _ETV6			
ETV6-S2r-n +			
RUNX1-S1f	CTACTAAAAATCCAAATACA	GAGCTC	TAGCTGACCATCAAGGTG
RUNX1-S2f	GACCGGGGGCGGGGCCCTCC	GAGCTC	TAGCTGACCATCAAGGTG
RUNX1-S3f	CGCCGTCGGGGGCGTTCCGG	GAGCTC	TAGCTGACCATCAAGGTG
RUNX1-S4f	GTATGTGGCTTCCTGCTACT	GAGCTC	TAGCTGACCATCAAGGTG

RUNX1-S5f	GCTTTTGTAAATATTGTTTC	GAGCTC	TAGCTGACCATCAAGGTG
RUNX1-S6f	TTGCATCGGTTTGGAATGTT	GAGCTC	TAGCTGACCATCAAGGTG
RUNX1-S7f	AAGAACTCAGTATAAACCTA	GAGCTC	TAGCTGACCATCAAGGTG
RUNX1-S8f	AGAATTTAAGAGAGAAGGGG	GAGCTC	TAGCTGACCATCAAGGTG
RUNX1-S10f	TACCTGGATGGCAGCTTCAG	GAGCTC	TAGCTGACCATCAAGGTG
RUNX1-S11f	AAATCATGGCAGTGGAAGGA	GAGCTC	TAGCTGACCATCAAGGTG
RUNX1-S12f	AATAATGGACACTTGTACCT	GAGCTC	TAGCTGACCATCAAGGTG
RUNX1-S13f	ACGAGCTTGCCTTTTCTCTG	GAGCTC	TAGCTGACCATCAAGGTG
RUNX1-S14f	GTGGCCCAGGATGGCTGCCT	GAGCTC	TAGCTGACCATCAAGGTG
RUNX1-S15f	ATTTGAGACCCTGCTAGGGA	GAGCTC	TAGCTGACCATCAAGGTG
RUNX1-S16f	TTCCATGAAGTACACAACAA	GAGCTC	TAGCTGACCATCAAGGTG
RUNX1-S17f	AAGGTCCAGCCAAACACAGT	GAGCTC	TAGCTGACCATCAAGGTG
RUNX1-S18f	CCTGTTACGGGCCTGTCTG	GAGCTC	TAGCTGACCATCAAGGTG
RUNX1-S19f	TAGGCAGAGTTATCACACCT	GAGCTC	TAGCTGACCATCAAGGTG
RUNX1-S20f	AAAGCATCTCCACACAGAAA	GAGCTC	TAGCTGACCATCAAGGTG
RUNX1-S21f	GACTGTCTGGGTGAATCAG	GAGCTC	TAGCTGACCATCAAGGTG
RUNX1-S22f	ATTCCACTTGACAGTCAGCA	GAGCTC	TAGCTGACCATCAAGGTG
RUNX1-S23f	CCGTCTGTGGCTGGAAAGCA	GAGCTC	TAGCTGACCATCAAGGTG
RUNX1-S24f	CGGCACCCTTTGTTCACTCG	GAGCTC	TAGCTGACCATCAAGGTG
RUNX1-S25f	TTTTGGAAGCATTGAGAGAA	GAGCTC	TAGCTGACCATCAAGGTG
RUNX1-S26f	TGGTGGAGAGAGGCCACCAA	GAGCTC	TAGCTGACCATCAAGGTG
RUNX1-S27f	TTCCCACCAAGAGTGTGCAA	GAGCTC	TAGCTGACCATCAAGGTG
RUNX1-S28f	AAAAGAGCAAACAGAAAGTCA	GAGCTC	TAGCTGACCATCAAGGTG
RUNX1-S29f	AGGCAGTGTAGGGAGGGCCT	GAGCTC	TAGCTGACCATCAAGGTG
RUNX1_restriction site_ETV6			
ETV6-S3r-n +			
RUNX1-S1f	CTACTAAAAATCCAAATACA	GAGCTC	CTGGAGACAGATGGCCCC
RUNX1-S2f	GACCGGGGGCGGGGCCCTCC	GAGCTC	CTGGAGACAGATGGCCCC
RUNX1-S3f	CGCCGTCGGGGCGTTCCGG	GAGCTC	CTGGAGACAGATGGCCCC
RUNX1-S4f	GTATGTGGCTTCCTGCTACT	GAGCTC	CTGGAGACAGATGGCCCC
RUNX1-S5f	GCTTTTGTAAATATTGTTTC	GAGCTC	CTGGAGACAGATGGCCCC
RUNX1-S6f	TTGCATCGGTTTGGAATGTT	GAGCTC	CTGGAGACAGATGGCCCC
RUNX1-S7f	AAGAACTCAGTATAAACCTA	GAGCTC	CTGGAGACAGATGGCCCC
RUNX1-S8f	AGAATTTAAGAGAGAAGGGG	GAGCTC	CTGGAGACAGATGGCCCC
RUNX1-S10f	TACCTGGATGGCAGCTTCAG	GAGCTC	CTGGAGACAGATGGCCCC
RUNX1-S11f	AAATCATGGCAGTGGAAGGA	GAGCTC	CTGGAGACAGATGGCCCC

RUNX1-S12f	AATAATGGACACTTGTACCT	GAGCTC	CTGGAGACAGATGGCCCC
RUNX1-S13f	ACGAGCTTGCCTTTTCTCTG	GAGCTC	CTGGAGACAGATGGCCCC
RUNX1-S14f	GTGGCCCAGGATGGCTGCCT	GAGCTC	CTGGAGACAGATGGCCCC
RUNX1-S15f	ATTTGAGACCCTGCTAGGGA	GAGCTC	CTGGAGACAGATGGCCCC
RUNX1-S16f	TTCCATGAAGTACACAACAA	GAGCTC	CTGGAGACAGATGGCCCC
RUNX1-S17f	AAGGTCCAGCCAAACACAGT	GAGCTC	CTGGAGACAGATGGCCCC
RUNX1-S18f	CCTGTTACAGGGCCTGTCTG	GAGCTC	CTGGAGACAGATGGCCCC
RUNX1-S19f	TAGGCAGAGTTATCACACCT	GAGCTC	CTGGAGACAGATGGCCCC
RUNX1-S20f	AAAGCATCTCCACACAGAAA	GAGCTC	CTGGAGACAGATGGCCCC
RUNX1-S21f	GACTGTCTTGGGTGAATCAG	GAGCTC	CTGGAGACAGATGGCCCC
RUNX1-S22f	ATTCCACTTGACAGTCAGCA	GAGCTC	CTGGAGACAGATGGCCCC
RUNX1-S23f	CCGTCTGTGGCTGGAAAGCA	GAGCTC	CTGGAGACAGATGGCCCC
RUNX1-S24f	CGGCACCCTTTGTTCACCTG	GAGCTC	CTGGAGACAGATGGCCCC
RUNX1-S25f	TTTTGGAAGCATTGAGAGAA	GAGCTC	CTGGAGACAGATGGCCCC
RUNX1-S26f	TGGTGGAGAGAGGCCACCAA	GAGCTC	CTGGAGACAGATGGCCCC
RUNX1-S27f	TTCCCACCAAGAGTGTGCAA	GAGCTC	CTGGAGACAGATGGCCCC
RUNX1-S28f	AAAAGAGCAAACAGAAGTCA	GAGCTC	CTGGAGACAGATGGCCCC
RUNX1-S29f	AGGCAGTGTAGGGAGGGCCT	GAGCTC	CTGGAGACAGATGGCCCC
PBX1_ Restriktionsschnittstelle _TCF3			
TCF3-M1r-n +			
PBX1-M1f	CACTTTACCCAGACTCAGTT	CAATTG	GGGCTCCCTGTTACATCC
PBX1-M2f	GCTTGCTATCAACCTTGCTA	CAATTG	GGGCTCCCTGTTACATCC
PBX1-M3f	GCTTAATTGTGATGATATCA	CAATTG	GGGCTCCCTGTTACATCC
PBX1-M4f	CAGTGTTTTCCATCTGCAGT	CAATTG	GGGCTCCCTGTTACATCC
PBX1-M5f	GAACAAAGCTGAAAAGAGAG	CAATTG	GGGCTCCCTGTTACATCC
PBX1-M6f	TTTACAATGTACTCTGCAGA	CAATTG	GGGCTCCCTGTTACATCC
PBX1-M7f	TAATGACTTAAAAGCGAAAA	CAATTG	GGGCTCCCTGTTACATCC
PBX1-M8f	TACTTCCCTACATTTTATGA	CAATTG	GGGCTCCCTGTTACATCC
PBX1-M9f	GAGAGAGAACAAATGGTTAG	CAATTG	GGGCTCCCTGTTACATCC
PBX1-M10f	TTTATTGAACAAGACTTTTA	CAATTG	GGGCTCCCTGTTACATCC
PBX1-M11f	AAGTCCCTTCTCCACACATC	CAATTG	GGGCTCCCTGTTACATCC
PBX1-M12f	TCAAAGTGTGGACACC	CAATTG	GGGCTCCCTGTTACATCC
PBX1-M13f	TGCCATTTTTTGAACCTCAC	CAATTG	GGGCTCCCTGTTACATCC
PBX1-M14f	ATAGAAAGTAAATGAAAAC	CAATTG	GGGCTCCCTGTTACATCC
PBX1-M15f	ACTAAGCATTTAAATAAAT	CAATTG	GGGCTCCCTGTTACATCC
PBX1-M16f	CTCCTGCTATCTTAAAGCCA	CAATTG	GGGCTCCCTGTTACATCC

PBX1-M17f	TTTAGAATGTACACACTGCC	CAATTG	GGGCTCCCTGTTACATCC
PBX1-M18f	AGGCTATGATTCTATATGAG	CAATTG	GGGCTCCCTGTTACATCC
PBX1-M19f	CCGTACCAAACTGTCACCA	CAATTG	GGGCTCCCTGTTACATCC
PBX1-M20f	TGGCGCCTTAAATAAAATAT	CAATTG	GGGCTCCCTGTTACATCC
PBX1-M21f	TACACTTTCATGGAGGGCAT	CAATTG	GGGCTCCCTGTTACATCC
PBX1-M22f	TCTGCAGCCACTGTTTAGCT	CAATTG	GGGCTCCCTGTTACATCC
PBX1-M23f	TTATATAGACAGTTAGCCTT	CAATTG	GGGCTCCCTGTTACATCC
PBX1-M24f	TTGCCTGCCTGTAGAGATGG	CAATTG	GGGCTCCCTGTTACATCC
PBX1-M25f	ATGTAATTTAATCTTCCATT	CAATTG	GGGCTCCCTGTTACATCC
PBX1-M26f	ATGTGTTTGGGGTTTTTTTCT	CAATTG	GGGCTCCCTGTTACATCC
PBX1-M27f	TGGTACCGATGTGTGGCCGG	CAATTG	GGGCTCCCTGTTACATCC
PBX1-M28f	ATTTACTGATGTTTTTTTAAG	CAATTG	GGGCTCCCTGTTACATCC
PBX1-M29f	TGTCAGGTTTAGCATTGAGG	CAATTG	GGGCTCCCTGTTACATCC
PBX1-M30f	ATTTAGTCTGTTTGGTCTTA	CAATTG	GGGCTCCCTGTTACATCC
PBX1-M31f	TCTTTCTTCGGGCAAATCTG	CAATTG	GGGCTCCCTGTTACATCC
PBX1-M32f	GGAAGCTTGGATGGTTAGAG	CAATTG	GGGCTCCCTGTTACATCC
PBX1-M33f	TTTGTTAACCTATACTGTCA	CAATTG	GGGCTCCCTGTTACATCC
PBX1-M34f	TTGAGCTGGTAGTTCTGTAG	CAATTG	GGGCTCCCTGTTACATCC
PBX1-M35f	TAGATAGCAATGAATAGCTG	CAATTG	GGGCTCCCTGTTACATCC
PBX1-M36f	AGAAGGTGCCATCTGAATTA	CAATTG	GGGCTCCCTGTTACATCC

2. Literatur

1. Kaatsch P, Spix C, Schulze-Rath R, Schmiedel S, Blettner M. Leukaemia in young children living in the vicinity of German nuclear power plants. *Int J Cancer* 2008; 122:721-6.
2. Ziegelberger G, Dehos A, Grosche B, Hornhardt S, Jung T, Weiss W. Childhood leukemia--risk factors and the need for an interdisciplinary research agenda. *Prog Biophys Mol Biol* 2011; 107:312-4.
3. Pui CH, Carroll WL, Meshinchi S, Arceci RJ. Biology, risk stratification, and therapy of pediatric acute leukemias: an update. *J Clin Oncol* 2011; 29:551-65.
4. Mori H, Colman SM, Xiao Z, Ford AM, Healy LE, Donaldson C, et al. Chromosome translocations and covert leukemic clones are generated during normal fetal development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99:8242-7.
5. Lausten-Thomsen U, Madsen HO, Schmiegelow K. Characterizing chromosomal break points of t(12;21)[ETV6-RUNX1]-positive leukaemia using

- multiple tiling PCR on whole-genome-amplified DNA. *Leukemia* 2010; 24:203-5.
6. Lausten-Thomsen U, Hjalgrim H, Marquart H, Lutterodt M, Petersen BL, Schmiegelow K. ETV6-RUNX1 transcript is not frequent in early human haematopoiesis. *Eur J Haematol* 2008; 81:161-2.
 7. Lausten-Thomsen U, Madsen HO, Vestergaard TR, Hjalgrim H, Nersting J, Schmiegelow K. Prevalence of t(12;21)[ETV6-RUNX1]-positive cells in healthy neonates. *Blood* 2011; 117:186-9.
 8. Olsen M, Hjalgrim H, Melbye M, Madsen HO, Schmiegelow K. RT-PCR screening for ETV6-RUNX1-positive clones in cord blood from newborns in the Danish National Birth Cohort. *J Pediatr Hematol Oncol* 2012; 34:301-3.
 9. Kusk MS, Lausten-Thomsen U, Andersen MK, Olsen M, Hjalgrim H, Schmiegelow K. False positivity of ETV6/RUNX1 detected by FISH in healthy newborns and adults. *Pediatr Blood Cancer* 2014.
 10. Olsen M, Madsen HO, Hjalgrim H, Gregers J, Rostgaard K, Schmiegelow K. Preleukemic TEL-AML1-positive clones at cell level of 10⁽⁻³⁾ to 10⁽⁻⁴⁾ do not persist into adulthood. *J Pediatr Hematol Oncol* 2006; 28:734-40.
 11. Kobayashi H, Espinosa R, 3rd, Thirman MJ, Gill HJ, Fernald AA, Diaz MO, et al. Heterogeneity of breakpoints of 11q23 rearrangements in hematologic malignancies identified with fluorescence in situ hybridization. *Blood* 1993; 82:547-51.
 12. Izraeli S, Janssen JW, Haas OA, Harbott J, Brok-Simoni F, Walther JU, et al. Detection and clinical relevance of genetic abnormalities in pediatric acute lymphoblastic leukemia: a comparison between cytogenetic and polymerase chain reaction analyses. *Leukemia* 1993; 7:671-8.
 13. van der Burg M, Beverloo HB, Langerak AW, Wijsman J, van Drunen E, Slater R, et al. Rapid and sensitive detection of all types of MLL gene translocations with a single FISH probe set. *Leukemia* 1999; 13:2107-13.
 14. Olsen M, Madsen HO, Hjalgrim H, Ford A, Schmiegelow K. Stability of cord blood RNA measured by house keeping transcripts: relevance for large-scale studies of childhood leukaemia. *Leukemia* 2006; 20:2214-7.
 15. Scurto P, Hsu Rocha M, Kane JR, Williams WK, Haney DM, Conn WP, et al. A multiplex RT-PCR assay for the detection of chimeric transcripts encoded by the risk-stratifying translocations of pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 1998; 12:1994-2005.
 16. van Dongen JJ, Macintyre EA, Gabert JA, Delabesse E, Rossi V, Saglio G, et al. Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease. Report of the BIOMED-1 Concerted Action: investigation of minimal residual disease in acute leukemia. *Leukemia* 1999; 13:1901-28.
 17. Viehmann S, Borkhardt A, Lampert F, Harbott J. Multiplex PCR--a rapid screening method for detection of gene rearrangements in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Ann Hematol* 1999; 78:157-62.
 18. Curry JD, Glaser MC, Smith MT. Real-time reverse transcription polymerase chain reaction detection and quantification of t(1;19) (E2A-PBX1) fusion genes associated with leukaemia. *Br J Haematol* 2001; 115:826-30.
 19. Siraj AK, Ozbek U, Sazawal S, Sirma S, Timson G, Al-Nasser A, et al. Preclinical validation of a monochrome real-time multiplex assay for translocations in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Clin Cancer Res* 2002; 8:3832-40.

20. Osumi K, Fukui T, Kiyoi H, Kasai M, Kodera Y, Kudo K, et al. Rapid screening of leukemia fusion transcripts in acute leukemia by real-time PCR. *Leuk Lymphoma* 2002; 43:2291-9.
21. Scholl C, Breitinger H, Schlenk RF, Dohner H, Frohling S, Dohner K. Development of a real-time RT-PCR assay for the quantification of the most frequent MLL/AF9 fusion types resulting from translocation t(9;11)(p22;q23) in acute myeloid leukemia. *Genes Chromosomes Cancer* 2003; 38:274-80.
22. Elia L, Mancini M, Moleti L, Meloni G, Buffolino S, Krampera M, et al. A multiplex reverse transcriptase-polymerase chain reaction strategy for the diagnostic molecular screening of chimeric genes: a clinical evaluation on 170 patients with acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* 2003; 88:275-9.
23. Hutchings M, Hoffmann M, Wirenfeldt T, Klausen T, Hasle H, Schmiegelow K, Brondum-Nielsen K, Johnsen HE. Multiplex reverse transcription polymerase chain reaction screening in acute myeloid leukemia detects cytogenetically unrevealed abnormalities of prognostic significance. *Haematologica* 2005; 90:984-6.
24. Sudhakar N, Rajalekshmy KR, Rajkumar T, Nancy KN. RT-PCR and real-time PCR analysis of E2A-PBX1, TEL-AML1, mBCR-ABL and MLL-AF4 fusion gene transcripts in de novo B-lineage acute lymphoblastic leukaemia patients in south India. *J Genet* 2011; 90:349-53.
25. Leis T, Repp R, Borkhardt A, Metzler M, Schlager F, Harbott J, et al. A new fingerprint method for sequence analysis of chromosomal translocations at the genomic DNA level. *Leukemia* 1998; 12:758-63.
26. Meyer C, Schneider B, Reichel M, Angermueller S, Strehl S, Schnittger S, et al. Diagnostic tool for the identification of MLL rearrangements including unknown partner genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102:449-54.
27. Mellentin JD, Nourse J, Hunger SP, Smith SD, Cleary ML. Molecular analysis of the t(1;19) breakpoint cluster region in pre-B cell acute lymphoblastic leukemias. *Genes Chromosomes Cancer* 1990; 2:239-47.
28. Hunger SP, Galili N, Carroll AJ, Crist WM, Link MP, Cleary ML. The t(1;19)(q23;p13) results in consistent fusion of E2A and PBX1 coding sequences in acute lymphoblastic leukemias. *Blood* 1991; 77:687-93.
29. Kamps MP, Look AT, Baltimore D. The human t(1;19) translocation in pre-B ALL produces multiple nuclear E2A-Pbx1 fusion proteins with differing transforming potentials. *Genes Dev* 1991; 5:358-68.
30. Privitera E, Kamps MP, Hayashi Y, Inaba T, Shapiro LH, Raimondi SC, et al. Different molecular consequences of the 1;19 chromosomal translocation in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1992; 79:1781-8.
31. Rodic N, Zampella JG, Cornish TC, Wheelan SJ, Burns KH. Translocation junctions in TCF3-PBX1 acute lymphoblastic leukemia/lymphoma cluster near transposable elements. *Mob DNA* 2013; 4:22.
32. Thandla SP, Ploski JE, Raza-Egilmez SZ, Chhalliyil PP, Block AW, de Jong PJ, et al. ETV6-AML1 translocation breakpoints cluster near a purine/pyrimidine repeat region in the ETV6 gene. *Blood* 1999; 93:293-9.
33. von Goessel H, Jacobs U, Semper S, Krumbholz M, Langer T, Keller T, et al. Cluster analysis of genomic ETV6-RUNX1 (TEL-AML1) fusion sites in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Res* 2009; 33:1082-8.

34. Rubnitz JE, Behm FG, Curcio-Brint AM, Pinheiro RP, Carroll AJ, Raimondi SC, et al. Molecular analysis of t(11;19) breakpoints in childhood acute leukemias. *Blood* 1996; 87:4804-8.
35. Stanulla M, Wang J, Chervinsky DS, Aplan PD. Topoisomerase II inhibitors induce DNA double-strand breaks at a specific site within the AML1 locus. *Leukemia* 1997; 11:490-6.
36. Stanulla M, Wang J, Chervinsky DS, Thandla S, Aplan PD. DNA cleavage within the MLL breakpoint cluster region is a specific event which occurs as part of higher-order chromatin fragmentation during the initial stages of apoptosis. *Mol Cell Biol* 1997; 17:4070-9.
37. Felix CA, Kim CS, Megonigal MD, Slater DJ, Jones DH, Spinner NB, et al. Panhandle polymerase chain reaction amplifies MLL genomic translocation breakpoint involving unknown partner gene. *Blood* 1997; 90:4679-86.
38. Cimino G, Rapanotti MC, Biondi A, Elia L, Lo Coco F, Price C, et al. Infant acute leukemias show the same biased distribution of ALL1 gene breaks as topoisomerase II related secondary acute leukemias. *Cancer Res* 1997; 57:2879-83.
39. Akao Y, Isobe M. Molecular analysis of the rearranged genome and chimeric mRNAs caused by the t(6;11)(q27;q23) chromosome translocation involving MLL in an infant acute monocytic leukemia. *Genes Chromosomes Cancer* 2000; 27:412-7.
40. Langer T, Metzler M, Reinhardt D, Viehmann S, Borkhardt A, Reichel M, et al. Analysis of t(9;11) chromosomal breakpoint sequences in childhood acute leukemia: almost identical MLL breakpoints in therapy-related AML after treatment without etoposides. *Genes Chromosomes Cancer* 2003; 36:393-401.
41. Fu JF, Liang DC, Shih LY. Analysis of acute leukemias with MLL/ENL fusion transcripts: identification of two novel breakpoints in ENL. *Am J Clin Pathol* 2007; 127:24-30.
42. Meyer C, Hofmann J, Burmeister T, Groger D, Park TS, Emerenciano M, et al. The MLL recombinome of acute leukemias in 2013. *Leukemia* 2013; 27:2165-76.
43. Emerenciano M, Meyer C, Mansur MB, Marschalek R, Pombo-de-Oliveira MS. The distribution of MLL breakpoints correlates with outcome in infant acute leukaemia. *Br J Haematol* 2013; 161:224-36.
44. Ghosh S, Bartenhagen C, Okpanyi V, Gombert M, Binder V, Teigler-Schlegel A, et al. Recurrent involvement of ring-type zinc finger genes in complex molecular rearrangements in childhood acute myelogenous leukemia with translocation t(10;11)(p12;q23). *Leukemia* 2013; 27:1745-8.

| Verantwortung für Mensch und Umwelt |

Kontakt:

Bundesamt für Strahlenschutz

Postfach 10 01 49

38201 Salzgitter

Telefon: + 49 30 18333 - 0

Telefax: + 49 30 18333 - 1885

Internet: www.bfs.de

E-Mail: ePost@bfs.de

Gedruckt auf Recyclingpapier aus 100 % Altpapier.



Bundesamt für Strahlenschutz