



Bundesamt
für Strahlenschutz

Ressortforschungsberichte zum Strahlenschutz

Bestimmung der Frequenz präleukämischer Translokationen in Nabelschnurblut

Vorhaben 3618S32275

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

D. Hein
U. Fischer
A. Borkhardt

Das Vorhaben wurde mit Mitteln des Bundesministeriums für Umwelt, Naturschutz,
nukleare Sicherheit und Verbraucherschutz (BMUV) und im Auftrag des Bundesamtes
für Strahlenschutz (BfS) durchgeführt.

Dieser Band enthält einen Ergebnisbericht eines vom Bundesamt für Strahlenschutz im Rahmen der Ressortforschung des BMUV (Ressortforschungsplan) 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.

Impressum

Bundesamt für Strahlenschutz
Postfach 10 01 49
38201 Salzgitter

Tel.: +49 30 18333-0

Fax: +49 30 18333-1885

E-Mail: ePost@bfs.de

De-Mail: epost@bfs.de-mail.de

www.bfs.de

BfS-RESFOR-212/23

Bitte beziehen Sie sich beim Zitieren dieses Dokumentes immer auf folgende URN:

urn:nbn:de:0221-2023071238442

Salzgitter, Juli 2023

Inhalt

I. Zusammenfassung	3
1. Zusammenfassung.....	3
2. Summary.....	5
II. Kurze Darstellung	7
3. Aufgabenstellung	7
4. Voraussetzungen, unter denen das FE-Vorhaben durchgeführt wurde.....	9
5. Planung und Ablauf des Vorhabens.....	10
6. Stand der Wissenschaft und Technik.....	11
III. Eingehende Darstellung.....	25
7. Erzielte Ergebnisse	25
8. Voraussichtlicher Nutzen, Verwertbarkeit der Ergebnisse	36
IV. Anhang	38
9. GIPFEL-Protokoll für Nabelschnurblutproben.....	38
10. Bruchpunktidentifizierung und Validierung.....	41
11. Tabellen.....	43
12. Literatur	47

I. Zusammenfassung

1. Zusammenfassung

Die pädiatrische akute lymphatische Leukämie (ALL) ist charakterisiert durch präleukämische chromosomale Translokationen, die bereits vor der Geburt auftreten. Am häufigsten ist die Translokation t(12;21), die zur Bildung des chimären Transkriptionsfaktors ETV6-RUNX1 führt. Für die Entstehung einer Leukämie sind weitere genetische Aberrationen notwendig. Die Häufigkeit mit der ETV6-RUNX1-positive präleukämische Zellen bei Neugeborenen auftreten, ist noch unklar. Es wurde zunächst erwartet, dass sie der Inzidenz von ETV6-RUNX1-positiver Leukämie bei Kindern ($\approx 1/10.000$) entspricht. Erste Ergebnisse zeigten jedoch, dass ETV6-RUNX1-Translokationen 100x häufiger bei Neugeborenen auftreten, als tatsächlich Kinder an dieser Leukämie erkranken. Nachfolgende Studien verwendeten RNA und RT-PCR zur Prävalenzbestimmung. Die geringe Stabilität der RNA und die Neigung der RT-PCR zu falsch positiven Ergebnissen verursachten jedoch widersprüchliche Ergebnisse. In einem Pilotprojekt des BMU/BfS wurde deshalb von Prof. Robert Slany (Institut für Genetik, Universität Erlangen-Nürnberg) und der Projektleitung eine auf stabiler DNA basierende Methode zum Nachweis präleukämischer Translokationen (genomische inverse PCR zur Detektion von ligierten Bruchpunkten, abgekürzt: GIPFEL) entwickelt. Die GIPFEL-Methode weist Genfusionen ohne vorherige Kenntnis des Bruchpunkts spezifisch und mit hoher Sensitivität (10^{-4}) nach. In einem weiteren BMU/BfS-Projekt wurde diese Technik von der Projektleitung für den Nachweis von Translokations-positiven Zellen in Nabelschnurblutproben von gesunden Neugeborenen adaptiert. In einem ersten populationsbasierten, retrospektiven Screening von 1000 gesunden Neugeborenen zeigten 5% ETV6-RUNX1 positive Signale. Um dieses Ergebnis in einer erweiterten Kohorte zu prüfen,

wurden in dem aktuellen Projekt weitere 1405 Nabelschnurblutproben von gesunden Neugeborenen mit der GIPFEL-Technik untersucht. Die Proben wurden im Jahr 2004 in Krankenhäusern in Nordrhein-Westfalen gesammelt und in der José Carreras Stammzellbank (Direktorin: Prof. Gesine Kögler) asserviert und pseudonymisiert. Von diesen 1405 Nabelschnurblutproben waren 103 (7,3%) *ETV6-RUNX1*-positiv. Bei fünf dieser Proben konnte der Bruchpunkt mittels Primerwalk und Sanger-Sequenzierung mit Basenpaaraufklärung bestimmt und in einem zweiten Aliquot derselben Nabelschnurblutprobe mittels nested PCR zusätzlich verifiziert werden.

In einem Begleitprojekt wurde eine Nachverfolgung der Spender für den Vergleich der Screening-Ergebnisse mit tatsächlichen Leukämiefällen genutzt. Dazu wurden die Familien und Spender der 103 positiven Proben kontaktiert. 75 (73,5%) konnten erreicht werden. Keiner der aktuell 16 bis 17 Jahre alten, kontaktierten Jugendlichen hatte eine ALL entwickelt. Die Bruchpunktregionen von *ETV6-RUNX1*-positiven Proben wurden mit publizierten Leukämie-Bruchpunkten von Patienten verschiedenen Alters verglichen. Die Bruchpunkte traten im Nabelschnurblut signifikant seltener am 3' Ende der *RUNX1*-Bruchpunktsregion auf. Weitere Untersuchungen dazu könnten Rückschlüsse zu den molekularen Ursachen der Translokation und verantwortlichen Noxen ermöglichen. Eine Assoziation bestimmter *ETV6-RUNX1*-Translokationen mit häufigerer ALL-Entstehung könnte ggf. eine individuelle frühe Risikobewertungen ermöglichen. Die Studie bestätigte die hohe Inzidenz von *ETV6-RUNX1*-positiven präleukämischen Zellen bei gesunden Neugeborenen und damit die hohe Zahl an prädisponierten Kindern in der Bevölkerung. Die vorgestellte Studie bestätigt, dass das Leukämie-induzierende Potenzial des Transkriptionsfaktors *ETV6-RUNX1* als gering zu bewerten ist. Daher kommt dem Einfluss sekundärer umweltbedingter oder spontan auftretender,

kooperierender, onkogener Läsionen eine besondere Bedeutung bei der Entstehung der *ETV6-RUNX1*-positiven Kinderleukämie zu.

2. Summary

Pediatric acute lymphoblastic leukemia (ALL) is characterized by preleukemic chromosomal translocations that occur before birth. The most common is the translocation t(12;21), which leads to the formation of the chimeric transcription factor *ETV6-RUNX1*. Further genetic aberrations are necessary for the development of leukemia. The frequency with which *ETV6-RUNX1*-positive preleukemic cells occur in neonates is still unclear. It was initially expected to be equivalent to the incidence of *ETV6-RUNX1*-positive leukemia in children ($\approx 1/10,000$). However, initial results showed that *ETV6-RUNX1* translocations occur 100× more frequently in neonates than actual children develop this leukemia. Subsequent studies used RNA and RT-PCR to determine prevalence. However, the low stability of RNA and the tendency of RT-PCR to give false positive results caused inconsistent results. Therefore, in a pilot project of the BMU/BfS, Prof. Robert Slany (Institute of Genetics, University of Erlangen-Nuremberg) and the project leaders developed a stable DNA-based method for the detection of preleukemic translocations (genomic inverse PCR for the detection of ligated breakpoints, abbreviated: GIPFEL). The GIPFEL method specifically detects gene fusions without prior knowledge of the breakpoint and with high sensitivity (10^{-4}). In another BMU/BfS project, this technique was adapted by the project leaders for the detection of translocation-positive cells in umbilical cord blood samples from healthy newborns. In a first population-based retrospective screening of 1000 healthy newborns, 5% showed *ETV6-RUNX1*-positive signals. To test this result in an

expanded cohort, the current project screened an additional 1405 cord blood samples from healthy newborns using the GIPFEL technique. The samples were collected in 2004 from hospitals in North Rhine-Westphalia and were asservated and pseudonymized at the José Carreras Stem Cell Bank (Director: Prof. Gesine Kögler). Of these 1405 cord blood samples, 103 (7.3%) were *ETV6-RUNX1*-positive. In five of these samples, the breakpoint could be determined by primerwalk and Sanger sequencing with base pair resolution and additionally verified in a second aliquot of the same cord blood sample by nested PCR.

In an accompanying project donor follow-up was used to compare screening results with actual leukemia cases. For this purpose, the families and donors of the 103 positive samples were contacted. 75 (73.5%) could be reached. None of the current 16- to 17-year-old adolescents contacted had developed ALL.

The breakpoint regions of *ETV6-RUNX1*-positive samples were compared with published leukemia breakpoints from patients of different ages. Breakpoints occurred significantly less frequently in cord blood at the 3' end of the *RUNX1* breakpoint region. Further studies may allow conclusions to be drawn on the molecular causes of the translocation and responsible noxious agents. Association of specific *ETV6-RUNX1* translocation regions with more frequent ALL development could possibly allow individualized early risk assessments. This study confirmed the high incidence of *ETV6-RUNX1*-positive preleukemic cells in healthy newborns and thus the high number of predisposed children in the population. However, the presented study confirms the low leukemia-inducing potential of the transcription factor *ETV6-RUNX1* itself. Therefore, the influence of secondary environmental or spontaneously occurring cooperating oncogenic lesions is of particular importance in the development of *ETV6-RUNX1*-positive childhood leukemia.

II. Kurze Darstellung

3. Aufgabenstellung

Die vom Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz, Bau und Reaktorsicherheit (BMU)/Bundesamt für Strahlenschutz (BfS) initiierte und geförderte epidemiologische Studie zu Kinderkrebs in der Umgebung von Kernkraftwerken (KiKK-Studie)¹ hat einen Zusammenhang zwischen der Nähe des Wohnortes zu einem Atomkraftwerk und der Entstehung von Leukämie bei Kindern ergeben. Daneben gibt es aus weiteren 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.²⁻⁴ Die *International Agency for Research on Cancer* (IARC) hat deshalb 2002 niederfrequente Felder als "möglicherweise kanzerogen" eingestuft. In beiden Fällen lässt sich das erhöhte Risiko mit dem derzeitigen wissenschaftlichen Kenntnisstand über Strahlenwirkungen nicht erklären. Andererseits ist aber nicht auszuschließen, dass bestimmte genetische Faktoren eine besondere Empfindlichkeit gegenüber Umwelttoxinen und speziell gegenüber ionisierender Strahlung oder niederfrequenten Magnetfeldern bedingen. Diese Frage kann nur durch eingehende Erforschung der Ursachen für Leukämie im Kindesalter und speziell der prädisponierenden genetischen Faktoren geklärt werden.

Das BMU/BfS hat ermittelt, dass bevölkerungsbasierte Studien zum „first hit“, d.h. zum Auftreten spezifischer chromosomaler Translokationen bei der Leukämie im Kindesalter, notwendig sind.⁵ Basis für diese Untersuchungen sind u.a. Nachweise einer präleukämischen Veränderung mit Hilfe der PCR-Technik. Ein geeignetes Screeningverfahren zur verlässlichen und sensitiven Detektion von chromosomalen Translokationen in klinischen Proben lange vor Ausbruch einer akuten Leukämie ist

in dem vom BfS geförderten Projekt 3611S70019 „Nachweis von chromosomalen Translokationen durch genomische PCR zur Identifizierung prä-leukämischer Zellen bei Kindern - Pilotstudie zur Entwicklung und Validierung geeigneter Sonden“ mit der GIPFEL-Methode (genomische inverse PCR für die Erfassung von ligierten Bruchpunkten GIPFEL, englisch: *genomic inverse PCR for evaluation of ligated breakpoints*) entwickelt worden.⁶ Dieses Verfahren nutzt genomische PCR-Primer für den Nachweis von Translokationen, die bei der Leukämie im Kindesalter häufig auftreten. Dieses Verfahren ist zunächst für die am häufigsten auftretende Translokation der Leukämie bei Kindern, t(12;21) (*ETV6-RUNX1*) in dem vom BfS geförderten Projekt 36 14 S 30034 „Validierung eines genomischen PCR-Verfahrens zum Nachweis von chromosomalen Translokationen zur Identifizierung prä-leukämischer Zellen bei Kindern – Pilotstudie“, weiter validiert worden. Die Durchführbarkeit eines Screenings auf Basis der GIPFEL-Methode an Nabelschnurblutproben von gesunden Neugeborenen wurde erprobt und eine Labor-übergreifende Standardisierung der Methode etabliert. Ein erstes populationsbasiertes Screening von 1000 Nabelschnurblutproben wurde durchgeführt und die Inzidenz präleukämischer Klone mit der Translokation *ETV6-RUNX1* in dieser Kohorte ermittelt. 5% der Neugeborenen wiesen *ETV6-RUNX1*-positive Zellen in ihrem Nabelschnurblut auf. Allerdings war es aufgrund der Anonymisierung der Proben nicht möglich zu prüfen, ob die Kinder im weiteren Verlauf ihres Lebens eine Leukämie entwickelt hatten.

In dem hier vorgestellten Projekt sollte dieses Screening an weiteren 1000 Neugeborenen durchgeführt, die Ergebnisse der vorherigen Studie validiert und eine Überprüfung des Gesundheitszustandes der Kinder durchgeführt werden. In einem ersten Bearbeitungsschritt sollte zunächst der vorliegende Stand von Wissenschaft

und Technik für die Zwecke des Vorhabens aufgearbeitet werden. Es sollte ein Überblick erstellt werden, über wichtige Untersuchungen und neueste Ergebnisse zur Detektion von genomischen Translokationsbruchpunkten und ihre Anwendbarkeit mit Vor- und Nachteilen.

In einem dritten Bearbeitungsschritt sollte die im Rahmen des Projektes identifizierten Bruchpunkte und -regionen *ETV6-RUNX1*-positiver Neugeborener mit denen von an Leukämie erkrankten verglichen und näher charakterisiert werden.

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

Die Auftragnehmer Prof. Dr. Arndt Borkhardt, Dr. Ute Fischer und Dr. Daniel Hein (Klinik für Kinder-Onkologie, -Hämatologie und Klinische Immunologie, Universitätsklinikum Düsseldorf) 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 (DNA-Isolierung, Restriktionsverdau, Zirkularisierung genomischer DNA-Fragmente, DNA-Präzipitation, PCR, Real-Time-PCR), ist in dem Labor der Antragsteller vorhanden. Zugang zu den erforderlichen Nabelschnurblutproben ist durch die Kooperation mit Frau Prof. Gesine Kögler (Leiterin der José Carreras Stammzellbank, Institut für Transplantationsdiagnostik und Zelltherapeutika (ITZ), Universitätsklinikum Düsseldorf) gegeben. Die José Carreras Stammzellbank stellte ein entsprechendes retrospektives Probenet von 1405 cryokonservierten Nabelschnurblutproben aus dem Jahr 2004 zur Verfügung, die an Kliniken in Nordrhein-Westfalen gesammelt und

in der Stammzellbank asserviert wurden. Translokations-tragende und negative Zelllinien zur Austestung der Methode waren bereits vorhanden. Ein Ethikvotum mit der Erlaubnis zur Verwendung des Probandenmaterials für Forschung, zur Durchführung des Translokations-Screenings sowie zur Rückverfolgung der Spender, um deren Gesundheitszustand abzufragen, lag bereits vor.

5. Planung und Ablauf des Vorhabens

Zur verlässlichen und hochsensitiven Detektion von niedrig-frequenten chromosomalen Translokationen in klinischen Proben wurde die GIPFEL-Methode entwickelt. Diese Methode wurde im vorliegenden Projekt eingesetzt, um die in vorherigen Studien beschriebene hohe Inzidenz der *ETV6-RUNX1*-Translokation in Nabelschnurblutproben von weiteren mindestens 1000 gesunden Neugeborenen zu validieren. Für populationsbasierte Screening-Projekte wurde die GIPFEL-Methode in einer ersten Studie auf cryokonserviertes Nabelschnurblut als Ausgangsmaterial übertragen und an einer Kohorte von 1000 Neugeborenen retrospektiv getestet. Allerdings war ein Abgleich mit dem tatsächlichen Vorliegen von Leukämien nicht möglich, da die zur Verfügung gestellten Proben anonymisiert worden waren. In dem aktuellen Projekt wurde daher eine retrospektive Sammlung cryokonservierter Nabelschnurblutproben gewählt, die die Rückverfolgung der Spender in einer begleitenden Studie zu dem hier berichteten Projekt zulässt (Kohorte der José Carreras Stammzellbank am ITZ, kurz: „ITZ-Kohorte“). Es wurden pseudonymisierte Proben aus dem Jahr 2004 untersucht. Die Spender sind zum Abschluss des Projektes 16 bis 17 Jahre alt und aus dem typischen Alter für das Auftreten der *ETV6-RUNX1*-positiven Leukämie (zwischen 2 und 5 Jahre) heraus. Rückverfolgung und Kontaktaufnahme wurden vom Kooperationspartner am ITZ vorgenommen, die

pseudonymisierten Proben im Labor der Projektleiter mittels GIPFEL analysiert und Validierungen und Analysen vorgenommen.

6. Stand der Wissenschaft und Technik

Die pädiatrische akute lymphatische B-Zell Leukämie (B-ALL) ist gekennzeichnet durch wiederkehrende präleukämische chromosomale Translokationen, die häufig bereits vor der Geburt auftreten.⁷⁻⁹ Die Translokation t(12;21), die zur Bildung des chimären Transkriptionsfaktors ETV6-RUNX1 führt, ist die häufigste strukturelle Aberration, die bei 25% der B-ALLs auftritt. Diese Translokation reicht allein jedoch nicht für die Entstehung einer Leukämie aus. Postnatal auftretende sekundäre genetische Veränderungen sind notwendig. Die Häufigkeit mit der ETV6-RUNX1-positive, prä-leukämische Zellen bei menschlichen Neugeborenen auftreten, ist noch unklar. Die beobachtete Inzidenz der ETV6-RUNX1-positiven ALL bei Kindern entspricht $\approx 1/10000$.

Die ETV6-RUNX1-Translokation wurde zum ersten Mal 2001 im Nabelschnurblut eines gesunden Neugeborenen sowie in peripheren Blutproben von 13 gesunden Kindern und Erwachsenen nachgewiesen.¹⁰ In einer ersten größeren Studie wurde 2002 gezeigt, dass ETV6-RUNX1-Translokationen bei $\sim 1\%$ der Neugeborenen (von n=567) im Nabelschnurblut vorhanden waren. Das deutete an, dass ETV6-RUNX1 positive Neugeborene 100-fach häufiger auftreten, als Kinder, die später an einer ETV6-RUNX1-positiven B-ALL erkranken.¹¹ Dies würde bedeuten, dass Translokations-tragende Zell-Klone bei der Mehrzahl der Kinder natürlicherweise ausgelöscht werden, bzw. bei an Leukämie erkrankten Kindern durch weitere Faktoren zur Entwicklung einer Leukämie angeregt wurden. Nachfolgende Studien konnten diese Ergebnisse jedoch nicht bestätigen.¹²⁻¹⁵ Die Inzidenz von ETV6-

RUNX1-positiven Neugeborenen wurde in verschiedenen Studien mit Werten zwischen 0,01% (entsprechend der Leukämierate)¹⁴ und 8,8% (880-fach höher als die Leukämierate)¹⁰ angegeben. Es wurde angenommen, dass technische Schwierigkeiten zu der großen Diskrepanz in den Ergebnissen verschiedener Studien geführt hatten (Tabelle 1 zeigt die verschiedenen Studien im Überblick).

Tabelle 1: Studien zur Inzidenz von *ETV6-RUNX1*-positiven präleukämischen Zellen in gesunden Probanden (Erw., Erwachsene; Neugeb., Neugeborene; NB, Nabelschnurblut; PB, peripheres Blut)

Studie	Probanden [n]	Positive [n]	Träger [%]	Präleuk. Zellen	Proben	Altersgruppe	Detektionsmethode	Sensitivität
Eguchi-Ishimae et al. ¹⁰	67	1	1.49		NB	Neugeb.	RNA, nRT-PCR	
Eguchi-Ishimae et al. ¹⁰	147	13	8.84		PB	Kinder, Erw.	RNA, nRT-PCR	
Mori et al. ¹¹	567	6	1.06	10 ⁻³ bis 10 ⁻⁴	NB, gefroren	Neugeb.	RNA, nRT-PCR, qRT-PCR, FISH	10 ⁻⁵
Olsen et al. ¹⁶	2005	10	0.50	10 ⁻⁵ bis 10 ⁻⁶	PB	Erw.	RNA, qRT-PCR	10 ⁻⁴ bis 10 ⁻⁵
Lausten-Thomsen et al. ¹²	27	0	0.00		Frische Embryo-Leber	Embryo 6.-10. Woche	RNA, qRT-PCR	10 ⁻⁴ bis 10 ⁻⁵
Lausten-Thomsen et al. ¹³	256	0	0.00		NB, frisch	Neugeb.	RNA, qRT-PCR	10 ⁻⁴ bis 10 ⁻⁵
Lausten-Thomsen et al. ¹⁴	1417	0	0.00	<10 ⁻⁵	NB, frisch	Neugeb.	RNA, qRT-PCR	10 ⁻⁴ bis 10 ⁻⁵
Zuna et al. ¹⁷	253	5	1.98		NB	Neugeb.	RNA, RT-PCR,	
Olsen et al. ¹⁵	1258	3	0.24	<10 ⁻⁴	NB, frisch	Neugeb.	RNA, qRT-PCR	10 ⁻⁴ bis 10 ⁻⁵
Škorvaga et al. ¹⁸	200		4.00	≤10 ⁻⁵	NB, gefroren	Neugeb.	RNA, qRT-PCR	10 ⁻⁵
Kusk et al. ¹⁹	32	0	0.00		NB	Neugeb.	RNA, qRT-PCR FISH	
Kusk et al. ¹⁹	5	0	0.00		PB	Erw.	RNA, qRT-PCR FISH	
Ornelles et al. ²⁰	210	5	2.38		NB, frisch	Neugeb.	RNA, nRT-PCR	
Kosik et al. ²¹	300	4	1.33	≤10 ⁻⁵	NB	Neugeb.	RNA, qRT-PCR	10 ⁻⁵
Schäfer et al. ²²	1000	50	5.00	10 ⁻² bis 10 ⁻⁵	NB, gefroren	Neugeb.	DNA, GIPFEL	10 ⁻⁴

Die bis 2018 meist verwendete Technik zum Nachweis von Translokationen war die Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR). Aus isolierter RNA wurde dabei zunächst das Fusionstranskript revers in komplementäre DNA (cDNA)

umgeschrieben und dann mittels PCR ein Teil dieser cDNA spezifisch vervielfältigt. Dabei wurden sogenannte „nested“ Primer verwendet, die in einer zweiten anschließenden PCR ein spezifisch voramplifiziertes Produkt noch einmal spezifisch vervielfältigten. Durch diesen zweiten PCR-Schritt wurde die Spezifität und Sensitivität der PCR erhöht (nRT-PCR). Die Detektion erfolgte anschließend mittels Gelelektrophorese und Färbung des amplifizierten cDNA-Fragmentes mit interkalierenden Farbstoffen (z.B. Ethidiumbromid). Andere Studien wiesen die Fusions-cDNA in einer quantitativen „Echtzeit“ (realtime)-PCR (qRT-PCR) mittels Fluoreszenz-basierter Detektion (SYBR-Green oder Fluoreszenz-gekoppelte Sonden) nach. Im Vergleich der beiden Techniken weist die nRT-PCR eine höhere Sensitivität auf, sie erlaubt jedoch keine Quantifizierung des nachgewiesenen Produktes wie bei der qRT-PCR. Die *ETV6-RUNX1*-Translokation generiert ein Fusionsprotein mit durchgängigem Leseraster. Hierbei werden nur wenige proteinkodierende Regionen (Exone) der Gene *ETV6* und *RUNX1* in eine mRNA übertragen. Diese mRNA ist relativ kurz und prinzipiell gut für eine Detektion mittels nRT- oder qRT-PCR geeignet. Beide Techniken sind schnell, viele Proben können innerhalb kurzer Zeit parallel untersucht und die Größe des erwarteten Amplifikationsprodukts kann exakt berechnet werden. Allerdings weisen die verwendeten RT-PCR-Techniken eine hohe Anfälligkeit für Kontaminationen und resultierende artifizielle Ergebnisse auf. Beim Pipettieren kann es z.B. über Aerosolbildung zu einem Übertrag von RNA oder cDNA von einer positiven zu einer negativen Probe kommen. Dabei erzeugt die RT-PCR für die *ETV6-RUNX1*-Translokation (abhängig von den gewählten Primern) immer ein identisches Signal, d.h. es entsteht das gleiche PCR-Amplifizierungsprodukt für alle positiven Fälle. Falsch-positive Ergebnisse konnten daher in diesen Studien anhand des Produktes nicht von tatsächlich positiven Ergebnissen unterschieden werden. Bei

DNA-basierten Methoden hingegen unterscheiden sich die Amplifikationsprodukte von Patient zu Patient in ihrer Größe und Sequenz (sie sind individuell spezifisch) und Kontaminationen sind leicht zu identifizieren. Identische Bruchpunkte auf DNA-Ebene wurden bislang nur für ein-eiige Zwillinge beschrieben.⁷

Die verwendeten RNA-basierten PCR-Methoden waren außerdem durch die inhärente Instabilität der RNA beeinträchtigt. Im Vergleich zu RNA ist DNA um einen Faktor von 10000 stabiler, und lässt sich über Jahre hinweg lagern, ohne dass ihre Amplifizierbarkeit beeinträchtigt wird. Die erfolgreiche Isolierung qualitativ hochwertiger RNA aus lange gelagerten klinischen Proben kann sehr leicht z.B. durch eine Kontamination mit RNA hydrolysierenden Enzymen (den RNasen), die einen Abbau der RNA katalysieren, verhindert werden. Spezielle Verfahren sind für eine erfolgreiche Isolierung und Lagerung von RNA erforderlich. Hier spielt häufig auch die Vitalität der eingefrorenen Zellen und die sachgemäße Bearbeitung der Proben eine wichtige Rolle. Die Qualität der RNA und der Reversen Transkription beeinflusst das Ergebnis der RT-PCR-basierten Fusionsgendetektion in hohem Maße und eine geringe Qualität kann zu falsch-negativen Signalen führen. Auch eine biologisch bedingte, abgeschaltete oder sehr geringe RNA-Expression des Fusionsgens in nur wenigen positiven Zellen unter einer Mehrzahl negativer Zellen kann zu einem falsch-negativen Ergebnis und zur fehlenden Detektion von nicht deutlich expandierten Zellklonen führen.

Bis zum Jahr 2018 hatten alle Studien RNA und RT-PCR zur Prävalenzbestimmung verwendet. Eine naheliegende Erklärung unterschiedlicher Ergebnisse lag daher in der geringen Stabilität der RNA (falsch negative Ergebnisse) und der Neigung der RT-PCR zu Kontaminationen (falsch positive Ergebnisse).

Eine weitere mögliche Ursache für die unterschiedlichen Ergebnisse dieser Studien könnte die Qualität des verwendeten Nabelschnurbluts sein: einige verwendeten es innerhalb von 24 Stunden nach der Blutentnahme, während andere auf kryokonserviertes Nabelschnurblut zurückgriffen. Während konserviertes Material aus retrospektiven Studien den Vorteil hat, in großer Zahl zur Verfügung zu stehen und parallel bearbeitet werden zu können, so ist die Vitalität der Zellen und die Intaktheit der daraus isolierten Nukleinsäuren eingeschränkt. Daher wäre anzunehmen, dass Studien, die kryokonserviertes Probenmaterial nutzten, mehr falsch-negative Ergebnisse liefern würden. Dieser Nachteil wäre bei der Isolierung der Zellen unmittelbar vor der Analyse minimiert. Eguchi-Ishimae et al.¹⁰ hingegen deuteten an, dass übermäßiger Zelltod beim Auftauen von konservierten Proben auch zu falsch-positiven Ergebnissen führen könnte. Signale, die während des programmierten Todes von Zellen entstehen, könnten in den Genen *ETV6* und *RUNX1* zu Doppelstrangbrüchen und zu einer *ETV6-RUNX1*-Fusion führen. Solche spezifischen Ereignisse wären allerdings sehr unwahrscheinlich und daher nur in vereinzelt Zellen (wenn überhaupt) zu erwarten. Die verwendeten Techniken wären nicht sensitiv genug, um diese nachzuweisen und die Größenordnung des Signals wäre deutlich unterschiedlich gewesen zu Signalen, die von expandierten Zellklonen herrühren.

Allerdings ließen sich die in den Studien aufgezeigten Unterschiede nicht auf die Verwendung von konserviertem oder frischem Zellmaterial zurückführen. Alle Studien, bei denen keine oder nur sehr wenige *ETV6-RUNX1* positiven Zellen im Nabelschnurblut nachgewiesen wurden, verwendeten das isolierte Probenmaterial direkt nach Isolierung.¹²⁻¹⁵ Dass die direkte Verwendung isolierter Zellen den Nachweis aber nicht prinzipiell negativ beeinflusst, zeigte die Studie von Ornelles et

al.,²⁰ in der 2,38% positive Proben in frisch isoliertem Nabelschnurblut identifiziert wurden (n=210).

Unterschiede in der *ETV6-RUNX1*-Frequenz in gesunden Populationen könnten theoretisch auch auf Unterschiede zwischen den untersuchten Kohorten zurückzuführen sein. Solche Unterschiede zwischen Populationen sind für einige Tumorentitäten bekannt, z.B. die in Lateinamerika häufiger als in Europa auftretende *TCF3-PBX1*-positive Leukämie (10-15% vs. 5-10%).^{23,24} Mit Ausnahme der Studie aus Japan von Eguchi-Ishimae et al.¹⁰ und der Studie aus den USA von Ornelles et al.²⁰ untersuchten jedoch alle Studien europäische Populationen. Ein Einfluss der ausgewählten Kohorte auf die gefundene Häufigkeit von *ETV6-RUNX1* bei Neugeborenen ist daher unwahrscheinlich. Allerdings hatten alle Studien, die keine *ETV6-RUNX1*-positiven Neugeborenen identifizieren konnten, die dänische Bevölkerung (auf RNA-Basis) untersucht. In einer Studie von Schäfer et al. konnten 2018 jedoch (auf DNA-Basis) auch Neugeborene aus Dänemark als *ETV6-RUNX1*-Träger identifiziert werden (5%, von n=1000)²² und die Inzidenz der *ETV6-RUNX1*+ B-ALL unterscheidet sich nicht zwischen Dänemark und anderen europäischen Ländern.²⁵ Olsen et al.¹⁶ wiesen außerdem *ETV6-RUNX1* im peripheren Blut von 10 von 2005 (~0,5%) gesunden dänischen Erwachsenen nach. Das ist statistisch mehr als erwartet, wenn die Inzidenz gleich der Leukämierate wäre (t-Test, P = 0,0019) und impliziert, dass dänische Erwachsene - und daher wahrscheinlich auch dänische Kinder- *ETV6-RUNX1* häufiger tragen als Kinder an dieser Leukämie erkranken.

Umstritten ist auch die Frequenz der *ETV6-RUNX1*-positiven Zellen bei gesunden Neugeborenen. Mori et al.¹¹ nannten hohe Frequenzen von 10^{-4} bis 10^{-3} . Dies konnte durch einige spätere Studien nicht bestätigt werden.^{14-16,18,21} Auch die Frequenz bei untersuchten Erwachsenen war deutlich niedriger, was jedoch zu dem verringerten

Risiko für *ETV6-RUNX1*-positive Leukämien bei Erwachsenen passen würde.¹⁶ In dem untersuchten peripheren Blut sind außerdem wenige sich noch entwickelnde Blutzellen (B-Vorläuferzellen) zu erwarten, die Träger der Translokation und wahrscheinlich Ursprung des präleukämischen Zell-Klons sind. In Nabelschnurblut finden sich mehr Blutstamm- und –vorläuferzellen als im peripheren Blut und es ist deshalb geeigneter, um *ETV6-RUNX1*-positive B-Vorläuferzellen nachzuweisen. Alle RNA-basierten Studien, die das Vorhandensein von *ETV6-RUNX1* bei gesunden Neugeborenen bestätigten, gaben eine niedrigere Frequenz an als Mori et. al.^{18,21} Bei Lausten-Thomsen et al. war die Frequenz $\leq 10^{-5}$.¹⁴ Daher könnte auch die Sensitivität der jeweiligen Methode und die gesetzten Schwellenwerte für die Definition einer positiven Probe ein wichtiger Unterschied zwischen den Studien sein.

Fast alle Studien verwendeten zusätzlich zur RT-PCR weitere Methoden zur Validierung der Ergebnisse. Mori et al. verwendeten die nRT-PCR für ein erstes Screening und anschließend die qRT-PCR und eine Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH), um ihr Ergebnis, dass bei ~1% aller Neugeborenen (6 von n=567) *ETV6-RUNX1* Translokationen nachweisbar sind, zu bestätigen.¹¹ Lausten-Thomsen et al. detektierten mittels qRT-PCR ebenfalls ~1% *ETV6-RUNX1*-positive Neugeborene (14 von n=1417) allerdings in sehr niedriger Frequenz (ca. 1 positive in 100 000 Zellen).¹⁴ Im Dotblot-Verfahren konnten 9 dieser Proben mittels spezifischer Hybridisierung in der betroffenen Gen-Region positiv validiert werden. Allerdings ergaben weitere Validierungen unter Verwendung von gelagerter mRNA oder durchflusszytometrisch sortierten Subpopulationen von Zellen (B-Zellen, T-Zellen bzw. andere (nicht-B, nicht-T) Zelltypen) derselben Proben keine positiven Ergebnisse. Dies führte die Autoren zu dem Schluss, dass die Frequenz *ETV6-RUNX1* positiver Neugeborener sowie die Frequenz dieser Zellen im Nabelschnurblut

der Neugeborenen deutlich geringer als von Mori et. al. vorgeschlagen und die positiven Ergebnisse dieser Studie auf Kontaminationen zurückzuführen sein müssten.^{11,14} Neuere Studien auf RNA-Basis schienen allerdings die Ergebnisse von Mori et al. zu bestätigen.^{18,20,21}

Im Vergleich zu RNA ist DNA um einen Faktor von 10000 stabiler, lässt sich über Jahre hinweg lagern, ohne dass ihre Amplifizierbarkeit beeinträchtigt wird und positive Ergebnisse können auf Sequenzebene eindeutig validiert werden. Eine erste Studie zur sensitiven Analyse der tatsächlichen Häufigkeit von *ETV6-RUNX1*-Translokationen bei 1000 gesunden Neugeborenen auf DNA-Basis wurde vom BMU/BfS gefördert. Zu diesem Zweck wurde eine neuartige PCR-Technik, die genomische inverse PCR zur Detektion von ligierten Bruchpunkten (abgekürzt: GIPFEL, Abbildung 1) entwickelt.⁶ Mittels der GIPFEL-Methode können Genfusionen ohne vorherige Kenntnis des exakten Bruchpunkts mit hoher Sensitivität (10^{-4}) und 100%-iger Spezifität nachgewiesen werden. Im Rahmen des BMU/BfS-Projektes 3614S30034 wurde diese Technik für den Nachweis von Translokations-positiven Zellen in Nabelschnurblutproben von gesunden Neugeborenen adaptiert und ein erstes populationsbasiertes, retrospektives Screening von 1000 gesunden Neugeborenen durchgeführt.²² In dieser Studie wurden 5% der gesunden Neugeborenen als *ETV6-RUNX1*-Träger identifiziert. Die Detektionsrate der Methode liegt bislang nur bei etwa 70%, weshalb damit zu rechnen ist, dass nicht alle betroffenen Proben als solche identifiziert werden konnten und die Inzidenz noch höher sein könnte. Auch Bruchpunkte außerhalb der Bruchpunktregionen, sowie wenige Basenpaar-lange Abschnitte in den Bruchpunktclustern können derzeit noch nicht abgedeckt werden. Die geschätzte Frequenz der *ETV6-RUNX1*-positiven Zellen wurde in gesorteten CD19-positiven B-Zellen ermittelt und ist deshalb nicht direkt

vergleichbar mit anderen Studien. Sie lag in dieser Studie zwischen 10^{-2} und 10^{-5} . Für den Nachweis ist außerdem die Effizienz der jeweiligen verwendeten PCR-Reaktion entscheidend und nicht vergleichbar mit anderen Studien. Die chromosomalen Bruchpunkte von fünf der fünfzig positiven Proben wurden sequenziert und auf diese Weise bestätigt. Zusätzlich konnte in zwei positiven Proben von denen noch RNA zur Verfügung stand, auch das Vorhandensein von *ETV6-RUNX1*-Transkripten durch qRT-PCR bestätigt werden. In dieser Studie gelang es erstmalig auf DNA-Ebene die sehr hohe Inzidenz von gesunden *ETV6-RUNX1*-Trägern nachzuweisen, von denen im weiteren Leben maximal 0,2% tatsächlich an einer Leukämie erkrankten. Die Studie war allerdings limitiert (1) durch die Anonymisierung der Proben und der damit fehlenden Überprüfbarkeit der möglichen Leukämie-Erkrankung von *ETV6-RUNX1*-Trägern sowie (2) der geringen Mengen und der eingeschränkten Qualität des verfügbaren Probenmaterials und der dadurch eingeschränkten Möglichkeiten weitere Untersuchungen durchzuführen (z.B. in weiteren Aliquots derselben Nabelschnurblutprobe oder zugehörigen RNA-Proben).

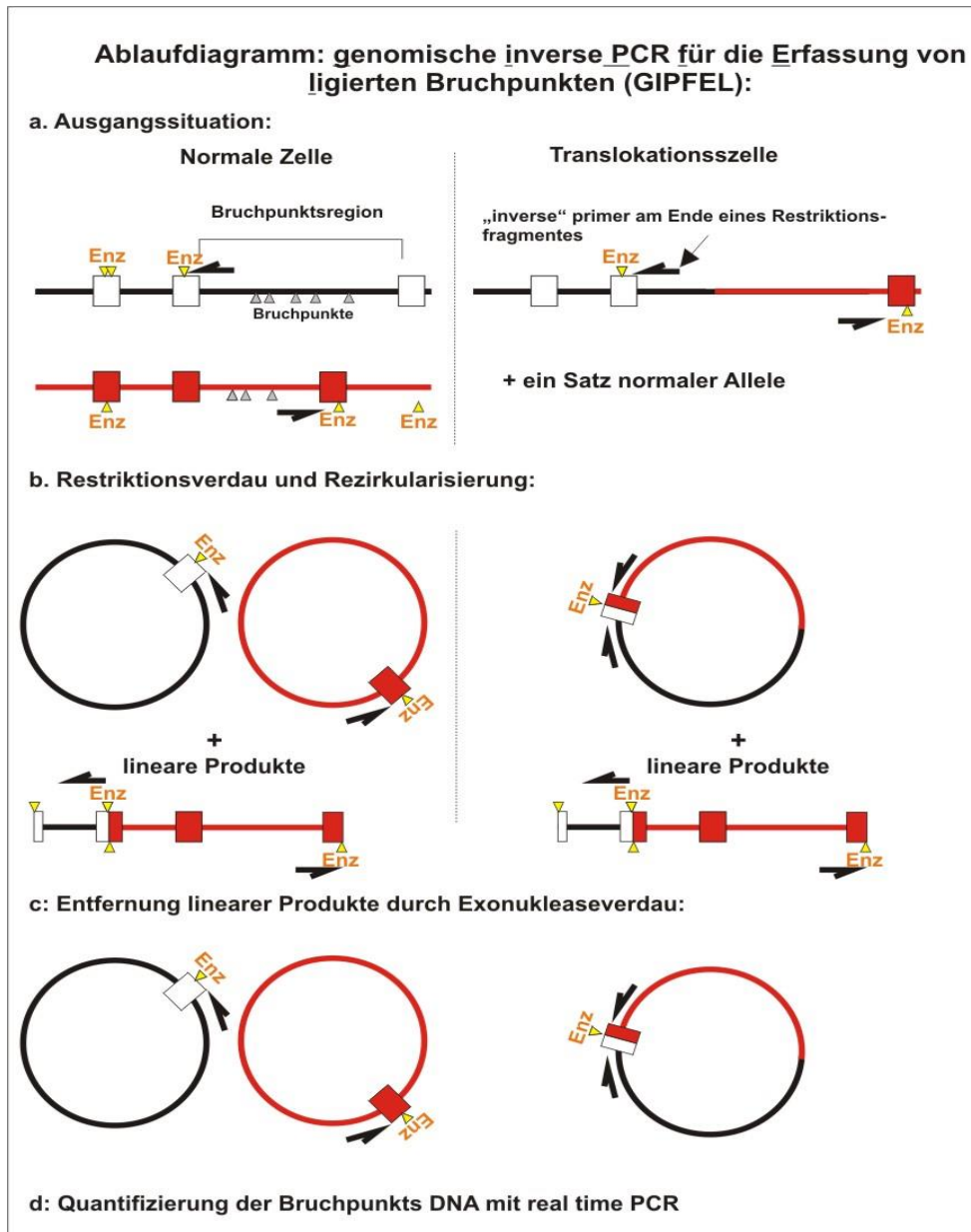


Abbildung 1: Prinzip der im BMU/BfS-Projekt 3614S30034 entwickelten GIPFEL-Analyse. (A) Die an der *ETV6-RUNX1*-Translokation beteiligten Gene (schwarze bzw. rote Linien) sind schematisch in normalen (links) und in Translokationszellen (rechts) dargestellt. Es wurde ein Restriktionsenzym (Enz) gewählt, das in der Bruchpunktregion der Gene schneidet. „Inverse“ PCR-Primer (schwarze Pfeile) binden am Ende der Restriktionsfragmente. **(B)** Nach Restriktionsverdau und Rezirkularisierung entstehen nur in Translokationszellen DNA-Zirkel, die aus Material von zwei verschiedenen Chromosomen zusammengesetzt sind. Nur dann kann mittels PCR ein Produkt amplifiziert werden. **(C)** Lineare Produkte werden durch einen Exonukleaseverdau abgebaut. **(D)** Es folgt eine PCR (nicht gezeigt), die ein charakteristisches kurzes Ligationsprodukt nachweist, dessen Sequenz exakt und unabhängig von der genauen Lage des Bruchpunktes vorhergesagt und mittels Real-Time PCR quantifiziert werden kann.

Die Sequenz und die Verteilung der Bruchpunkte, die bisher in gesunden Neugeborenen entdeckt wurden, scheinen zunächst keine Unterschiede zu denen in Leukämien von Kindern aufzuweisen (Abbildung 2). Wie diese befinden sie sich in den bekannten Bruchpunktregionen, in ihrer Nähe werden keine typischen Rekombinationssignalsequenzen gefunden und an der Fusionsstelle werden keine bzw. nur vereinzelt zusätzliche nicht-kodierte („Non-Template“) Nukleotide eingebaut.

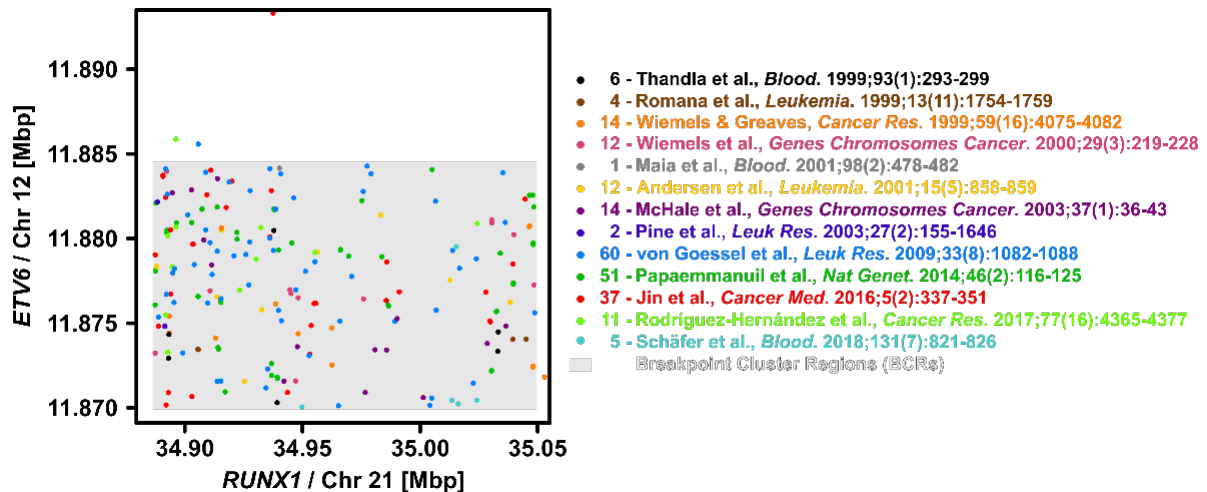


Abbildung 2: Verteilung von 229 publizierten *ETV6-RUNX1* Bruchpunkten. Darstellung der Bruchpunkte in den Bruchpunktregionen (*Breakpoint Cluster Regions*, grau unterlegter Bereich des Plots) der Gene *ETV6* (Y-Achse) und *RUNX1* (X-Achse). Die Bruchpunktkoordinaten sind der Literatur in der Legende entnommen.^{9,22,26-36} Die Anzahl beschriebener Bruchpunkte ist der Literatur vorangestellt. Im Plot sind die Bruchpunkte farblich entsprechend der jeweiligen Literaturangabe markiert. (Mbp, Mega-Basenpaare)

Die GIPFEL-Technik erlaubt (ohne Kenntnis des exakten Bruchpunkts) durch die Kenntnis der für die Amplifikation des positiven Produktes verwendeten Primer den Bereich der DNA, in dem die Fusion stattgefunden hat, stark einzugrenzen. Daher lassen sich auch statistische Aussagen zur Verteilung der Bruchpunkte in bestimmten Regionen machen. Wird das *ETV6*-Bruchpunktcluster in zwei Teile geteilt (Benutzung der Primer 1 und 2 bzw. des Primers 3) und das *RUNX1*-Bruchpunktcluster in vier Bereiche (Primer 1-6, 7-15, 16-22, 23-29), so ergeben sich acht verschiedene Bereiche (Abbildung 3A-D).

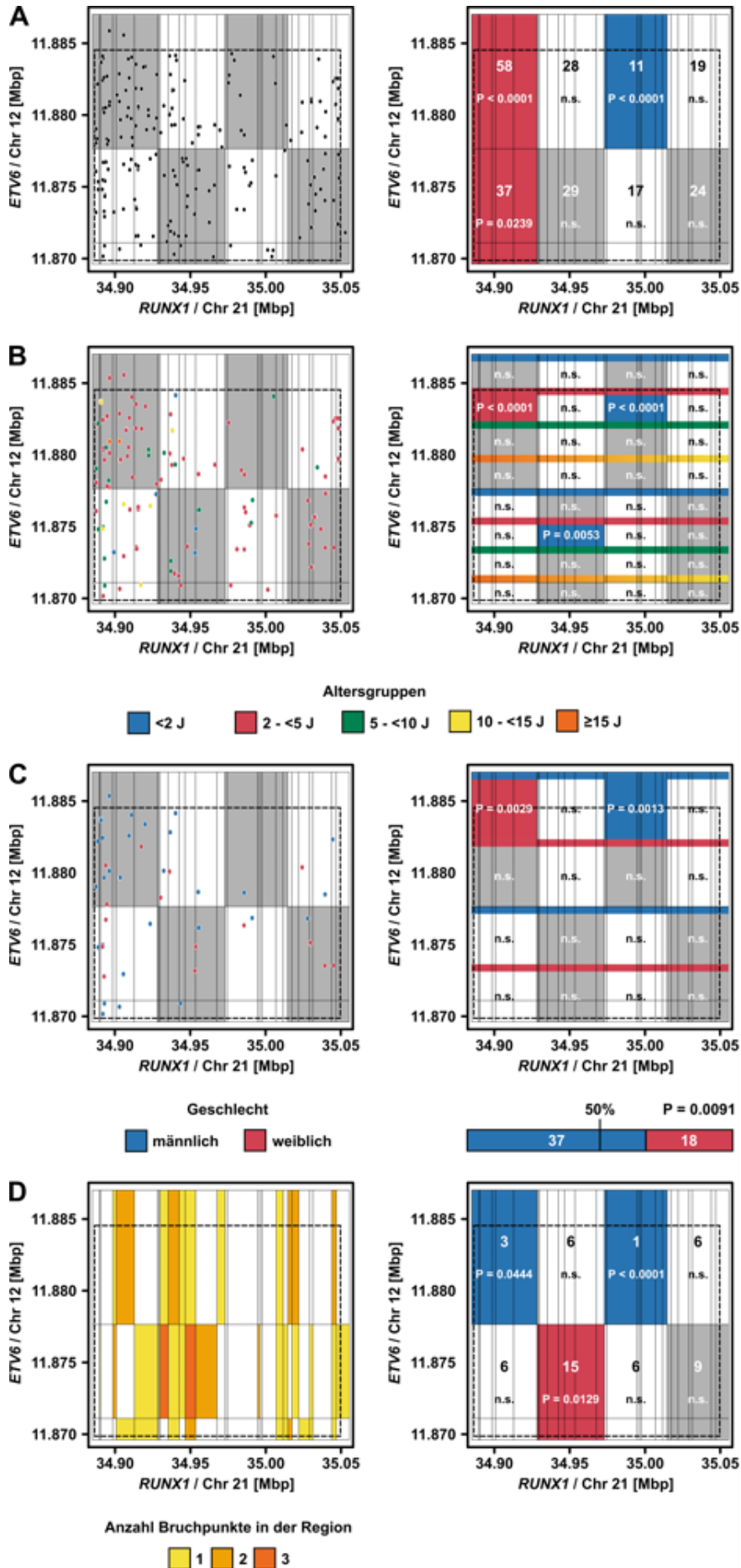


Abbildung 3: Statistische Verteilung der bekannten Bruchpunkte. Die durch GIPFEL-Primer abgedeckte Region wurde in acht Bereiche eingeteilt. **(A)** Links: Verteilung aller bekannten Bruchpunkte. Rechts: Anzahl der Bruchpunkte je Bereich. Rot bedeutet eine statistische Häufung der Bruchpunkte, blau signifikant weniger Bruchpunkte und grau bzw. weiß nicht signifikant (n.s.). Die P-Werte sind angegeben (t-Test). **(B)** Wie (A), aber mit verschiedenen Altersgruppen. Rechts sind die Altersgruppen durch farbliche Markierung getrennt. Die Gruppen der 10-<15-Jährigen und ab 15-Jährigen wurde für die statistische Auswertung zusammengefasst. **(C)** Wie (A) und (B), aber nach Geschlechtern getrennt. Im rechten Panel sind die Gruppen wie in (B) farblich getrennt. Zusätzlich ist rechts unten die statistische Häufung von männlichen Kindern dargestellt ($P = 0,0091$, t-test). **(D)** Links: Verteilung der Bruchpunkte gesunder *ETV6-RUNX1*-positiver Neugeborener des Screens von 1000 gesunden dänischen Neugeborenen.²² Die Einteilung erfolgte aufgrund der benutzten Primer. Rechts: wie (A).

Bei Leukämien liegen die Bruchpunkte statistisch am häufigsten am 3'-Ende beider Bruchpunktcluster ($P < 0,0001$). In drei der vier Cluster am 5'-Ende von *RUNX1* kommen sie dagegen deutlich seltener vor ($P < 0,0001$, $P = 0,0483$, $P = 0,0107$). Diese Häufung an den 3'-Enden findet sich hauptsächlich in der Altersgruppe der 2 bis 5,9-Jährigen. Im Vergleich dazu kommt es bei den gesunden Kindern eher zu einer Häufung von Bruchpunkten im 5'-Bereich des *ETV6*-Clusters und dem Bereich 3' der Mitte des *RUNX1*-Clusters ($P = 0,0362$). 5' der Mitte von *RUNX1* und 3' des *ETV6*-Clusters kommt es hingegen zu signifikant weniger Brüchen ($P < 0,0001$) (Abbildung 3D). *ETV6-RUNX1*-positive Leukämien treten signifikant häufiger in Jungen als in Mädchen auf ($P = 0,0091$) (Abbildung 3C). Bei Neugeborenen kann dazu aufgrund der anonymisierten Probenbearbeitung keine Aussage getroffen werden. Deutlich wird, dass weitere Untersuchungen in größeren Kohorten nötig sind, um Bruchpunkte in Neugeborenen eingehend zu charakterisieren.

III. Eingehende Darstellung

7. Erzielte Ergebnisse

7.1 Screening von 1405 Nabelschnurblutproben

Nabelschnurblutproben einer Kohorte von mindestens 1000 Neugeborenen sollten mittels der GIPFEL-Technologie auf das Vorhandensein der *ETV6-RUNX1*-Translokation getestet werden. Diese hohe Anzahl an Nabelschnurblutproben erforderte eine Zusammenarbeit mit einem Zentrum, das solche Proben seit Jahren routinemäßig konserviert und analysiert. Hier wurde daher die Kooperation mit einer professionellen Nabelschnurblutbank gesucht und etabliert. Die an der Heinrich-Heine-Universität angesiedelte, 1992 gegründete José Carreras Stammzellbank (am Institut für Transplantationsdiagnostik und Zelltherapeutika (ITZ)), eine allogene Nabelschnurblutstammzellbank, wird geleitet von Frau Prof. Gesine Kögler und unterstützte das Projekt durch die Bereitstellung von Nabelschnurblutproben.

Die von der Deutschen José Carreras Leukämienstiftung e.V. unterstützte Nabelschnurblutstammzellbank in Düsseldorf ist eine der größten Banken weltweit. Die Stammzellbank hat eine Herstellungserlaubnis (Bezirksregierung Düsseldorf) und eine Zulassung für das Arzneimittel Nabelschnurblut durch das Paul-Ehrlich-Institut (Zul.-Nr.: PEI.H.00383.01.1, Zul.-Nr.: PEI.H.00383.02.1). Die Stammzellbank kooperiert mit 58 regionalen Frauenkliniken und hat bereits über 28000 kryokonservierte und charakterisierte Präparate hergestellt, wovon mehr als 1200 gespendete Transplantate weltweit für die allogene Stammzelltransplantation genutzt wurden. Die Arzneimittelzulassung nach AMG, die Akkreditierungen/Zertifizierungen durch internationale Organisationen wie FACT/NETCORD (Akkreditierungsgruppe für die Erstellung der weltweiten Prozessierung/Qualitätsstandards von

Stammzellbanken), NMDP, WMDA für diese Stammzellpräparate zeigen den hohen Qualitätsstandard der Stammzellbank und der asservierten Proben. Die gelagerten großen Materialmengen ermöglichen auch eine zusätzliche Validierung der Ergebnisse in verschiedenen cryokonservierten Aliquots derselben Nabelschnurblutproben.

Die angestrebte Fallzahl (n=1000 Nabelschnurblutproben) wurde erreicht. Aus klinikseigenen Sach- und Personalmitteln wurde das Screening noch erweitert, so dass 1405 Nabelschnurblutproben neugeborener Kinder aus dieser Stammzellbank aus dem Jahr 2004 (Alter der Kinder heute: 16-17 Jahre) mittels der standardisierten GIPFEL-Methode auf Vorliegen der *ETV6-RUNX1*-Translokation untersucht werden konnten. Ein repräsentatives Beispiel für eines der positiven GIPFEL-Ergebnisse ist in Abbildung 4 gezeigt. Die GIPFEL-Ergebnisse wurden als qualitatives Ergebnis, d.h. positives Real-Time-PCR-Ergebnis, PCR Bande erwarteter Länge und Identifizierung des Ligationspunktes mittels Sanger-Sequenzierung dokumentiert (Anhang: 9. Tabellen, Tabelle 2). Eine relative Quantifizierung der Ergebnisse erfolgte anhand eines internen Standards (*RUNX1*-Wildtypkontrolle). Die Lage der DNA-Fusionsbruchpunktregion wurde bestimmt.

103 von 1405 Proben wurden mittels der GIPFEL-Technik als *ETV6-RUNX1*-positiv identifiziert und durch Sanger-Sequenzierung validiert. Dies entspricht einer Inzidenz von ~7,3% bei den untersuchten gesunden Neugeborenen. Die Frequenz ist in dieser Kohorte etwas höher als im vorangegangenen Screen (5%, n=1000²²). Dies beruht wahrscheinlich in erster Linie auf der höheren Qualität der verwendeten Proben aus der Düsseldorfer José Carreras Nabelschnurblutbank verglichen mit den in der früheren Untersuchung verwendeten prospektiv gesammelten klinischen Proben, die von Prof. Schmiegelow vom Rigshospitalet (Kopenhagen, Dänemark) zur Verfügung

gestellt wurden. In dieser früher untersuchten Kohorte waren 15,2% der Proben nicht auswertbar und die -nur auf auswertbare Proben bezogene- korrigierte Inzidenz *ETV6-RUNX1*-positiver Neugeborener betrug 5,9%.

ETV6-RUNX1-positiven Zellen traten in der aktuellen und der vorherigen Studie ²² mit einer Frequenz von ≈ 1 pro 100 bis 1 pro 100.000 negativer Zellen auf (10^{-2} bis 10^{-5}).

Wie im vorherigen Screen ²² wurden auch in der aktuellen Studie Proben (n=4) identifiziert, in denen gleichzeitig zwei Klone mit verschiedenen *ETV6-RUNX1*-Bruchpunkten nachgewiesen werden konnten. Die Frequenzen, mit denen diese Bruchpunkte nachgewiesen wurden, sowie die verantwortlichen Primer, sprechen in allen Fällen für das gleichzeitige Vorliegen zweier verschiedener Klone aus zwei separaten, mutagenen Ereignissen (Proben-Nr. 1041: $2,7 \times 10^{-5}$ und $7,4 \times 10^{-5}$; Proben-Nr. 1146: $6,6 \times 10^{-5}$ und $2,1 \times 10^{-5}$; Proben-Nr. 1744: $4,8 \times 10^{-4}$ und $7,0 \times 10^{-5}$; 2322: $6,9 \times 10^{-4}$ und $3,5 \times 10^{-3}$).

Eine Zusammenfassung aller positiv getesteten Proben präsentiert Tabelle 2 (Anhang 9. Tabellen).

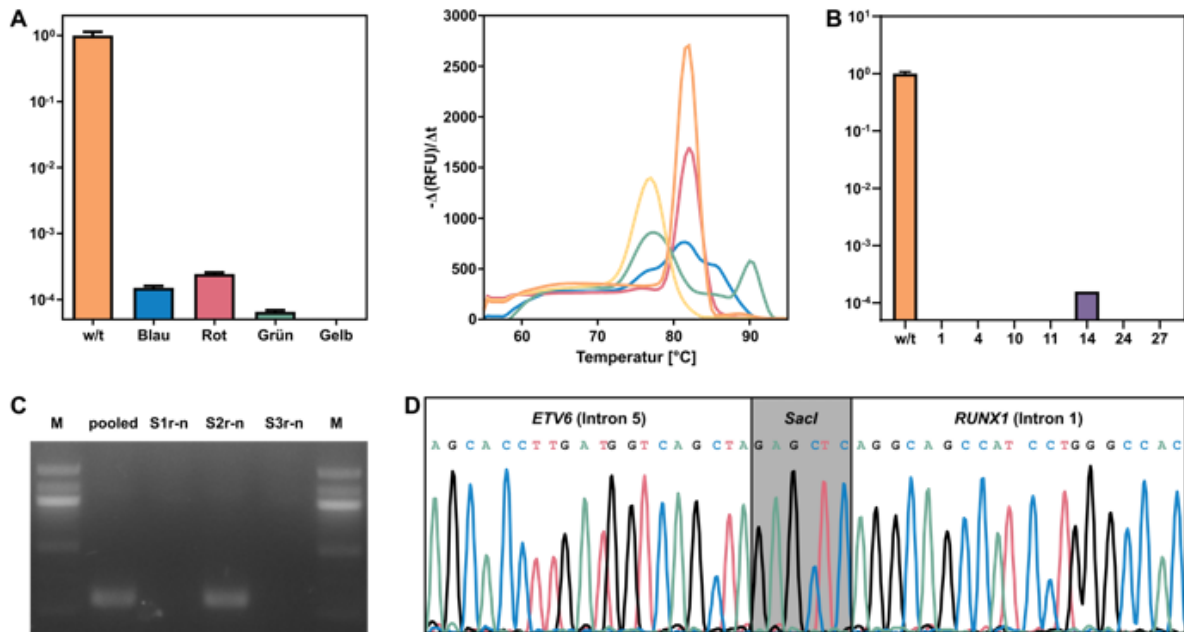


Abbildung 4: Repräsentatives Beispiel einer mittels GIPFEL positiv auf das Vorliegen der *ETV6-RUNX1*-Translokation getesteten Nabelschnurblutprobe (Probennummer 1293). (A) Ergebnis der ersten qPCR. Die Vorwärts-Primer sind in vier farbcodierten Gruppen gemultiplext. Als positive Kontrolle (w/t) wird eine Amplifikation von *RUNX1* außerhalb der Bruchpunktsregion durchgeführt, die bei jeder Probe vorhanden sein muss. Diese Kontrolle wird für die Normalisierung der Amplifikation der gemultiplexten Primerpakete genutzt. Die Amplifikationen der Primerpakete „blau“ und „rot“ überschreiten die Detektionsschwelle von 10^{-4} (linkes Panel). Die zugehörige Schmelzkurve der qPCR (rechtes Panel) zeigt für Primerpaket „blau“ mehrere unspezifische Produkte, für „rot“ ein spezifisches Produkt. (B) Die Primer des Multiplex-Primerpakets „rot“ wurden darauf einzeln in weitere qPCRs eingesetzt, um den für die Amplifikation in (A) verantwortlichen *RUNX1*-Primer zu identifizieren. Der Primer 14 wurde identifiziert. (C) Es wurde eine Agarosegelelektrophorese einer PCR mit Vorwärts-Primer 14 und den gedemultiplexten Rückwärts-Primern für *ETV6* S1r-n, S2r-n und S3r-n durchgeführt. Die Primer wurden auch gemultiplext („pooled“) mitgeführt. Die Kombination von *RUNX1*-Vorwärts-Primer 14 und *ETV6*-Rückwärts-Primer S2r-n ist verantwortlich für die Amplifikation und erzeugt ein Produkt in der erwarteten Größe. (D) Mittels Sanger-Sequenzierung konnte der Ligationsspunkt (*SacI*-Schnittstelle) zur Bestätigung des Nachweises von *ETV6-RUNX1* identifiziert werden. Die Sequenz entspricht der Sequenz, die zu erwarten ist, wenn die Primer 14 und S2r-n benutzt werden. Die Ligationstelle ist grau hinterlegt.

7.2 Charakterisierung der Bruchpunktregionen *ETV6-RUNX1*-positiver Proben

Zur weiteren Validierung der Ergebnisse wurden *ETV6-RUNX1*-positiv getestete Proben durch Sequenzierung der Bruchpunkte näher charakterisiert. Dazu wurden die Translokations-tragenden DNA-Zirkel zunächst (ähnlich wie bei einer Ganzgenomamplifizierung, allerdings mit Primern, die spezifisch für die *ETV6-RUNX1*-Region sind) unter Verwendung einer *Ultra-Long-Range-Polymerase* vermehrt (Abbildung 5). Der amplifizierte DNA-Zirkel wurde dann per Primerwalk sequenziert bis der Bruchpunkt gefunden wurde.

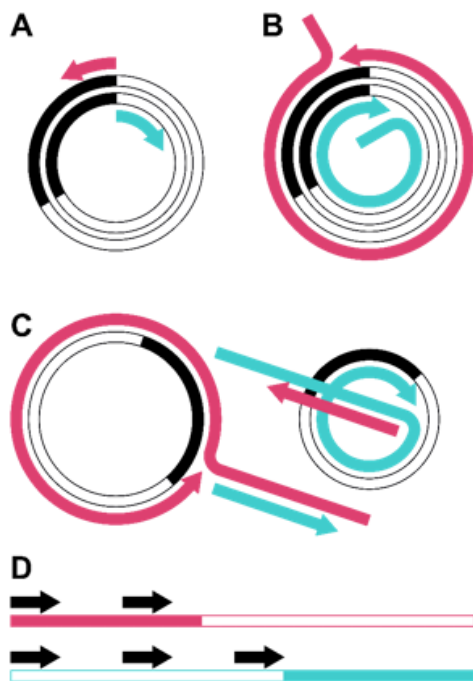


Abbildung 5: Amplifikation und Primerwalk zur Bestimmung der *ETV6-RUNX1*-Bruchpunkte unter Verwendung der in GIPFEL erzeugten zirkulären DNA (Gene *ETV6* (in weiß) und *RUNX1* (in schwarz)). (A) Für beide Stränge eines DNA-Zirkels wurde je ein Primer konzipiert, der von der Ligationstelle in Richtung Bruchpunkt zeigt (roter und türkiser Pfeil). (B) Per Rolling-Circle-Amplifikation wurde die DNA mit Hilfe dieser Primer und einer Ultra-Long-Range-Polymerase zunächst vermehrt. (C) Durch weiteres Amplifizieren ergaben sich erneut Primerbindungsstellen an der bereits amplifizierten DNA, die eine zusätzliche Vermehrung ermöglichten. (D) Für die amplifizierte DNA wurden Primer (schwarze Pfeile) in bestimmten Abständen konzipiert und für die Sanger-Sequenzierung eingesetzt, bis der Bruchpunkt gefunden wurde.

Auf diese Weise konnten die Bruchpunkte von fünf gesunden Neugeborenen auf Nukleotidebene identifiziert werden (Abbildung 6).

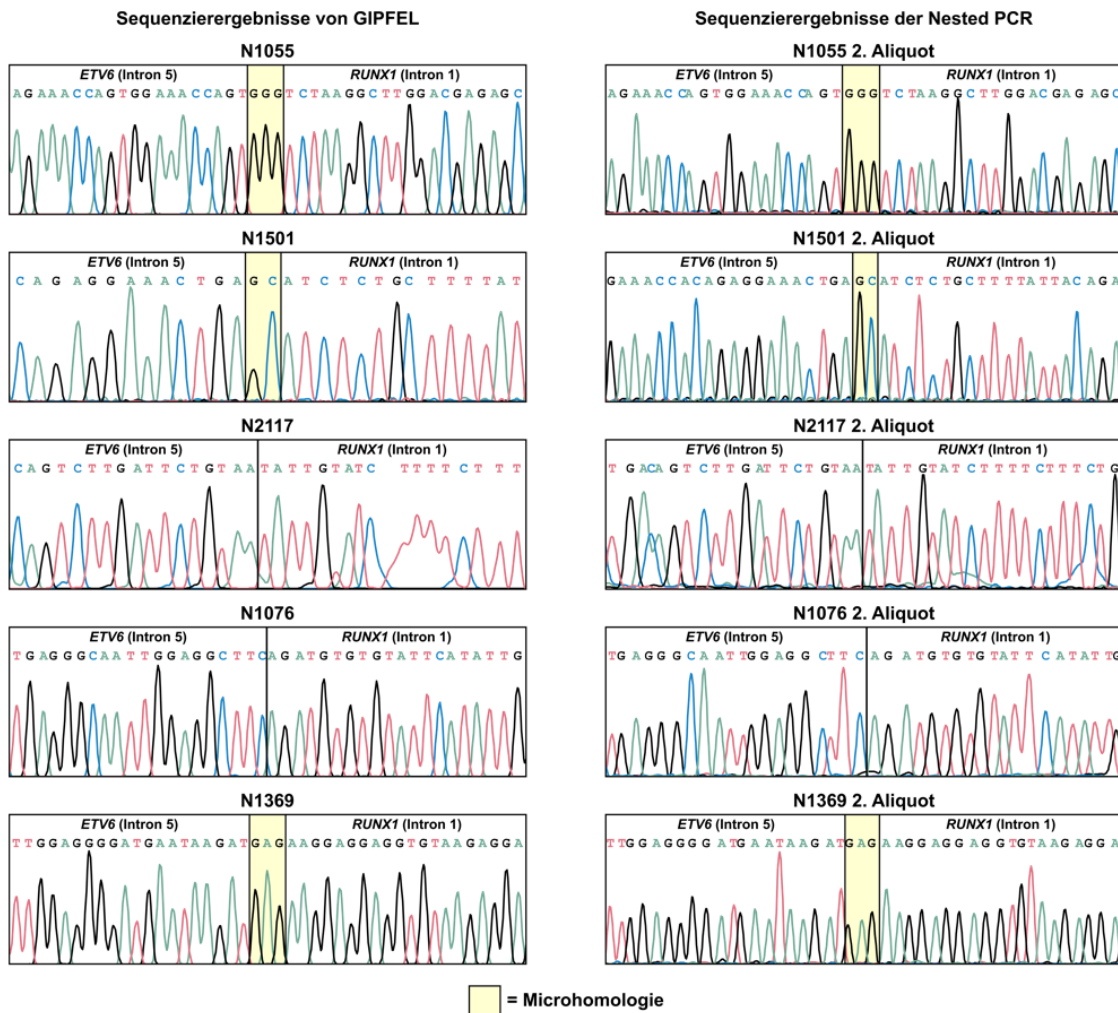


Abbildung 6: Auf DNA-Ebene sequenzierte *ETV6*-*RUNX1*-Bruchpunkte. Links das Ergebnis der Sanger-Sequenzierung der zirkulären GIPFEL-Produkte, rechts die Sequenzierung aus einem zweiten Aliquot derselben Probe. Hier wurde der bereits bekannte Bruchpunkt gezielt durch eine nested-PCR amplifiziert und sequenziert. Die gelb hinterlegten Bereiche stellen Mikrohomologien zwischen den Genen *ETV6* und *RUNX1* dar, so dass der in diesem Bereich liegende Bruchpunkt nicht basengenau zugeordnet werden kann.

Die sequenzierten Bruchpunkte wurden mit aus der Literatur bekannten Bruchpunkten verglichen (Abbildung 7 und 8). Bei den gesunden Probanden sind ebenso wie bei an Leukämie erkrankten, nur wenig bis keine Nukleotidinsertionen an den Bruchpunkten

zu finden (Abbildung 6) und es wurden keine Rekombinationssignale in der Nähe der Bruchpunkte identifiziert.

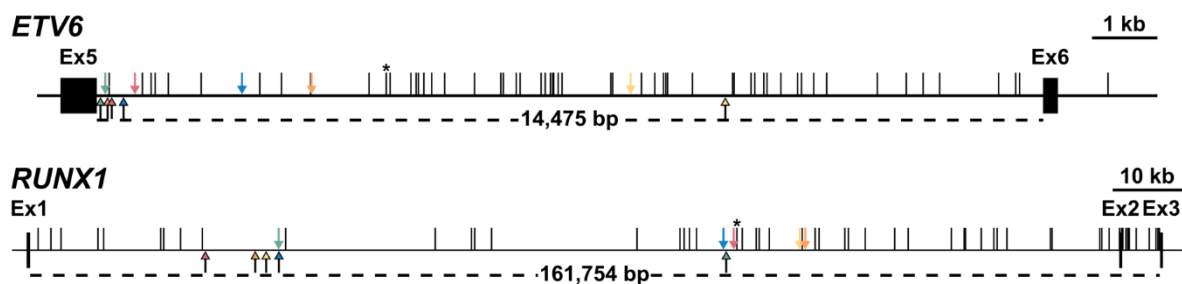


Abbildung 7: Verteilung der Bruchpunkte. Die exakten Positionen der identifizierten Bruchpunkte in den Bruchpunktclusterregionen (BCR) der beiden Gene *ETV6* (oberes Panel) und *RUNX1* (unteres Panel). Die gestrichelten Linien markieren die jeweilige BCR. Schwarze Boxen zeigen die Exons an, vertikale schwarze Linien bekannte Bruchpunkte aus ALL-Patienten, das Sternchen markiert den Bruchpunkt der *ETV6-RUNX1*-positiven ALL-Zelllinie REH. Pfeile oberhalb des Gens zeigen die in dieser Studie identifizierten und validierten Bruchpunkte, Pfeile unterhalb des Gens zeigen Bruchpunkte, die in einer früheren Studie identifiziert wurden.²² Die hier gefundenen Bruchpunkte sind: 1055 (rot), 1076 (grün), 1369 (gelb), 1501 (blau) und 2117 (orange).

Die Kenntnis des genauen Bruchpunktes wurde für einen weiteren Validierungsschritt genutzt. Hierzu wurden nested Primer konzipiert, die ein Fragment über den Bruchpunkt amplifizieren. Ein zweites Aliquot der Nabelschnurblutprobe desselben Kindes wurde aufgetaut, DNA daraus isoliert und die nested-PCR mit anschließender Sanger-Sequenzierung des PCR-Produktes durchgeführt. In allen fünf Nabelschnurblutproben, für die die Bruchpunktsequenz bekannt war, konnte mittels dieser zweiten, unabhängigen PCR der Bruchpunkt in einer zweiten Probe validiert werden (Abbildung 6).

Zum Vergleich der Verteilung der Bruchpunkte von Gesunden und an Leukämie erkrankten Probanden wurden die GIPFEL-Ergebnisse genutzt, die eine Zuordnung eines positiven Ergebnisses zu bestimmten Regionen der Bruchpunktclusterregion erlauben.

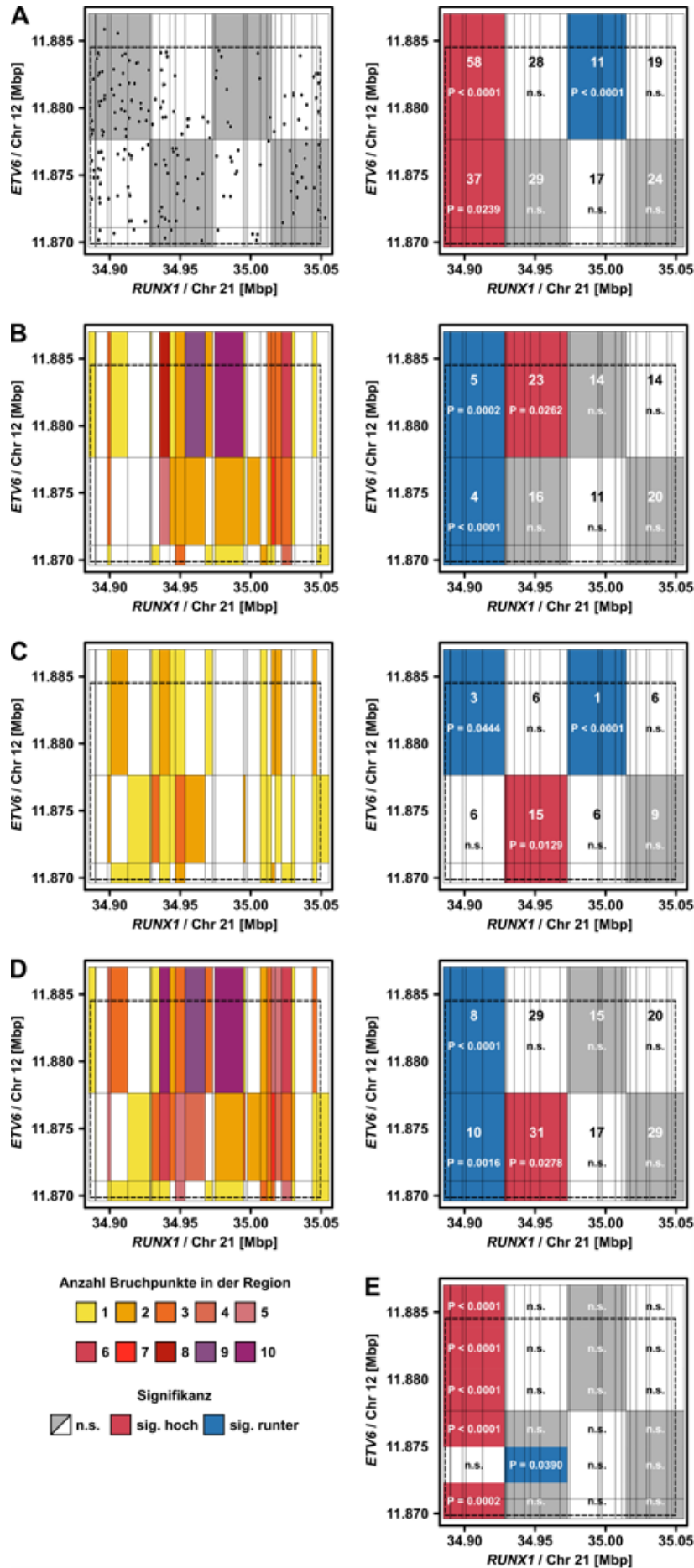


Abbildung 8: Verteilung der identifizierten Bruchpunkte und deren statistische Häufung. Dargestellt ist jeweils die Bruchpunkt - Cluster - Region (BCR, Kästchen mit gestrichelter Linie). Die dünnen senkrechten und horizontalen Linien teilen die von den verschiedenen Primern abgedeckten Bereiche. Die grau-weiß abgehobenen Felder stellen die größeren Bereiche dar, die durch GIPFEL abgedeckt sind und wurden zur statistischen Auswertung benutzt. **(A)** In der Literatur veröffentlichte Bruchpunkte von ALL-Patienten. Schwarze Punkte zeigen Bruchpunkte (linkes Panel). Statistische Häufungen der Bruchpunkte sind rot dargestellt, geringeres Vorkommen blau (rechtes Panel). **(B)** Bruchpunktsbereiche in der untersuchten ITZ-Kohorte (n = 1405). Die Bruchpunkte sind anhand der benutzten Primer bestimmten Bereichen in den BCRs der Gene zugeordnet (linkes Panel). Statistische Häufungen sind rot dargestellt, geringeres Vorkommen blau (rechtes Panel). **(C)** Darstellung prinzipiell wie in (B), für die bereits früher analysierte dänische Kohorte ²² (DK, n = 1000). **(D)** Wie in (B) und (C), beide Kohorten kombiniert (ITZ und DK, n = 2405). **(E)** Statistischer Vergleich zwischen ALL-Bruchpunkten und Nabelschnurblut-Bruchpunkten. Je Block sind drei Signifikanzen angegeben: Die oberste ist der Vergleich ALL vs. ITZ-Kohorte, der mittlere ALL vs. DK-Kohorte und der untere ALL vs. ITZ+DK-Kohorten. Rot zeigt eine Häufung von Bruchpunkten in ALL, blau eine Häufung im Nabelschnurblut. Statistische Tests für (A)-(D): Einzelproben-t-Tests; statistische Tests für (E): One-way ANOVA gefolgt von Dunnets Test.

Auf Basis der bisher erhaltenen Daten kann die tatsächliche Inzidenz *ETV6-RUNX1*-positiver präleukämischer Zellen in gesunden Neugeborenen auf 5 bis 7,3% geschätzt werden. In einer früheren Studie⁶ konnten anhand der GIPFEL-Technik nur 70% der untersuchten *ETV6-RUNX1* Translokationen in leukämischen Blasten von Patienten dieses Subtyps (n=61) erfolgreich detektiert werden. D.h. in dieser Studie wurden 30% der bekannten, vorhandenen Bruchpunkte nicht detektiert. Ursache dafür könnten komplexe Translokationen sein, die mehrere Gene betreffen, oder Translokationen, die außerhalb der bekannten, zumeist betroffenen Bruchpunktregionen liegen. In dieser früheren Studie wurde Zellmaterial verwendet, dass zu >80% aus Translokation-tragenden Zellen bestand. Bei Nabelschnurblutproben nimmt man an, dass die Zahl Translokation-tragender Zellen bei $\leq 10^{-4}$, dem Sensitivitätsschwellenwert der GIPFEL-Methode liegt. Da die GIPFEL-Methode im Wesentlichen durch die Menge der die Translokation-tragenden DNA limitiert ist,

könnte die Detektionsrate bei Nabelschnurblutproben daher noch unter 70% liegen und die Inzidenz der *ETV6-RUNX1*-Translokationen daher noch erheblich höher sein. In der untersuchten Population (wohnhaft in Deutschland zum Diagnosezeitpunkt) betrug die allgemeine Malignomrate ~15 bezogen auf 100.000 Kinder unter 15 Jahren (alterstandardisiert, Segi Welt-Standardpopulation, Quelle: Robert Koch Institut, „Krebs in Deutschland 2007-2008“ (Daten des Deutschen Kinderkrebsregisters (DKKR)). Das kumulative Risiko eines neugeborenen Kindes, innerhalb der ersten 15 Lebensjahre ein Malignom zu entwickeln, betrug 225 auf 100.000 (0,2 %). Etwa 1 von 500 Kindern entwickelte eine bösartige Krebserkrankung. Häufigste Einzeldiagnose war die akute lymphoblastischen Leukämie (~30%).

Die Inzidenz der akuten lymphoblastischen Leukämie in dem untersuchten Zeitraum (Diagnose im Jahr 2006-9) beträgt ~4,3 auf 100.000 Kinder, die der *ETV6-RUNX1*-positiven lymphoblastischen Leukämie ~1 auf 100.000 (Quellen: Robert Koch Institut, Krebs in Deutschland, Ausgaben 7-9; ³⁷). D.h. das kumulative Risiko, dass Kinder bis zu einem Alter von 6 Jahren (nach dem Alterspeak der *ETV6-RUNX1*-positiven akuten lymphoblastischen Leukämie von 2-5 Jahren) eine solche Leukämie entwickelten, betrug 6 auf 100.000 (0,006%). Die gewonnenen Daten bestätigen daher, dass die Inzidenz von *ETV6-RUNX1* Translokationen bei Neugeborenen hoch ist (~5-8%) und die Inzidenz der Leukämie (~0,006%) übersteigt. Die Translokationen führen also nur in sehr seltenen Fällen zu einer Leukämie. Die Penetranz und das Leukämie induzierende Potenzial des chimären Transkriptionsfaktors *ETV6-RUNX1* ist daher bei menschlichen Neugeborenen als gering zu bewerten und der Einfluss sekundärer umweltbedingter oder spontan auftretender kooperierender onkogener Läsionen bei der *ETV6-RUNX1*-positiven Kinderleukämie als entscheidend anzusehen.

7.3 Rückverfolgung und Gesundheitszustand der Nabelschnurblut-Spender

Die Ethikkommissin der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität erlaubt im Falle der untersuchten Kohorte des ITZ eine Kontaktaufnahme zu den Nabelschnurblut-Spendern bzw. deren Sorgeberechtigten, um den Gesundheitszustand bzw. durchlebte Krankheiten erfragen zu können. Diese Möglichkeit erlaubt eine Rückverfolgung der Spender sowie im Falle einer Transplantation des Nabelschnurblutes einen Ausschluss sekundärer Krankheiten durch das Transplantat.

In einem Begleitprojekt zu dem hier berichteten Forschungsprojekt haben wir daher die GIPFEL-positiven Spender kontaktiert, um den Gesundheitszustand bzw. die Gesundheitshistorie der mittlerweile 16-Jährigen abzufragen. Aus datenschutzrechtlichen Gründen erfolgte die Kontaktaufnahmen durch das ITZ. Durch die vergleichsweise lange Zeitspanne zwischen Nabelschnurblutspende und Kontaktaufnahme, konnten auch mit Hilfe der Melderegister nicht mehr alle Spender bzw. deren Sorgeberechtigten erreicht werden. Von 103 *ETV6-RUNX1*-positiven Fällen haben 75 (73,5%) geantwortet. Von diesen hatte ein Spender eine Mukoviszidose entwickelt, die anderen 74 waren gesund. Keiner der *ETV6-RUNX1*-positiven Spender, die erreicht werden konnten, hat eine Leukämie entwickelt (Abbildung 9). Aufgrund des jetzigen Alters der Spender kann davon ausgegangen werden, dass sie auch in der Zukunft keine *ETV6-RUNX1*-positive Leukämie entwickeln werden, da das Hauptinzidenzalter dieser Erkrankung zwischen zwei bis fünf Jahren liegt, und die Spender schon weitaus älter sind. Bei Jugendlichen und Erwachsenen ist die *ETV6-RUNX1*-positive Leukämie sehr selten.

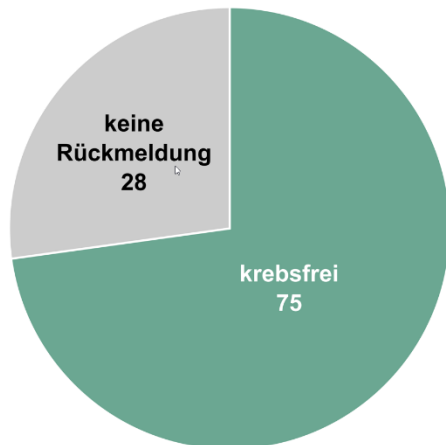


Abbildung 9: Rückverfolgung der GIPFEL-positiven Nabelschnurblutproben. Die Familien und Spender der 103 positiven Proben wurden kontaktiert. 75 (73,5%) konnten erreicht werden, 74 der zum Zeitpunkt der Anfrage 16 Jahre alten Jugendlichen waren gesund, ein Jugendlicher leidet an Mukoviszidose. Keiner der kontaktierten Jugendlichen hat eine ALL entwickelt (s. a. Tabelle 2).

8. Voraussichtlicher Nutzen, Verwertbarkeit der Ergebnisse

Bisherige Untersuchungen weisen auf eine bimodale Ereigniskette bei der Entstehung der *ETV6-RUNX1*-positiven Leukämie im Kindesalter hin, bei der Translokations-tragende präleukämische Zellen spontan oder durch Umwelteinflüsse sekundäre Veränderungen erfahren, die zum Ausbruch der Leukämie führen. Die mittels der GIPFEL-Methode gewonnenen Daten aus der Untersuchung von 1000 Neugeborenen aus der dänischen Geburtenkohorte, sowie weiteren 1405 gesunden Neugeborenen aus NRW in Deutschland in der hier vorgestellten Studie, unterstützen diese Hypothese und weisen auf ein hohes Vorkommen von *ETV6-RUNX1*-positiven präleukämischen Klonen bei Kindern hin (≥ 5 bis 7,3%). Diese Frequenz liegt deutlich über der in den Krebsregistern belegten tatsächlichen Krebs-Inzidenz von ≈ 1 auf 100.000 (Quellen: Robert Koch Institut, Krebs in Deutschland, Ausgaben 7-9; ³⁷). Das Leukämie-induzierende Potential und die Penetranz des chimären Transkriptionsfaktors *ETV6-RUNX1* ist auf Basis dieser Daten als gering zu beurteilen

und schädigenden Umwelteinflüssen oder spontanen Ereignissen würde daher eine größere Bedeutung zukommen als bisher erwartet.

Die durchgeführte Studie und die erzielten Ergebnisse bilden daher die Grundlage um Risikofaktoren für die Entstehung von *ETV6-RUNX1*-positiven und anderen Leukämien zu identifizieren und in ihrer Auswirkung abzuschätzen. Um dieses Ziel zu erreichen, sollten weitere Geburtenkohorten prospektiv und retrospektiv unter Einbindung epidemiologischer, genetischer und klinischer Daten untersucht werden. Der Einfluss spezifischer Noxen oder protektiver Mechanismen könnte so evaluiert, in geeigneten Tiermodellen überprüft und moduliert werden, um Strategien zur Prävention von Leukämieerkrankungen bei Kindern zu entwickeln.

IV. Anhang

9. GIPFEL-Protokoll für Nabelschnurblutproben

In der hier berichteten Studie wurde auf eine Anreicherung der CD19⁺ B-Zellen aus Nabelschnurblutzellen verzichtet, da in früheren Studien von uns gezeigt werden konnte, dass sie die Sensitivität des Nachweises nicht erhöht oder positiv beeinflusst.²² Auf eine Amplifizierung der DNA mittels *Whole Genome Amplification* wurde ebenfalls verzichtet, da sie die Sensitivität der Methode beeinträchtigt.²² Nach der DNA-Isolierung folgte das Protokoll dem publizierten Standard-GIPFEL-Verfahren.⁶ Im Falle eines positiven Ergebnisses nach der ersten Real-Time PCR werden weitere Real-Time PCRs mit demultiplexten Primern, sowie eine Analyse mittels Gelelektrophorese und Sanger-Sequenzierung zur Bestätigung des positiven Ergebnisses durchgeführt.

9.1 DNA-Isolation

Für die Isolierung der genomischen DNA aus Nabelschnurblut (gesamte nukleäre Zellen nach Erythrozytenlyse) wurde das QIAamp Blood Mini Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) eingesetzt. 200 µl Zellsuspension pro Probe wurden für die genomische DNA-Extraktion eingesetzt. Das Zentrifugations-Protokoll des Herstellers für DNA-Aufreinigung aus Blut oder Körperflüssigkeiten wurde befolgt. Die Elution der DNA erfolgte in 82 µl des im Kit enthaltenen Puffers AE. Davon wurde 1 µl für die Überprüfung der erhaltenen DNA-Menge verwendet.

9.2 SacI –Restriktion

Die genomische DNA wurde einem Restriktionsverdau unterzogen. Dabei wurde SacI für die Translokation t(12;21) eingesetzt. Es wurden 10 µL 10X Puffer Cut Smart mit 80 µL DNA und 10 µL SACI HF versetzt. Die Reaktionsansätze wurden zwei Stunden

bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Restriktionsenzyme und Puffer wurden von New England Biolabs (NEB, Ipswich, MA) bezogen.

9.3 Aufreinigung des Restriktionsansatzes

Zur Durchführung der Folgereaktionen war es nötig, den Restriktionsansatz mit Hilfe des QIAquick® PCR Clean-up-Kits nach Angaben des Herstellers (Qiagen) aufzureinigen. Dazu wurden zunächst 500 µl des im Kit enthaltenen Puffers PB zu den SacI-Restriktionsfragmenten pipettiert. Um die Ausbeute an längeren DNA-Fragmenten zu verbessern, wurde die DNA im letzten Schritt in 50 µl auf 60°C vorgewärmtem, deionisiertem H₂O eluiert. Auch die verwendeten Säulen wurden vor dem Zentrifugationsschritt zur Elution der Probe 5 Minuten auf 60°C vorgewärmt.

9.4 Ligation

Zur anschließenden Ligation der Fragmente wurde der aufgereinigte Restriktionsansatz vollständig eingesetzt und mit 800 U der DNA-T4-Ligase (NEB) nach Herstellerangaben legiert. Dazu wurden 48 µL aufgereinigter Restriktionsansatz mit 10 µL Ligasepuffer, 40 µL deionisiertem Wasser und 2 µL (800 U) T4 DNA Ligase (400.000 U/mL) versetzt und zwei Stunden bei 20°C in einem Heizblock inkubiert.

9.5 Exonuclease-Verdau

Im Ligationsansatz verbliebene nicht legierte lineare Fragmente wurden durch Inkubation mit Exonuclease III hydrolysiert. Zu 100 µl des Ligationsansatzes wurden 100 U (1 µl) Exonuclease III (NEB) gegeben. Es folgte eine Inkubation für 30 Minuten bei 37°C. Anschließend wurden die Exonuclease III und die Ligase 5 Minuten bei 95°C inaktiviert. Die Inkubationen wurden im Wasserbad bzw. Heizblock durchgeführt.

9.6 DNA-Präzipitation

Die zirkularisierte DNA wurde durch anschließende Standard-Ethanol-Präzipitation gereinigt und konzentriert. Dazu wurde wie folgt vorgegangen:

Zu dem Ansatz nach Exonukleaseverdau wurde 1/10 Volumen (10 µl) 3 M Natriumacetat (pH 5,2) und 3 Volumen Ethanol (300 µl) pipettiert und der Ansatz durch Invertieren gemischt. Es wurde 45 Minuten bei -20°C inkubiert. Die Proben wurden 20 Minuten bei >20.000 x g und 4°C zentrifugiert, der Überstand verworfen. Es wurden 400 µl kalter 70%-iger Ethanol zugegeben, 20 min bei >20.000 x g und 4°C zentrifugiert, der Überstand verworfen. Das Pellet wurde anschließend in einer SpeedVac-Zentrifuge getrocknet und in 25,1 µl deionisiertem Wasser resuspendiert.

9.7 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. Für jede Probe wurden 5 PCR-Reaktionen angesetzt.

9.7.1 PCR I, Prä-Amplifikation

Die erste PCR wurde mit dem Mastermix aus dem GoTaq SYBR® Green qPCR-Master-Mix-Kit (Promega, Madison, WI) nach Herstellerangaben wie folgt angesetzt: 12,5 µL QPCR-Mastermix, je 2,5 µL des Vorwärts- und des Reverse-Primers (1 µM), 5 µL DNA aus der Präzipitation und 2,5 µL deionisiertes Wasser. Das PCR-Programm wurde wie folgt durchgeführt: Initiale Denaturierung für 12 Minuten und 30 Sekunden bei 95°C, gefolgt von 25 Zyklen bestehend aus 15 Sekunden bei 95°C, 30 Sekunden bei 64°C, und 30 Sekunden bei 72°C. Gelagert wurde die Probe bei 4°C.

Die Vorwärts-Primer-Mixe wurden wie folgt zusammengestellt: Mix Blau (RUNX1-S12F, RUNX1-S15F, RUNX1-S17F, RUNX1-S22F, RUNX1-S23F, RUNX1-S26F,

RUNX1-S28F), Mix Rot (RUNX1-S1F, RUNX1-S4F, RUNX1-S10F, RUNX1-S11F, RUNX1-S14F, RUNX1-S24F, RUNX1-S27F), Mix Grün (RUNX1-S2F, RUNX1-S6F, RUNX1-S7F, RUNX1-S8F, RUNX1-S18F, RUNX1-S20F, RUNX1-S29F), Mix Gelb (RUNX1-S3F, RUNX1-S5F, RUNX1-S13F, RUNX1-S16F, RUNX1-S19F, RUNX1-S21F) und Kontrolle (RUNX1-S0F). Als reverse Primer wurde ein Mix von 3 ETV6-Primern (ETV6-S1R, ETV6-S2R, ETV6-S3R) bzw. ein Kontrollprimer (RUNX1-S1R) eingesetzt. Die *ETV6-RUNX1*-Translokation wurde mit 25 Zyklen voramplifiziert. Aus dieser ersten PCR wurde jeweils 1 µl in die zweite PCR eingesetzt.

9.7.2 PCR II, Semi-nested Real-Time-PCR

Für die zweite PCR wurde der Reaktionsansatz wie folgt pipettiert: 5 µL QPCR-Mastermix, je 2 µL Vorwärts- und Reverse-Primer (1µM) und 1 µl Template aus PCR I. Als nested Primer wurden drei ETV6-Reverse-Primer eingesetzt (ETV6-S1R-N, ETV6-S2R-N, ETV6-S3R-N). Das PCR-Programm wurde wie folgt durchgeführt: 10 Minuten initialer Denaturierung bei 95°C, gefolgt von 40 Zyklen bestehend aus 15 Sekunden bei 95°C, 30 Sekunden bei 65°C, und 30 Sekunden bei 72°C. Abschließend wurde je 15 Sekunden bei 95°C, 55°C und 95°C inkubiert zur Erstellung des Schmelzprofils. Die Sequenzen der verwendeten Primer und die De-Multiplexing-Strategie wurden gegenüber dem ursprünglichen Protokoll⁶ nicht verändert.

10. Bruchpunktidentifizierung und Validierung

Die Sequenzierung erfolgte durch Amplifikation des Translokations-tragenden DNA-Zirkels und anschließender Sanger-Sequenzierung. Der DNA-Zirkel wurde mit Primern, die spezifisch für die *ETV6-RUNX1*-Region sind, unter Verwendung einer Ultra-Long-Range-Polymerase vermehrt (Abbildung 5). Der amplifizierte DNA-Zirkel wurde per Primerwalk sequenziert. Da für unterschiedliche Bruchpunkte verschiedene

Primer benutzt werden müssen, wurde eine probenspezifische Optimierung vor der Bestimmung des Bruchpunkts durchgeführt.

Die zirkularisierte DNA des GIPFEL-Prozesses wurde zunächst mit den in Tabelle 3 als „GIPFEL-Seq“ bezeichneten Primern amplifiziert. Dazu wurden 5 µl der DNA mit je 0,5 µl 10 µM Vorwärts (f)- und Rückwärts (r)-Primer vermischt. Dieser Ansatz wurde auf 100°C erhitzt und anschließend auf Raumtemperatur abgekühlt. Dann wurden 0,5 µl 10 mM dNTPs, 2 µl 10x Phi-29-Reaktionspuffer, 11 µl H₂O, 0,02 U Pyrophosphatase und 3 U Phi-29-DNA-Polymerase hinzugefügt (Reagenzien von Thermo Fisher). Der Ansatz wurde 24 h bei 30°C inkubiert. Anschließend wurden nicht inkorporierte dNTPs mit 10 U CIP-Dephosphatase (NEB) für 1 h bei 37°C dephosphoryliert. Die Dephosphatase wurde für 3 min bei 95°C deaktiviert und die DNA gefällt. Die amplifizierte DNA wurde mit denselben Primern in einer Sequenzier-PCR eingesetzt um den Bruchpunkt zu bestimmen. Für die GIPFEL-Probe Nr. 2117 reichte die Sequenzierungen nicht bis zum Bruchpunkt, daher wurde die Sequenzierung mit weiter innenliegenden Primern („GIPFEL-Seq 2“) von der *ETV6*-Seite her wiederholt bis der Bruchpunkt identifiziert wurde.

Ein zweites Nabelschnurblut-Aliquot derselben Person wurde zur Verifizierung der Bruchpunkte mittels nested-PCR genutzt. Die PCR-Bedingungen für beide PCRs waren dabei identisch. Es wurde 1 µl DNA (100 ng) bzw. für die nested-PCR 1 µl PCR-Produkt eingesetzt. Dazu je 1 µl 10 mM Vorwärts (f)- und Rückwärts (r)-Primer (Tabelle 3), 9,5 µl H₂O und 12,5 µl Phusion-HF-Master-Mix (Thermo). Das PCR-Programm für die erste und zweite PCR des nested-PCR-Nachweises wurde wie folgt durchgeführt: 30 Sekunden bei 98°C zur initialen Denaturierung, anschließend 30 Zyklen bestehend aus 10 Sekunden bei 98°C, 30 Sekunden bei 65°C und 60 Sekunden bei 72°C. Abschließend eine Synthesephase von 10 Minuten bei 72°C und

Lagerung bei 4°C. Anschließend wurden die Proben mit den nPCR-Primern sequenziert.

11. Tabellen

Tabelle 2: 103 von 1405 untersuchten Nabelschnurblutproben sind *ETV6-RUNX1*-positiv.

PROBEN- NUMMER	MULTIPLEX- PRIMER- GRUPPE	ETV6- PRIMER	ETV6- INTRON	RUNX1- PRIMER	RUNX1- INTRON	GESCHÄTZTE FREQUENZ	ALL?
1014	BLAU	3	5/6	15	1	9.6 x 10 ⁻⁵	GESUND
1023	BLAU	2	5	17	1	7.1 x 10 ⁻⁵	GESUND
1035	GELB	3	5/6	13	1	6.0 x 10 ⁻⁵	GESUND
1041	BLAU	1	5	15	1	2.7 x 10 ⁻⁵	K. A.
1041	ROT	2	5	11	1	7.4 x 10 ⁻⁵	K. A.
1055	GELB	1	5	13	1	5.8 x 10 ⁻⁴	GESUND
1076	BLAU	1	5	22	1	2.3 x 10 ⁻⁴	GESUND
1098	GELB	1	5	25	1	2.3 x 10 ⁻⁴	GESUND
1105	ROT	2	5	24	1	6.3 x 10 ⁻⁵	GESUND
1133	ROT	3	5/6	14	1	2.8 x 10 ⁻⁴	GESUND
1136	GELB	1	5	13	1	8.8 x 10 ⁻⁵	GESUND
1142	GELB	1	5	21	1	2.6 x 10 ⁻⁵	GESUND
1146	ROT	3	5/6	11	1	2.1 x 10 ⁻⁵	GESUND
1146	BLAU	3	5/6	22	1	6.6 x 10 ⁻⁵	GESUND
1157	GRÜN	2	5	20	1	2.2 x 10 ⁻⁴	GESUND
1176	ROT	3	5/6	4	1	7.7 x 10 ⁻⁴	GESUND
1185	BLAU	2	5	23	1	1.2 x 10 ⁻³	GESUND
1188	ROT	3	5/6	11	1	5.7 x 10 ⁻⁴	GESUND
1191	ROT	3	5/6	11	1	6.7 x 10 ⁻⁴	GESUND
1198	BLAU	3	5/6	23	1	2.8 x 10 ⁻⁴	K. A.
1234	ROT	3	5/6	4	1	2.6 x 10 ⁻⁴	K. A.
1238	GELB	3	5/6	25	1	4.6 x 10 ⁻³	GESUND*
1253	BLAU	1	5	17	1	1.5 x 10 ⁻³	GESUND
1270	ROT	2	5	11	1	2.3 x 10 ⁻⁴	K. A.
1281	GRÜN	2	5	20	1	6.1 x 10 ⁻⁴	GESUND
1284	GELB	1	5	25	1	7.5 x 10 ⁻⁵	K. A.
1293	ROT	2	5	14	1	2.4 x 10 ⁻⁴	GESUND
1301	BLAU	2	5	22	1	1.2 x 10 ⁻⁴	GESUND
1312	BLAU	3	5/6	17	1	1.0 x 10 ⁻⁴	GESUND
1336	ROT	3	5/6	14	1	7.1 x 10 ⁻⁵	GESUND
1341	ROT	3	5/6	14	1	7.1 x 10 ⁻⁵	GESUND
1355	GELB	1	5	25	1	5.6 x 10 ⁻⁵	GESUND
1369	ROT	3	5/6	11	1	3.7 x 10 ⁻⁴	GESUND
1402	GELB	1	5	25	1	4.8 x 10 ⁻⁴	GESUND
1429	GELB	1	5	13	1	1.4 x 10 ⁻⁴	GESUND
1430	ROT	2	5	11	1	1.6 x 10 ⁻⁴	GESUND

PROBEN- NUMMER	MULTIPLEX- PRIMER- GRUPPE	ETV6- PRIMER	ETV6- INTRON	RUNX1- PRIMER	RUNX1- INTRON	GESCHÄTZTE FREQUENZ	ALL?
1465	GELB	3	5/6	13	1	2.1 x 10 ⁻⁴	K. A.
1467	ROT	3	5/6	1	2	5.1 x 10 ⁻⁴	GESUND
1468	ROT	3	5/6	14	1	4.0 x 10 ⁻⁴	K. A.
1473	ROT	2	5	11	1	5.7 x 10 ⁻⁴	K. A.
1494	ROT	2	5	4	1	1.5 x 10 ⁻³	GESUND
1501	GELB	2	5	13	1	1.5 x 10 ⁻³	GESUND
1510	BLAU	3	5/6	17	1	2.1 x 10 ⁻³	GESUND
1518	BLAU	3	5/6	23	1	4.7 x 10 ⁻³	GESUND
1542	BLAU	2	5	12	1	9.3 x 10 ⁻³	K. A.
1553	GRÜN	1	5	29	1	7.6 x 10 ⁻³	GESUND
1559	ROT	1	5	10	1	7.7 x 10 ⁻³	GESUND
1609	GELB	2	5	25	1	5.4 x 10 ⁻⁴	GESUND
1617	ROT	3	5/6	14	1	8.6 x 10 ⁻⁴	K. A.
1618	BLAU	3	5/6	17	1	5.5 x 10 ⁻³	GESUND
1623	ROT	3	5/6	14	1	1.5 x 10 ⁻³	GESUND
1632	ROT	3	5/6	11	1	3.3 x 10 ⁻⁴	K. A.
1642	BLAU	3	5/6	22	1	1.5 x 10 ⁻³	GESUND
1646	ROT	3	5/6	14	1	9.0 x 10 ⁻⁴	GESUND
1678	ROT	2	5	4	1	2.8 x 10 ⁻³	GESUND
1680	ROT	2	5	4	1	4.6 x 10 ⁻³	GESUND
1692	BLAU	2	5	12	1	1.5 x 10 ⁻²	GESUND
1694	BLAU	3	5/6	17	1	2.4 x 10 ⁻²	GESUND
1695	BLAU	2	5	23	1	3.6 x 10 ⁻²	GESUND
1699	BLAU	3	5/6	17	1	6.8 x 10 ⁻³	K. A.
1735	ROT	3	5/6	14	1	4.2 x 10 ⁻⁴	GESUND
1743	GELB	2	5	25	1	1.4 x 10 ⁻⁴	GESUND
1744	GRÜN	2	5	18	1	4.8 x 10 ⁻⁴	GESUND
1744	GELB	3	5/6	25	1	7.0 x 10 ⁻⁵	GESUND
1745	ROT	3	5/6	11	1	1.2 x 10 ⁻⁴	GESUND
1746	ROT	2	5	24	1	3.1 x 10 ⁻³	K. A.
1748	GELB	1	5	21	1	7.5 x 10 ⁻⁴	GESUND
1752	ROT	2	5	14	1	2.6 x 10 ⁻⁴	GESUND
1757	GELB	2	5	25	1	6.5 x 10 ⁻⁴	K. A.
1780	BLAU	2	5	23	1	2.3 x 10 ⁻³	GESUND
1828	BLAU	2	5	23	1	5.5 x 10 ⁻³	K. A.
1838	GRÜN	3	5/6	18	1	4.5 x 10 ⁻⁴	GESUND
1842	BLAU	3	5/6	17	1	3.1 x 10 ⁻³	GESUND
1897	ROT	3	5/6	14	1	3.6 x 10 ⁻³	K. A.
1910	BLAU	3	5/6	23	1	1.3 x 10 ⁻³	GESUND
1912	ROT	3	5/6	24	1	1.4 x 10 ⁻³	GESUND
1929	GELB	3	5/6	25	1	1.6 x 10 ⁻³	K. A.
1963	BLAU	3	5/6	15	1	5.9 x 10 ⁻⁴	GESUND
1993	GELB	2	5	13	1	6.2 x 10 ⁻⁴	GESUND
2039	GELB	3	5/6	5	1	3.9 x 10 ⁻⁴	K. A.

PROBEN- NUMMER	MULTIPLEX- PRIMER- GRUPPE	ETV6- PRIMER	ETV6- INTRON	RUNX1- PRIMER	RUNX1- INTRON	GESCHÄTZTE FREQUENZ	ALL?
2047	BLAU	3	5/6	17	1	2.8 x 10 ⁻³	K. A.
2074	BLAU	3	5/6	17	1	4.5 x 10 ⁻³	GESUND
2090	BLAU	2	5	23	1	4.4 x 10 ⁻³	GESUND
2091	BLAU	2	5	17	1	7.2 x 10 ⁻³	K. A.
2104	ROT	3	5/6	24	1	1.8 x 10 ⁻³	GESUND
2117	ROT	2	5	11	1	3.7 x 10 ⁻³	GESUND
2154	BLAU	2	5	26	1	1.7 x 10 ⁻³	K. A.
2156	ROT	2	5	24	1	2.9 x 10 ⁻⁴	GESUND
2167	ROT	3	5/6	24	1	1.4 x 10 ⁻³	GESUND
2169	ROT	3	5/6	11	1	3.1 x 10 ⁻³	GESUND
2171	BLAU	2	5	22	1	9.8 x 10 ⁻²	K. A.
2174	ROT	3	5/6	4	1	4.4 x 10 ⁻³	GESUND
2178	ROT	1	5	4	1	2.4 x 10 ⁻⁴	GESUND
2218	BLAU	3	5/6	26	1	2.2 x 10 ⁻⁴	GESUND
2236	BLAU	3	5/6	12	1	8.3 x 10 ⁻³	K. A.
2247	ROT	3	5/6	11	1	9.9 x 10 ⁻³	GESUND
2274	BLAU	2	5	23	1	2.1 x 10 ⁻³	GESUND
2291	GELB	3	5/6	25	1	2.8 x 10 ⁻³	GESUND
2300	GELB	3	5/6	25	1	3.8 x 10 ⁻³	GESUND
2316	BLAU	2	5	23	1	2.1 x 10 ⁻³	K. A.
2322	GELB	3	5/6	25	1	6.9 x 10 ⁻⁴	GESUND
2322	BLAU	1	5	23	1	3.5 x 10 ⁻³	GESUND
2346	BLAU	3	5/6	22	1	3.3 x 10 ⁻³	GESUND
2379	BLAU	3	5/6	28	1	6.1 x 10 ⁻³	K. A.
2402	BLAU	3	5/6	17	1	9.0 x 10 ⁻⁴	K. A.
2406	GRÜN	3	5/6	8	1	1.8 x 10 ⁻³	K. A.
2407	BLAU	3	5/6	17	1	3.5 x 10 ⁻³	K. A.

103 von 1405 analysierten, in Deutschland (NRW) geborenen Kindern wiesen *ETV6-RUNX1*-Translokationen im Nabelschnurblut auf. Angegeben ist die Probennummer der positiv getesteten Proben gesunder Neugeborener (angefangen bei Nr. 1013; Nr. 1-1012 Screen der Dänischen Kohorte²²), die verwendeten Multiplex-Primergruppen der ersten Real-Time PCR, die in den folgenden PCRs identifizierte spezifischen Primer für das die Translokation tragende DNA-Fragment, die jeweiligen Introns der Gene *ETV6* bzw. *RUNX1*, in denen die Bruchpunkte liegen, die ermittelte Frequenz der präleukämischen Zellen in der Probe, sowie der Gesundheitszustandes des Kindes seit Probennahme bis zum Alter von 16 Jahren. Bei vier Neugeborenen (Proben-Nr. 1041, 1146, 1744, 2322, in Fettdruck hervorgehoben) wurden jeweils zwei co-existierende, unterschiedliche *ETV6-RUNX1*-Translokationen in einer Probe detektiert. (Gesund, keine ALL; k.A. es wurden keine Angaben gemacht; Gesund*, Kind erkrankt an Mukoviszidose, aber nicht an ALL.)

Tabelle 3: Sequenzen der Primer für die Bruchpunktbestimmung auf DNA-Ebene mit Nukleotidauflösung mittels PCR.

PROBENNR.	EXPERIMENT	PRIMER
1055	GIPFEL-SEQ	F_GAAGACCTGGCTTACATGAACCACATC
		R_CACTTGCATCCCCTAGGTCCTCC
	PCR 1	F_GAGGAAAACAGGATTATGGTATTGGAGGC
		R_CCGCCACAGTCTGAAGGGACTTC
	PCR 2 (NESTED)	F_CATTTGGACAGAGGAAACCACTCCCAG
		R_TGAGGTCCTTATAGAAGCGCTTCTGG
1076	GIPFEL-SEQ	F_GAAGACCTGGCTTACATGAACCACATC
		R_CTACCCCACTAGCTTCTTTCTTGAC
	PCR 1	F_GTGATCTTTGCAGCCAGCCTCGC
		R_TTGGCCCACGGACTTCAGTTTGCTG
	PCR 2 (NESTED)	F_AATTAGGCGCCCTCCAAGGCTCTC
		R_TCTTGCGATGACTGAACAACGTGAACG
1369	GIPFEL-SEQ	F_CTCCAAGCAGGTGCATAATGTCCC
		R_TCCAACATCCTAAGAGTCAAGTGCCTG
	PCR 1	F_AGGCCTGTGTGGGGTGCCCTTC
		R_GGCTTTATTCTCTCTTAACCTTAGATACATTCTC
	PCR 2 (NESTED)	F_CCTCCCTGAAGCTTTCCTGCTG
		R_GTCTAATATCTTGCTCAGGGTCTAATGCAG
1501	GIPFEL-SEQ	F_AGCCTACTTTACTTCTGCCTTGAGGTAC
		R_CACTTGCATCCCCTAGGTCCTCC
	PCR 1	F_CTCTCGTCTTGTCTTGCATGGTGTG
		R_CCCAACAGCTACACTGCCTGGAG
	PCR 2 (NESTED)	F_CTGCAGTATTCATCTTATGTGGAAGGGTC
		R_TTTTCACTAAACAACCAGTATCAGTAGAGCAAG
2117	GIPFEL-SEQ 1	F_AGCCTACTTTACTTCTGCCTTGAGGTAC
		R_TCCAACATCCTAAGAGTCAAGTGCCTG
	GIPFEL-SEQ 2	F_CACAGAGGAACTGAGCCCCAGAG
		R_ACTGAATCATCCCTAAAGTTCCTTCCAG
	PCR 1	F_GTCCTAAAATAATTACCAGTGCTATAATGGC
		R_GGGATAATGTCTCTGAAATCATGCCTATAAG
	PCR 2 (NESTED)	F_CTGAATCATCCCTAAAGTTCCTTCCAGC
		R_GCTCAATGTGGGGTTCTGGGCTC

Für fünf der *ETV6-RUNX1*-positiven Nabelschnurblutproben (Nr. 1055, 1076, 1369, 1501 und 2117) wurde der exakte Bruchpunkt in der DNA-Sequenz mittels Sanger-Sequenzierung der in der Gipfel-

Prozedur erzeugten zirkulären DNA identifiziert. Dieses Experiment wurde hier als „Gipfel-Seq“ bezeichnet und die dafür verwendeten Primer angegeben. Mit Hilfe der identifizierten Bruchpunkte konnten Primer konzipiert werden, die ein Fragment amplifizieren, dass über den tatsächlichen Bruchpunkt von *ETV6-RUNX1* geht. Diese wurden in PCR 1 zum Nachweis der *ETV6-RUNX1*-Fusion an einem 2. Aliquot derselben Nabelschnurblutprobe eingesetzt. Eine zweite, nested PCR (PCR 2) wurde zur weiteren Amplifizierung eingesetzt, um die Spezifität zu erhöhen. Die Sanger-Sequenzierung dieser PCR-Produkte bestätigte das Vorliegen der *ETV6-RUNX1*-Translokationen in einem zweiten Aliquot in allen fünf Fällen.

12. 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(4):721-726.
2. Ahlbom A, Day N, Feychting M, et al. A pooled analysis of magnetic fields and childhood leukaemia. *Br J Cancer*. 2000;83(5):692-698.
3. Greenland S, Sheppard AR, Kaune WT, Poole C, Kelsh MA. A pooled analysis of magnetic fields, wire codes, and childhood leukemia. Childhood Leukemia-EMF Study Group. *Epidemiology*. 2000;11(6):624-634.
4. Pedersen C, Johansen C, Schuz J, Olsen JH, Raaschou-Nielsen O. Residential exposure to extremely low-frequency magnetic fields and risk of childhood leukaemia, CNS tumour and lymphoma in Denmark. *Br J Cancer*. 2015;113(9):1370-1374.
5. Ziegelberger G, Baum C, Borkhardt A, et al. Research recommendations toward a better understanding of the causes of childhood leukemia. *Blood Cancer Journal* 2011;1(e1).
6. Fueller E, Schaefer D, Fischer U, et al. Genomic inverse PCR for exploration of ligated breakpoints (GIPFEL), a new method to detect translocations in leukemia. *PLoS One*. 2014;9(8):e104419.
7. Ford AM, Bennett CA, Price CM, Bruin MC, Van Wering ER, Greaves M. Fetal origins of the TEL-AML1 fusion gene in identical twins with leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(8):4584-4588.
8. Wiemels JL, Ford AM, Van Wering ER, Postma A, Greaves M. Protracted and variable latency of acute lymphoblastic leukemia after TEL-AML1 gene fusion in utero. *Blood*. 1999;94(3):1057-1062.
9. McHale CM, Wiemels JL, Zhang L, et al. Prenatal origin of TEL-AML1-positive acute lymphoblastic leukemia in children born in California. *Genes Chromosomes Cancer*. 2003;37(1):36-43.
10. Eguchi-Ishimae M, Eguchi M, Ishii E, et al. Breakage and fusion of the TEL (*ETV6*) gene in immature B lymphocytes induced by apoptogenic signals. *Blood*. 2001;97(3):737-743.
11. Mori H, Colman SM, Xiao Z, et al. Chromosome translocations and covert leukemic clones are generated during normal fetal development. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(12):8242-8247.

12. 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(2):161-162.
13. Lausten-Thomsen U, Madsen HO, Vestergaard TR, Hjalgrim H, Lando A, Schmiegelow K. Increased risk of ALL among premature infants is not explained by increased prevalence of pre-leukemic cell clones. *Blood Cells Mol Dis*. 2010;44(3):188-190.
14. 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(1):186-189.
15. 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(4):301-303.
16. 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(11):734-740.
17. Zuna J, Madzo J, Krejci O, et al. ETV6/RUNX1 (TEL/AML1) is a frequent prenatal first hit in childhood leukemia. *Blood*. 117(1):368-369; author reply 370-361.
18. Skorvaga M, Nikitina E, Kubes M, et al. Incidence of common preleukemic gene fusions in umbilical cord blood in Slovak population. *PLoS One*. 2014;9(3):e91116.
19. 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. *Pediatric blood & cancer*. 2014;61(9):1704-1706.
20. Ornelles DA, Gooding LR, Garnett-Benson C. Neonatal infection with species C adenoviruses confirmed in viable cord blood lymphocytes. *PLoS One*. 2015;10(3):e0119256.
21. Kosik P, Skorvaga M, Durdik M, et al. Low numbers of pre-leukemic fusion genes are frequently present in umbilical cord blood without affecting DNA damage response. *Oncotarget*. 2017;8(22):35824-35834.
22. Schafer D, Olsen M, Lahnemann D, et al. Five percent of healthy newborns have an ETV6-RUNX1 fusion as revealed by DNA-based GIPFEL screening. *Blood*. 2018;131(7):821-826.
23. Jimenez-Morales S, Miranda-Peralta E, Saldana-Alvarez Y, et al. BCR-ABL, ETV6-RUNX1 and E2A-PBX1: prevalence of the most common acute lymphoblastic leukemia fusion genes in Mexican patients. *Leuk Res*. 2008;32(10):1518-1522.
24. Bekker-Mendez VC, Miranda-Peralta E, Nunez-Enriquez JC, et al. Prevalence of gene rearrangements in Mexican children with acute lymphoblastic leukemia: a population study-report from the Mexican Interinstitutional Group for the identification of the causes of childhood leukemia. *Biomed Res Int*. 2014;2014(210560).
25. Svendsen AL, Feychting M, Klæboe L, Langmark F, Schuz J. Time trends in the incidence of acute lymphoblastic leukemia among children 1976-2002: a population-based Nordic study. *J Pediatr*. 2007;151(5):548-550.
26. Thandla SP, Ploski JE, Raza-Egilmez SZ, et al. ETV6-AML1 translocation breakpoints cluster near a purine/pyrimidine repeat region in the ETV6 gene. *Blood*. 1999;93(1):293-299.

27. Romana S, Poirel H, Della Valle V, et al. Molecular analysis of chromosomal breakpoints in three examples of chromosomal translocation involving the TEL gene. *Leukemia*. 1999;13(11):1754-1759.
28. Ma X, Buffler PA, Selvin S, et al. Daycare attendance and risk of childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Cancer*. 2002;86(9):1419-1424.
29. Wiemels JL, Alexander FE, Cazzaniga G, Biondi A, Mayer SP, Greaves M. Microclustering of TEL-AML1 translocation breakpoints in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Genes, chromosomes & cancer*. 2000;29(3):219-228.
30. Maia AT, Ford AM, Jalali GR, et al. Molecular tracking of leukemogenesis in a triplet pregnancy. *Blood*. 2001;98(2):478-482.
31. Andersen MT, Nordentoft I, Hjalgrim LL, et al. Characterization of t(12;21) breakpoint junctions in acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 2001;15(5):858-859.
32. Pine SR, Wiemels JL, Jayabose S, Sandoval C. TEL-AML1 fusion precedes differentiation to pre-B cells in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia research*. 2003;27(2):155-164.
33. von Goessel H, Jacobs U, Semper S, et al. Cluster analysis of genomic ETV6-RUNX1 (TEL-AML1) fusion sites in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia research*. 2009;33(8):1082-1088.
34. Papaemmanuil E, Rapado I, Li Y, et al. RAG-mediated recombination is the predominant driver of oncogenic rearrangement in ETV6-RUNX1 acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet*. 2014;46(2):116-125.
35. Jin Y, Wang X, Hu S, Tang J, Li B, Chai Y. Determination of ETV6-RUNX1 genomic breakpoint by next-generation sequencing. *Cancer medicine*. 2016;5(2):337-351.
36. Rodriguez-Hernandez G, Hauer J, Martin-Lorenzo A, et al. Infection Exposure Promotes ETV6-RUNX1 Precursor B-cell Leukemia via Impaired H3K4 Demethylases. *Cancer Res*. 2017;77(16):4365-4377.
37. Bhojwani D, Yang JJ, Pui CH. Biology of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Clin North Am*. 2015;62(1):47-60.