



Bundesamt
für Strahlenschutz

Ressortforschungsberichte zum Strahlenschutz

Einfluss von Niedrigdosisstrahlung auf die Leukämieentwicklung bei genetischer Prädisposition in einem Mausmodell

Vorhaben 3618S32274

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

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-213/23

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

urn:nbn:de:0221-2023071238457

Salzgitter, Juli 2023

Inhaltsverzeichnis

I. Zusammenfassung.....	3
1. Zusammenfassung	3
2. Summary.....	4
II. Kurze Darstellung	5
3. Aufgabenstellung	5
4. Voraussetzungen, unter denen das FE-Vorhaben durchgeführt wurde	6
5. Planung und Ablauf des Vorhabens.....	9
6. Stand der Wissenschaft und Technik.....	13
III. Eingehende Darstellung.....	18
7. Erzielte Ergebnisse.....	18
8. Voraussichtlicher Nutzen, Verwertbarkeit der Ergebnisse	28
IV. Anhang.....	29
9. Literatur.....	29

I. Zusammenfassung

1. Zusammenfassung

Ionisierende Strahlung ist ein akzeptierter Risikofaktor für die Leukämie-Entstehung im Kindesalter. Allerdings ist die Bedeutung schwacher ionisierender Strahlung im Niedrigdosisbereich noch unklar. Ziel des Forschungsvorhabens war es, experimentell im *Sca1-ETV6-RUNX1*-Mausmodell, dass die häufigste bei Kinder anzutreffende präleukämische Gentranslokation t(12;21), die für den chimären Transkriptionsfaktor *ETV6-RUNX1* codiert, trägt, zu prüfen, ob die Exposition mit Niedrigdosisstrahlung onkogene Mutationen (als sogenannten zweiten "Hit") verursachen kann. Vorläufer-B-Zell akute lymphatische Leukämien (pB-ALL) entstanden bei *Sca1-ETV6-RUNX1*-Mäusen, die im Alter von vier Wochen einmalig mit einer exakten Dosis von mindestens 0,5 Gy aus einer Gammastrahlenquelle (Cs-137) bestrahlt wurden (0,5 Gy, n=3/30; 2 Gy, n=4/30). Expositionsbedingte somatische Mutationen in diesen pB-ALL betrafen (1) Hot-Spot-Regionen in bekannten Krebsgenen (*Jak1, Jak3, Ptpn11, Kras*), (2) Gene, die auch in humaner *ETV6-RUNX1*-positiver pB-ALL mutiert waren (*Atm, Sh2b3, Ptpn11, Kras*), (3) ALL-Prädispositionsgene (*Sh2B3, Ptpn11*), und (4) andere bekannte Krebsgene. Aufgrund der geringen Zahl an Tumoren und somatischen SNV konnte keine spezifische strahleninduzierte Mutationssignatur identifiziert werden. Größere Kohorten oder Mausmodelle mit einer höheren Tumorentstehung könnten zukünftig zusammen mit Ganz-Genom-Sequenzierung und ergänzenden Omics-Analysen größere Datensätze generieren und ein umfassendes Bild von spezifischen t(12;21)-assoziierten sekundären, genomischen Veränderungen als Folge von Bestrahlung liefern.

2. Summary

Ionizing radiation is an accepted risk factor for childhood leukemia development. However, the significance of weak ionizing radiation in the low dose range is still unclear. The aim of this research project was to experimentally test whether exposure to low-dose radiation can cause oncogenic mutations (as a so-called second "hit") in the *Sca1-ETV6-RUNX1* mouse model, which carries the most common preleukemic translocation t(12;21) coding for the chimeric transcription factor *ETV6-RUNX1* found in children. Precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia (pB-ALL) developed in *Sca1-ETV6-RUNX1* mice irradiated once at four weeks of age with an exact dose of at least 0.5 Gy from a gamma radiation source (Cs-137) (0.5 Gy, n=3/30; 2 Gy, n=4/30). Exposure-related somatic mutations in these pB-ALL involved (1) hot-spot regions in known cancer genes (*Jak1*, *Jak3*, *Ptpn11*, *Kras*), (2) genes that were also mutated in human *ETV6-RUNX1*-positive pB-ALL (*Atm*, *Sh2b3*, *Ptpn11*, *Kras*), (3) pB-ALL predisposition genes (*Sh2B3*, *Ptpn11*), and (4) other known cancer genes. Due to the small number of tumors and somatic SNV, no specific radiation-induced mutation signature could be identified. Larger cohorts or mouse models with higher tumorigenicity, together with whole-genome sequencing and complementary omics analyses, could generate larger data sets in the future and provide a comprehensive picture of specific t(12;21)-associated secondary genomic alterations resulting from radiation.

II. Kurze Darstellung

3. Aufgabenstellung

Ionisierende Strahlung ist ein akzeptierter Risikofaktor für die Leukämie-Entstehung im Kindesalter. Allerdings ist die Bedeutung schwacher ionisierender Strahlung im Niedrigdosisbereich noch unklar. Das Deutsche Kinderkrebsregister in Mainz führte im Auftrag des Bundesamtes für Strahlenschutz von 2003 bis 2007 die Studie "Kinderkrebs in der Umgebung von Kernkraftwerken" (KiKK-Studie) durch und konnte eine Korrelation zwischen der Nähe des Wohnortes zu einem Atomkraftwerk und dem Risiko eine Leukämie zu entwickeln aufzeigen. Dies lässt sich jedoch mit dem derzeitigen wissenschaftlichen Kenntnisstand über Strahlenwirkungen nicht erklären. Ziel des Forschungsvorhabens war es, experimentell im Mausmodell zu prüfen, ob genetische Faktoren die Empfindlichkeit für den schädlichen Einfluss ionisierender Strahlung beeinflussen.

In einem ersten Bearbeitungsschritt sollte der vorliegende Stand von Wissenschaft und Technik für die Zwecke des Vorhabens aufgearbeitet, die relevanten bisherigen Arbeiten zusammengefasst und maßgebliche Unterlagen und Veröffentlichungen identifiziert werden.

Desweiteren sollte das *Sca1-ETV6-RUNX1*-Mausmodell, das die häufigste bei Kindern anzutreffende präleukämische Gentranslokation *ETV6-RUNX1* trägt, eingesetzt werden, um zu testen, ob die Exposition mit Niedrigdosisstrahlung onkogene Mutationen (als sogenannten zweiten "Hit") verursachen kann. Die Leukämieentwicklung nach Bestrahlung sollte beobachtet und die sich entwickelnden Leukämien phänotypisch charakterisiert werden.

In einem weiteren Schritt sollten die genetischen Veränderungen in den auftretenden, strahlungsinduzierten Leukämien der Mäuse erfasst, verglichen und auf

strahlungsbedingte Mutationsmuster hin untersucht werden. Die Ergebnisse sollten mit publizierten, sekundären Alterationen der murinen und der humanen *ETV6-RUNX1*-positiven-pB-ALL verglichen werden, um ein umfassendes Bild von spezifischen, *ETV6-RUNX1*-assoziierten, sekundären genomischen Veränderungen als Folge von niedrig dosierter Bestrahlung zu liefern.

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) besaßen bereits durch Veröffentlichungen in internationalen Fachzeitschriften nachgewiesene klinische und experimentelle Expertise in pädiatrischer Onkologie, insbesondere im Bereich der *ETV6-RUNX1*-positiven Leukämie bei Kindern sowie die technische Expertise, das Personal und die Laborausstattung zur Durchführung der nötigen genetischen Untersuchungen. In Vorarbeiten zur Erforschung der Leukämieentstehung hatte der Kollaborationspartner (Isidro Sanchez-Garcia, Spanish National Research Council (CSIC), Salamanca) mit der *Sca1-ETV6-RUNX1*-Mauslinie¹ ein Modell mit einer genetischen Prädisposition erzeugt, dass der *ETV6-RUNX1*-positiven prä-B-Zell akuten lymphoblastischen Leukämie (ALL) entspricht (Abbildung 1). Die Expertise des Kollaborationspartners war durch Veröffentlichungen belegt.¹⁻³

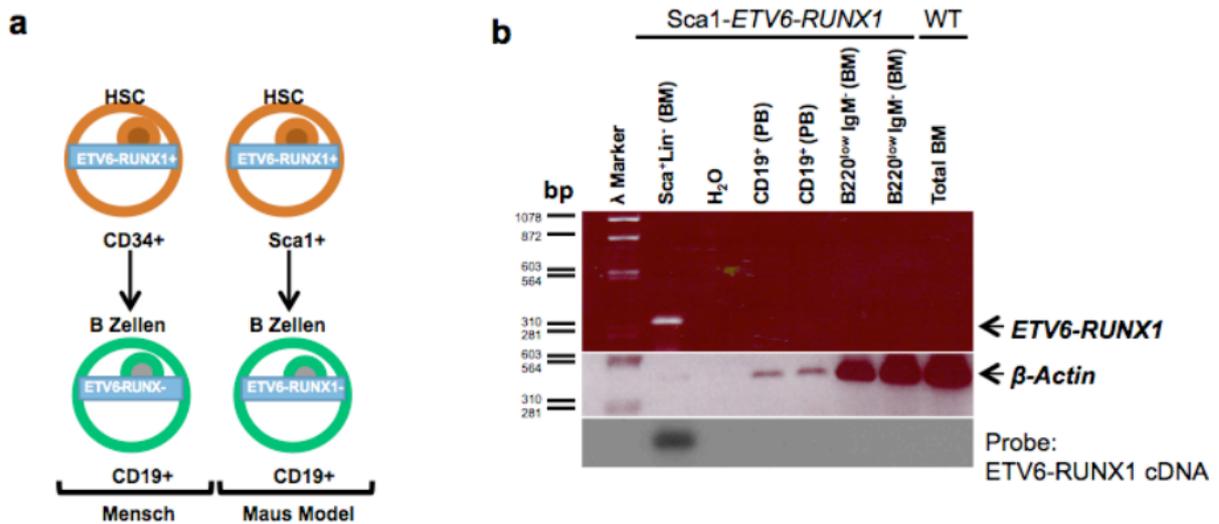


Abbildung 1: Das *Sca1-ETV6-RUNX1*-Mausmodell.

A) Das *Sca1-ETV6-RUNX1*-Mausmodell entspricht der Situation im Menschen. Wie beim präleukämischen Zustand bei Kindern, wird das Fusionsgen *ETV6-RUNX1* in der Maus in hämatopoietischen Stammzellen (HSC) exprimiert, nicht in terminal differenzierten B Zellen. **B)** Nachweis der *ETV6-RUNX1*-Expression in *Sca1-ETV6-RUNX1*-Mäusen. Hämatopoietische Stammzellen (HSC, *Sca1⁺ Lin⁻*), Pro-B- und Prä-B-Zellen der Knochenmarksnische (BM), sowie differenzierte CD19⁺ B-Zellen des peripheren Blutes von *Sca1-ETV6-RUNX1*-Mäusen und Gesamt-Knochenmark von Wildtyp-Mäusen wurden auf *ETV6-RUNX1*-Expression mittels RT-PCR getestet. *ETV6-RUNX1* wird nur in HSC des Knochenmarks von *Sca1-ETV6-RUNX1*-Mäusen exprimiert. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment von zwei biologischen Replikaten.

Zur Untersuchung des Einflusses von Niedrigdosisstrahlung auf die Leukämieentwicklung bei genetisch prädisponierten Mäusen sollten junge *Sca1-ETV6-RUNX1* Mäuse zu einem Zeitpunkt einmalig exponiert werden, der dem Alter von Kindern mit dem höchsten Leukämierisiko (2-5 Jahre) entspricht (Abbildung 2). Das ist vier Wochen nach Geburt der Mäuse der Fall.

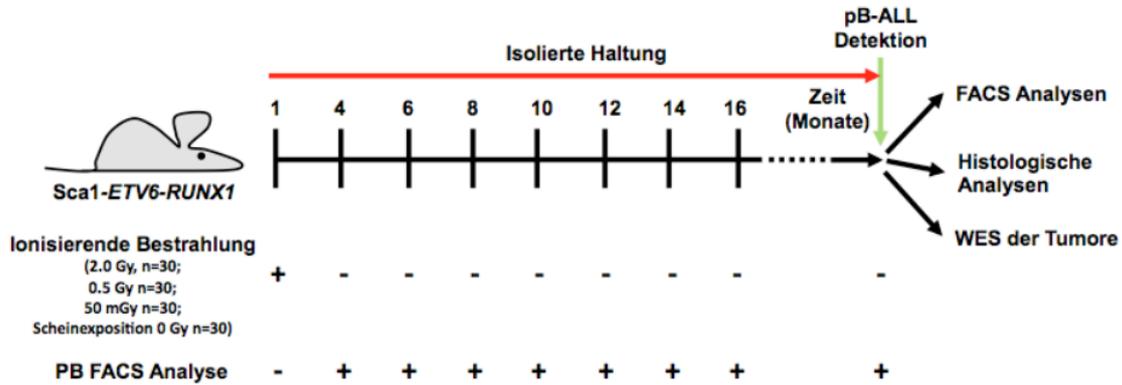


Abbildung 2: Darstellung des *in vivo* Studiendesigns.

Sca1-ETV6-RUNX1-Mäuse sollten im Alter von 4 Wochen (entspricht dem Alter von 2-5-jährigen Kindern) einmalig mit einer einzelnen Dosis ionisierender Strahlung (2 Gy, 0.5 Gy bzw. 50 mGy) behandelt bzw. einer Scheinbestrahlung (0 Gy) ausgesetzt werden. Es sollte dazu eine in der Tierversuchsanstalt vorhandene geschlossene Cs-137-Gamma-Strahlungsquelle (Gammacell 1000 Elite Bestrahlungsgerät) verwendet werden, die eine exakte Dosierung der Strahlungsmenge erlaubt (62 Sekunden entsprechen 1 Gy) und monatlich kalibriert wird. Nach der Exposition sollten die Mäuse isoliert gehalten werden. 30 Tiere sollten je Strahlendosis eingesetzt werden. Die Tiere sollten täglich kontrolliert und im Abstand von 2 Monaten die Leukämieentwicklung in den Tieren mittels durchflußzytometrischer Untersuchung (*fluorescence activated cell sorting*, FACS) des peripheren Blutes (PB) aus der Schwanzvene geprüft werden. Bei Auftreten einer Leukämie sollten die Tiere phänotypisch und genetisch durch Ganz-Exom-Sequenzierung (*whole exome sequencing*, WES) der Tumore und der normalen Kontrolle untersucht werden.

Das Tierhaus des Kollaborationspartners in Salamanca besitzt ein Bestrahlungsgerät (Gammacell 1000 Elite) für Versuchstiere, das mit einer geschlossenen Cs-137-Strahlungsquelle mit einer nominalen Aktivität von 12,8 TBq ausgestattet ist. Die Dosisrate der Strahlenquelle ist ausreichend, um eine exakte Dosis zu erhalten. Eine Exposition von 62 Sekunden entspricht dabei 1 Gy. Die zuverlässige Funktion des Systems ist gewährleistet durch regelmäßige Inspektionen gemäß der nationalen spanischen Behörde "Consejo de Seguridad Nuclear", die sich streng an das europäische Recht hält (<https://www.csn.es/csn>).

Die Strahlenquelle wird monatlich mittels radiosensitiver Teststreifen getestet und kalibriert. Jährlich findet eine Dichtheitsprüfung für verschlossene Radiaktivitätsquellen statt (letzter Test Januar 2018, nächster Test Januar 2019).

Die Leukämie-Entwicklung sollte bei den exponierten und den Kontroll-Tieren täglich klinisch kontrolliert und regelmäßig mittels durchflußzytometrischer Analyse des peripheren Bluts bis zur Leukämieentstehung bzw. bis zu einem Alter von maximal zwei Jahren kontrolliert. Alle dafür nötigen Laboreinrichtungen waren bereits zu Projektbeginn beim Auftragnehmer und seinem Kooperationspartner vorhanden. Bei Anzeichen einer Leukämie sollten die *Sca1-ETV6-RUNX1*-Mäuse geopfert und den üblichen Nekropsieverfahren unterzogen. Der Kollaborationspartner besaß bereits ausgewiesene Expertise in diesen Verfahren, so dass detaillierte phänotypische Analysen durchgeführt werden konnten. Genotypische Untersuchungen der Mäuse konnten vom Auftragnehmer, der bereits eine eigene Laboreinheit zur Sequenzierung der nächsten Generation (NextSeq550, Illumina) und geschultes Personal zur Generierung und Auswertung der Daten besaß, durchgeführt werden. Eine Genehmigung der Tierversuche nach dem spanischen Tierschutzgesetz lag zu Beginn des Vorhabens bereits vor.

5. Planung und Ablauf des Vorhabens

Zunächst wurden Online-Literaturrecherchen (Pubmed-Datenbank) zum aktuellen Stand der Wissenschaft durchgeführt. Wissenschaftliche Veröffentlichungen zur Frage der Effekte einer Niedrigdosisbestrahlung auf den Menschen sowie beobachtete Effekte in Tiermodellen wurden recherchiert und analysiert. Der aktuelle Wissensstand zu sekundären genetischen Alterationen in kindlichen Leukämien

wurde aufgearbeitet und die für das Projekt gewählte experimentelle Vorgehensweise geprüft und in einem Bericht zusammengefasst.

Dann wurden Kohorten von genetisch prädisponierten *Sca1-ETV6-RUNX1*-Mäusen (jeweils n=30 pro Behandlung) im Alter von vier Wochen (entspricht dem Alter eines Kindes von etwa 2-5 Jahren) einmalig mit exakten Dosen aus einer geschlossenen, kalibrierten Gammastrahlenquelle (Cs-137, Gammacell 1000 Elite, nominale Aktivität 12,8 TBq) bis in den Niedrigdosisbereich (2 Gy, 0,5 Gy, 50 mGy) bestrahlt bzw. zur Kontrolle scheinbestrahlt (0 Gy). Die Tiere wurden bis zu einem Alter von zwei Jahren täglich klinisch und regelmäßig durch Blutkontrollen auf das Vorliegen von Leukämien untersucht. Tiere, die Merkmale einer Leukämie aufwiesen, wurden geopfert und den üblichen Nekropsieverfahren unterzogen. Makroskopisch, histologisch, durchflusszytometrisch und molekularbiologisch wurden Gewebeinfiltration, Tumor-Zellzahl und Tumor-Klonalität in hämatopoetischen Organen untersucht. Makroskopisch wurden die Größe der Milz, Tumorerfiltrationen und die Zellzahlen in hämatopoetischen Organen untersucht. Milz und Knochenmark wurden nach Hämatoxylin-Eosin-Färbung auch histologisch untersucht. Blutzellen aus den hämatopoetischen Organen wurden durchflusszytometrisch untersucht. Dazu wurden die kernhaltigen Zellen aus dem Knochenmark, dem peripheren Blut, dem Thymus, der Milz und den Lymphknoten gewonnen. Kontaminierende Erythrozyten wurden lysiert, die restlichen Zellen mit spezifischen Antikörpern und Propidiumiodid (zum Ausschluss toter Zellen) gefärbt und mit Hilfe eines AccuriC6 Durchflusszytometers (BD Biosciences) gemessen und mit FlowJo-Software (LLC) analysiert. Für jede Analyse wurden insgesamt mindestens 50.000 vitale (PI-negative) Zellen bewertet. Dabei wurden die B-Zell-Entwicklungsstadien wie folgt definiert: Pro-B-Zellen (CD19⁺, c-Kit⁺), Prä-B-Zellen (B220⁺, CD25⁺, IgM⁻), unreife B-Zellen (B220⁺, IgM^{High}, IgD⁻),

rezirkulierende B-Zellen (B220⁺, IgD^{High}), periphere Übergangs-B-Zellen (B220⁺, IgM^{High}, IgD^{High}), periphere reife B-Zellen (B220⁺, IgM^{Low}, IgD^{High}), Randzonen-B-Zellen (B220⁺, CD21^{High}, CD23^{Low}), folliculäre B-Zellen (B220⁺, CD21^{Intermediate}, CD23^{High}). Zur molekularbiologischen Analyse der Klonalität der Tumorzellen wurde genomische DNA aus Tumorzellen sowie aus CD19⁺-sortierten Wildtyp-Splenozyten als positiver Kontrolle isoliert. Immunglobulin-Rearrangements wurden dann mit Hilfe einer PCR mit spezifischen Primern und anschließender Gelelektrophorese analysiert. Für die Herstellung der Maus-Exom-Bibliotheken und die Sequenzierung der nächsten Generation wurde zunächst die DNA aus den Leukämie- und Kontrollproben mittels des AllPrep DNA/RNA Mini Kits (Qiagen) gemäß den Anweisungen des Herstellers isoliert und aufgereinigt. Die Exom-Bibliotheken wurden mit Hilfe des SureSelectXT Mouse All Exon Kits (Agilent) durchgeführt. Das gezielte Exom-Capture durch Hybridisierung an eine RNA-Bibliothek erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers (Agilent). Die Reinigung und Anreicherung dieser Bibliothek erfolgte durch Bindung an MyOne Streptavidin T1 Dynabeads (LifeTechnologies) und Off-Bead-PCR-Amplifikation im linearen Bereich. Die anschließende Sequenzierung der Bibliotheken wurde mittels 2x150 bp Paired-End-Sequenzierung, 6 bp Index-Reads und dem High Output Reagent Kit v2.5 (300 Zyklen) auf der NextSeq550-Plattform (Illumina) durchgeführt.

Im nächsten Schritt wurden die Daten analysiert. Dazu wurden zunächst Fastq-Dateien mit Bcl2Fastq 1.8.4 (Illumina) erzeugt. Die BWA-Version 0.7.4. wurde verwendet, um die erhaltenen Sequenzdaten an das Mausreferenzgenom (GRCm38.71) zu alignieren. Konvertierungsschritte wurden mit Samtools durchgeführt, gefolgt von der Entfernung von PCR-Duplikaten mittels Picard (<http://broadinstitute.github.io/picard>). Die lokale Alignment bei kleinen

Insertionen/Deletionen („Indels“, <50bp), das Calling von somatischen Einzelnukleotidvariationen (single nucleotide variants, SNV), die Annotierung und die Rekalibrierung wurden mit Hilfe von GATK 2.4.9 durchgeführt. Maus dbSNP138 und dbSNP für die verwendeten Mausstämme wurden als Trainingsdatensätze für die Rekalibrierung verwendet. SNVs und Indels wurden mit Mutect und VarScan gecallt. Zusätzlich wurden Indels mit Hilfe von Platypus gecallt. Die identifizierten Varianten wurden mit dem Variant Effect Predictor (VEP) unter Verwendung der Ensembl-Datenbank (v70) annotiert. Zusätzlich wurden Scores der Softwaretools SIFT und Polyphen hinzugefügt, die einen potentiellen Funktionsverlust der betroffenen Gene/Proteine vorhersagen. Um falsch-positive Varianten herauszufiltern, wurden nur solche Varianten in der finalen Auswertung berücksichtigt, die eine Allelfrequenz von mindestens 10% im Tumor haben und deren Position im dazugehörigen Normalgewebe ausreichend abgedeckt ist (mit jeweils mindestens 10 Sequenzierungs-Reads). Gene, die in ursächlichem Zusammenhang mit Krebs bekannt sind, wurden mittels der Genliste des Cancer Gene Consensus (CGC, COSMIC Datensatz) identifiziert. Zur Analyse der Mutationssignaturen wurden die Exom-Daten einem standardisierten Alignment mit BWA-mem unterzogen. In einem Vorverarbeitungsschritt, bestehend aus GATK Realignierung, Recalibrierung und Trimming, wurden Einzelnukleotidvarianten für die pB-ALL-Proben der bestrahlten *Sca1-ETV6-RUNX1*-Mäuse (n=6) sowie für Kontrollproben (Infektions-getriggerte pB-ALL-Proben von nicht bestrahlten *Sca1-ETV6-RUNX1*-Mäusen, n=16) mit Platypus Version 0.8.1 und Standardparametern bestimmt. Kontrollvarianten wurden gepoolt und aus der Variantenliste der einzelnen Tumorproben entfernt, und umgekehrt. Außerdem wurden alle Varianten mit einem Qualitätsscore <100 aussortiert. Mutationssignaturanalysen wurden anschließend mit dem R/Bioconductor-Paket

MutationalPatterns, Version 1.6.169, durchgeführt. Die Mutationssignaturen Version 3.2 im COSMIC Release v93 wurden für die Analysen verwendet.

6. Stand der Wissenschaft und Technik

Leukämie ist die häufigste Krebserkrankung bei Kindern. Etwa 30% aller Krebserkrankungen, die bei Kindern vor dem Alter von 15 Jahren diagnostiziert werden, sind Leukämien. Die häufigste Form ist die akute lymphoblastoide Leukämie, die sich von Vorläufern der B-Zellen ableitet (prä-B- oder abgekürzt pB-ALL).⁴

Im Auftrag des Bundesamtes für Strahlenschutz führte das Deutsche Kinderkrebsregister in Mainz von 2003 bis 2007 die Studie "Kinderkrebs in der Umgebung von Kernkraftwerken" (KiKK-Studie) durch und konnte eine Korrelation zwischen der Nähe des Wohnortes zu einem Atomkraftwerk und dem Risiko eine Leukämie zu entwickeln aufzeigen.⁵ Ein höheres Risiko insbesondere der unter 5-jährigen Kinder an einer Leukämie zu erkranken, wenn sie in unmittelbarer Nähe (5 km Radius) zu Kernkraftwerken wohnten, stellten auch andere Studien fest.⁵⁻¹¹

Dies lässt sich jedoch mit dem derzeitigen wissenschaftlichen Kenntnisstand über Strahlenwirkungen nicht erklären (aktuelle Übersicht zusammengefasst in ¹²). Ionisierende Strahlung ist zwar ein akzeptierter Risikofaktor für die Leukämie-Entstehung im Kindesalter, allerdings ist die Exposition in der Nähe von Kernkraftwerken zu gering um einen direkten Kausalzusammenhang zu erkennen. Für die Leukämieentstehung nach Bestrahlung wird bisher eine linear-quadratische Dosis-Wirkung ohne Schwellenwert angenommen, die sich bei niedrigen Dosen langsam, bei hohen Dosen schnell verändert.^{13,14} Wirkungen im niedrigen Dosisbereich (definiert als Dosen <100 mGy beim Menschen)¹⁵, der für die Allgemeinbevölkerung am relevantesten ist, werden meist extrapoliert, weil für Studien große Kohorten

benötigt werden und eine hohe individuelle Variation besteht. Die Bedeutung schwacher ionisierender Strahlung im Niedrigdosisbereich ist daher noch unklar und Empfehlungen für weitere Forschung wurden gegeben.¹⁶⁻¹⁸

Theoretisch erzeugt Strahlung im Niedrigdosisbereich zu wenig Energie in der zellulären DNA und anderen Zielstrukturen im menschlichen Körper, um als direkt verursachend angesehen werden zu können. Allerdings könnte eine genetische Prädisposition die Strahlungsempfindlichkeit und die Wahrscheinlichkeit einer Tumorerkrankung insbesondere bei Kindern erhöhen.

Bei ≈5% gesunder Kinder kann eine genetische Prädisposition zu einer pB-ALL in Form von expandierten *ETV6-RUNX1*-positiven präleukämischen Vorläuferzellen im neonatalen Nabelschnurblut nachgewiesen werden.^{19,20} Dies scheint die erste Veränderung („first hit“) zu sein, die zur Umwandlung einer normalen hämatopoietischen Vorläufer- oder Stammzelle in eine prä-leukämische Zelle führt. Diese Stammzellen können über einen langen Zeitraum persistieren, bevor sie durch eine sekundäre Mutation („second hit“) zum Ausbruch einer akuten Leukämie führen können. Die tatsächliche Inzidenz *ETV6-RUNX1*-positiver Leukämien ist mit einem erkrankten Kind pro 10000 Kindern etwa 500-fach geringer als die Inzidenz von Neugeborenen, die genetisch prädisponiert sind, eine Leukämie zu entwickeln.

Die Ursachen, die zu den sekundären onkogenen Veränderungen und in der Folge zu einer pB-ALL führen, sind noch weitestgehend ungeklärt. Umweltbelastungen standen lange Zeit im Mittelpunkt vieler epidemiologischer Studien, die versuchten die ätiologische Rolle von Infektionen, Bestrahlung und anderen möglichen Faktoren aufzuklären.

Die bekannteste Ursache für Leukämie im Kindesalter ist eine moderate bis hochdosierte ionisierende Strahlung, wie sie beispielsweise bei einer

Bestrahlungstherapie erzeugt wird (moderat) oder bei den Atombombenabwürfen in Hiroshima und Nagasaki auftrat (hochdosiert).²¹⁻²³ Dabei scheint gerade die Exposition in der Kindheit besonders kritisch, weil das Knochenmark von Kindern radiosensitiver ist als bei Erwachsenen. Studien zeigen daher ein erhöhtes Risiko für strahleninduzierten Krebs bei Kindern im Vergleich zu Erwachsenen.²⁴⁻²⁸ Retrospektive Kohortenstudien berichten insbesondere über einen positiven Zusammenhang zwischen einer wiederholten niedrig dosierten Bestrahlung mit diagnostischen bildgebenden Verfahren und der Entwicklung von Leukämien bei Kindern. Fünf bis zehn kraniale Bildgebungsverfahren mit Computertomographie (CT)-Geräten, die eine kumulative Dosis von 50 mGy erreichen, können das Risiko einer Leukämie bei Kindern verdreifachen.²⁹ Neuere gepoolte Analysen von Expositionen unterstützen diese früheren Befunde. Im Zusammenhang mit diagnostischer Bildgebung ergaben kumulative aktive Knochenmarkdosen im Kindesalter zwischen 5,9 und 10,1 mGy bzw. zwischen 20-100 mSv (effektive Dosis) ein signifikant erhöhtes Leukämie-Risiko.^{30,31} Für einzelne Röntgenuntersuchungen wurde kein erhöhtes Risiko gefunden.^{30,32}

Da festzustellen ist, dass durch diagnostische Maßnahmen (vor allem steigende CT-Untersuchungen³³) Kinder einer zunehmenden Expositionen im Niedrigdosisbereich ausgesetzt sind und gleichzeitig die Krebsinzidenzraten (insbesondere für lymphatische Leukämien) bei Kindern in Deutschland, Europa und auch weltweit steigen,³⁴⁻³⁶ sind genauere Untersuchungen zum Krebsrisiko durch Bestrahlung im Niedrigdosisbereich notwendig.

Auch die allgegenwärtige natürliche Hintergrundstrahlung ($\approx 0,5\text{--}2,5$ mSv/Jahr) scheint das Risiko einer Leukämie im Kindesalter zu erhöhen. Sie leistet den bei weitem größten Beitrag zur Exposition.³⁷ So führte eine britische Studie auf der

Grundlage von Leukämie-Risikomodellen und Schätzungen der natürlichen Hintergrundstrahlung, die das rote Knochenmark von Kindern erhält, etwa 20% aller Leukämiefälle in Großbritannien im Kindesalter auf diesen Faktor zurück.³⁸ Zahlreiche epidemiologische Studien untersuchten den Zusammenhang zwischen Hintergrundstrahlung (einschließlich Radon- und Gammastrahlungsexposition) und Leukämie im Kindesalter, jedoch waren die Ergebnisse uneinheitlich.³⁹ Bei der Bewertung der Ergebnisse müssen methodische Unterschiede genau beachtet werden. Eine große Herausforderung stellt die Bewertung der individuellen Strahlungsexposition von Kindern durch Hintergrundstrahlung dar und größere Studienpopulationen oder gepoolte Studien sind erforderlich, um z.B. molekulargenetische Untergruppen von Leukämien zu untersuchen.³⁹ Eine aktuelle Übersichtsarbeit zeigt, dass es zwar Hinweis auf einen Zusammenhang gibt, aber derzeit keine verlässlichen Schlussfolgerungen über Hintergrundstrahlung und Krebs bei Kindern gezogen werden können.⁴⁰

Eine vorhandene genetische Krebsprädisposition könnte die Sensitivität von Kindern gegenüber Strahlung erhöhen und so zum Tumorrisiko beitragen. So zeigten z.B. Mäuse mit prädisponierender *KRAS-G12C* Mutation nach Bestrahlung mit niedrigen CT-Dosen eine signifikant erhöhte Anzahl an Tumoren (43%) im Vergleich zu Wildtyp-Mäuse.⁴¹ Es kann daher nicht ausgeschlossen werden, dass genetische Faktoren zu einem erhöhten Tumorrisiko bei Kindern durch gering dosierte ionisierende Strahlung führen könnten. Um dies experimentell zu prüfen, wurde in diesem Projekt das Sca1-*ETV6-RUNX1* Mausmodell eingesetzt, das die häufigste bei Kindern anzutreffende präleukämische Gentranslokation *ETV6-RUNX1* trägt.

Dieses Mausmodell wurde im Rahmen des EU-Projektes „Advanced Research on Interaction Mechanisms of electroMagnetic exposures with Organisms for Risk

Assessment“ (ARIMMORA) durch den Kollaborationspartner Prof. Isidro Sanchez-Garcia (IBMCC, Salamanca) entwickelt und bereits erfolgreich angewendet.^{1,42} Anhand dieses Maus-Modells, welches die Situation im Menschen in entscheidenden Details widerspiegelt,⁴³ sollte im aktuellen Projekt der Einfluss ionisierender Gammastrahlung im Niedrigdosisbereich bei vorhandener genetischer Prädisposition (*ETV6-RUNX1* Translokation) experimentell getestet und ein möglicher Zusammenhang mit der Leukämieentwicklung analysiert werden.

Im Rahmen des aktuellen Projektes sollte untersucht werden, ob die Exposition mit Niedrigdosisstrahlung einen möglichen zweiten "Hit" verursachen kann und mittels Sequenzierung des Tumormaterials wurde angestrebt, Aufschluss über die Art des zweiten "Hit" zu bekommen. Dazu sollte die Betrachtung von Kohorten von jeweils 30 *Sca1-ETV6-RUNX1*-Mäusen, die einmalig mit exakten Dosen (2 Gy, 0,5 Gy und 50 mGy) aus einer Gammastrahlenquelle (Cs-137) bestrahlt bzw. scheinbestrahlt (0 Gy) werden, ausreichend sein. Nachweisbare Effekte von niedrigdosierter Cs-137 Strahlung auf Mäuse wurden bei den gewählten Dosierungen von 2 Gy and 0,5 Gy bereits gezeigt.⁴⁴ Späte Effekte auf Knochenmark, Lunge und Testis, eine Störung des Immunsystems (Induktion pro-entzündlicher Zytokine TNF, IL-1p, IL-6) sowie epigenetische Effekte (Änderung des Methylierungsmuster der DNA in den Zellen) wurden detektiert. Bei der sehr geringen Dosis von 0,05 Gy wurden bisher keine Effekte festgestellt. Diese Dosis dient daher als Vergleichswert um die Strahlenreaktion bis in den Niedrigdosisbereich zu erfassen. Zusätzlich sollten zur Kontrolle scheinbestrahlte (0 Gy) Mäuse untersucht werden.

Genetische, expositionsbedingte Veränderungen sollten in den Tumorzellen mittels Sequenzierung der für Proteine codierenden Genbereiche mittels Ganz-Exom-Sequenzierung untersucht werden. Eine erhöhte Rate onkogener *RUNX1*-

Punktmutationen wurde beispielsweise im Zusammenhang mit Bestrahlung (auch gering dosierter) in einer Studie gefunden, die somatische Mutationen beim myelodysplastischen Syndrom (MDS) und der akuten myeloischen Leukämien (AML) bei Überlebenden des Atombombenabwurfs über Hiroshima, bei mit Strahlentherapie behandelten Patienten und bei sporadischen MDS/AML-Fällen verglichen haben.⁴⁵

Das aktuelle Projekt wird daher dazu beitragen, den Einfluss von Niedrigdosisstrahlung auf die Leukämieentwicklung im gesunden Organismus bei genetischer Prädisposition zu bewerten und wird eine wichtige Grundlage zur Abschätzung des Strahlenrisikos durch diagnostische Anwendungen liefern.

III. Eingehende Darstellung

7. Erzielte Ergebnisse

7.1 Exposition der Mäuse und Beobachtung der Leukämieentwicklung

Von 120 *Sca1-ETV6-RUNX1*-Mäusen, die im Alter von einem Monat einmalig bestrahlt bzw. scheinbestrahlt (2 Gy, 0,5 Gy, 50 mGy, 0 Gy, n=30 je Behandlung) wurden, erkrankten im zeitlichen Verlauf insgesamt sieben Mäuse an einer prä-B-Zell-Leukämie (Abbildung 1, Tabelle 1).

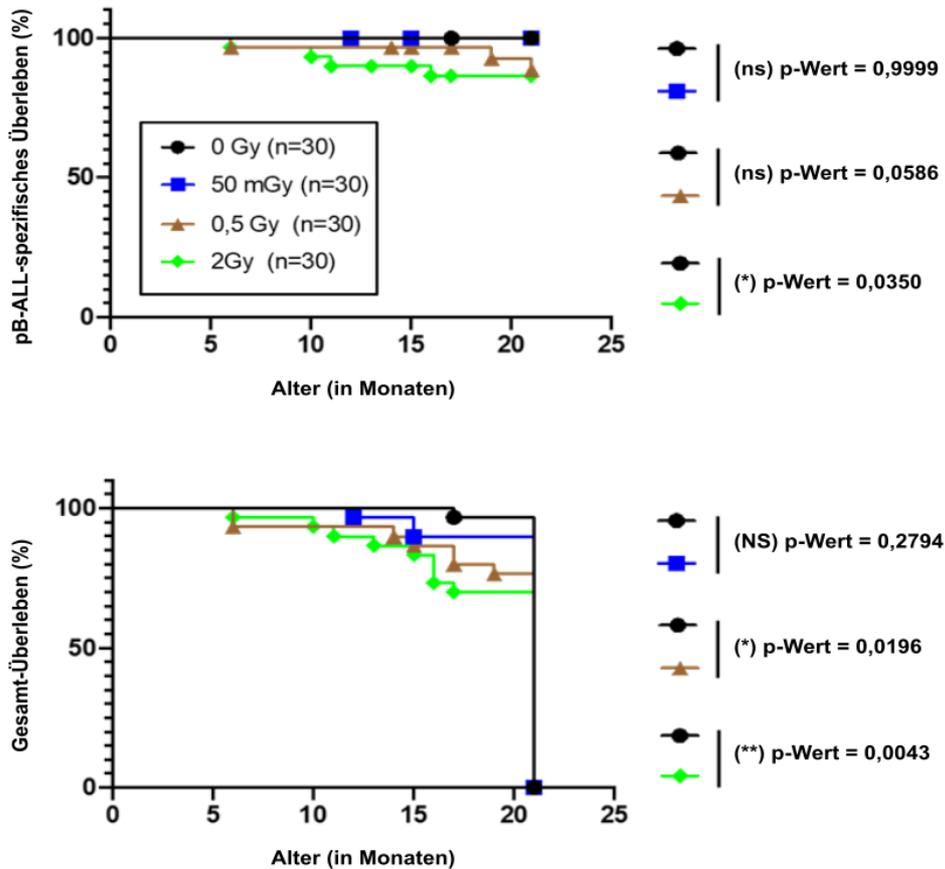


Abbildung 3 Überleben bestrahlter und scheinbestrahlter transgener *Sca1-ETV6-RUNX1*-Mäuse.

Oben: Das pB-ALL spezifische Überleben der *Sca1-ETV6-RUNX1* Mäuse nach Bestrahlung mit einer einzigen Dosis Gamma-Strahlung (50 mGy, 0,5 Gy bzw. 2 Gy, n=30 je Kohorte, s. Legende) bzw. Scheinbestrahlung (0 Gy, n=30) ist gezeigt. **Unten:** Das Gesamtüberleben der in der oberen Abbildung gezeigten Mauskohorten ist gezeigt (Log-rank (Mantel-Cox)-Test, p-Werte). Die statistischen Analysen wurden mit GraphPad Prism v5.01 (GraphPad Software) durchgeführt (ns: nicht signifikant).

Tabelle 1 Übersicht über die analysierten bestrahlten bzw. scheinbestrahlten *Sca1-ETV6-RUNX1*-Maus-Kohorten und das Auftreten von pB-ALL und weiteren Tumoren in der Nachverfolgung.

Bestrahlungsdosis (Gy)	pB-ALL (n von 30)	pB-ALL (%)	Andere B-Zell-Tumore (n von 30)	Andere B-Zell-Tumore (%)	T-Zell-Tumore (n von 30)	T-Zell-Tumore (%)
0 Gy	0	0	0	0	0	0
50 mGy	0	0	0	0	0	0
0,5 Gy	3	10	0	0	1	3,3
2 Gy	4	13,3	2	6,6	1	3,3

Keine der scheinbestrahlten Mäuse oder der Mäuse, die einer geringen Strahlungs-dosis (50 mGy) ausgesetzt waren, erkrankte an einer Neoplasie. Drei der sieben an pB-ALL erkrankten Mäuse wurden mit 0,5 Gy behandelt und erkrankten im Alter von 6, 19 und 21 Monaten, d.h. 5, 18 bzw. 20 Monate nach der Bestrahlung. Vier der sieben Mäuse wurden mit der höchsten Dosis (2 Gy) bestrahlt und erkrankten im Alter von 6, 10, 11 und 16 Monaten an einer pB-ALL. Die Inzidenz der pB-ALL war nach der Gammabestrahlung nur in der 2-Gy-Bestrahlungsgruppe signifikant erhöht (p -Wert=0,0350). Die Gesamtüberlebenszeit war jedoch sowohl in der 0,5-Gy- als auch in der 2-Gy-Bestrahlungsgruppe signifikant verringert (p -Wert=0,0196) bzw. (p -Wert=0,0043). In den analysierten Kohorten traten in der zeitlichen Nachverfolgung nach Bestrahlung vier andere Neoplasien auf. Zwei der Mäuse aus der 2-Gy-Bestrahlungsgruppe erkrankten an neoplastischen B-Zell-Erkrankungen, die von reiferen B-Zellen ausgingen (B-Zell-Lymphom, reife B-Zell-Leukämie). In den mit 2 Gy und 0,5 Gy bestrahlten Gruppen trat außerdem je eine Maus mit einer T-Zell-Leukämie auf (T-ALL, im Alter von 16 bzw. 21 Monaten). Das Auftreten der pB-ALL bei *Sca1-ETV6-RUNX1*-Mäusen manifestierte sich mit Splenomegalie, einer Störung der Milzarchitektur aufgrund von Tumordinfiltration und dem Auftreten von Blastenzellen im Knochenmark und im peripherem Blut. Die durchflußzytometrische Analyse ergab einen unreifen B-Zell-Immunphänotyp (CD19-

/B220^{- to low}/IgM^{- to low}) der Tumorzellen im Knochenmark (Abbildung 4), sowie in Milz und peripherem Blut. Die molekularbiologische Analyse der Immunglobulin-Rearrangements mittels PCR und spezifischen Primern zeigte ein klonales, unreifes B-Zell-Rezeptor-Rearrangement in den Tumorzellen im Vergleich zu polyklonalen Rearrangements in CD19⁺-sortierten Wildtyp-Splenozyten (Abbildung 5).

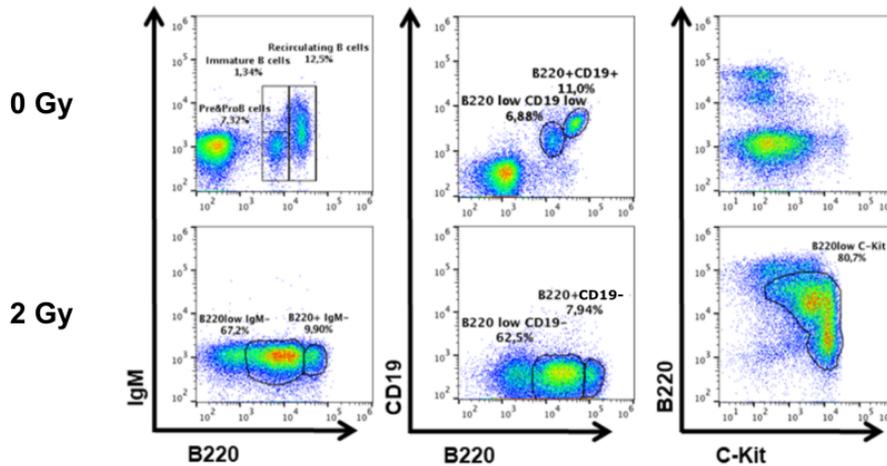


Abbildung 4 Durchflusszytometrische Charakterisierung der *Sca1-ETV6-RUNX1*-Leukämien. Dargestellt sind hämatopoetische Zellpopulationen aus dem Knochenmark einer erkrankten *Sca1-ETV6-RUNX1*-Maus aus der 2 Gy-Bestrahlungsgruppe im Vergleich zu einer altersgleichen gesunden, scheinbestrahlten *Sca1-ETV6-RUNX1*-Maus (0 Gy-Bestrahlungsgruppe). Die repräsentative Darstellung zeigt die Anhäufung von unreifen B-Zell-Blasten ($CD19^-$, $B220^{low}$, IgM^- , $c-Kit^+$) in der leukämischen *Sca1-ETV6-RUNX1*-Maus.

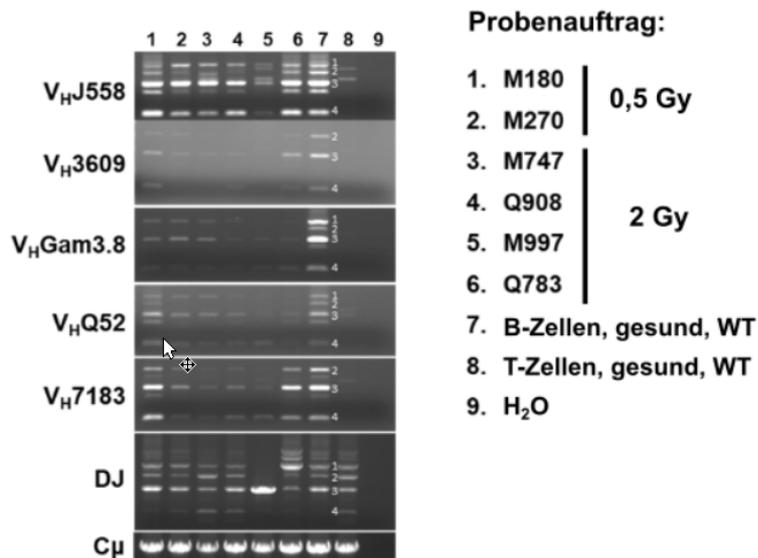


Abbildung 5 Molekularbiologische Charakterisierung des Immunglobulin-Genrearrangements in pB-ALL von bestrahlten *Sca1-ETV6-RUNX1*-Mäusen.

Eine Analyse der Klonalität von Leukämien, die in *Sca1-ETV6-RUNX1*-bestrahlten Mäusen auftreten, mittels PCR-Analyse des V-D-J Genrearrangements ist gezeigt. Sortierte $CD19^+$ Milz-B-Zellen von gesunden Mäusen dienen als Kontrolle für polyklonale Immunglobulin-Genrearrangements. $CD8^+CD4^+$ T-Zellen aus dem Thymus von gesunden Mäusen und eine Probe ohne DNA-Zugabe (DNA-Volumen durch Wasser ersetzt, „H₂O“) dienen als Negativkontrollen. Probenauftrag wie in der Legende unter Angabe der Identnummern der Mäuse beschrieben.

7.2 Charakterisierung der strahleninduzierten Tumorzellen

7.2.1 Ganz-Exom-Sequenzierung und Analyse onkogener Mutationen

Zur Durchführung der Ganz-Exom-Sequenzierung von leukämischen Zellen wurde die Tumor-DNA aus dem leukämischen Gewebe (Knochenmark, Lymphknoten oder Milz) mit der größten Menge an Blastenzellen in den erkrankten Mäusen gewonnen. Aus der Schwanzspitze der jeweiligen Maus wurde DNA als Referenz-Keimbahnmaterial extrahiert. Sieben pB-ALL traten bei den einmalig mit 0,5 (n=3, 10%) bzw. 2 Gy (n=4, 13,3%) bestrahlten *Sca1-ETV6-RUNX1*-Mäusen auf. Nur in einem Fall (bestrahlt mit 0,5 Gy) konnte aufgrund eines geringen Tumorzellgehaltes von dem Tumor keine DNA isoliert werden. Sechs strahleninduzierte pB-ALL und die dazugehörigen Keimbahnkontrollen wurden einer Ganz-Exom-Sequenzierung unterzogen, um die genetischen Veränderungen der Leukämien zu bestimmen und im Vergleich zu nicht exponierten Zellen zu erfassen (Tabelle 2). Die Tumore 1, 3, 4 und 5 wiesen zwischen 10 und 42 somatischen Einzelnukleotidvariationen (*single nucleotide variations*, SNV) auf. Das ist eine im Vergleich zu anderen Tumorarten (z.B. dem durch mutagene UV-Strahlung induziertem Haut-Melanom) relativ geringe Zahl an somatischen SNV. Dies ist jedoch vergleichbar mit Befunden in infektionsinduzierten Leukämien in diesem Mausmodell und in humanen *ETV6-RUNX1*-positiven pB-ALL mit durchschnittlich 10-14 SNV. Die strahleninduzierten Tumore Nr. 2 und 6 waren im Vergleich dazu höher mutiert (hypermuiert, 192 bzw. 78 SNV). Dies liegt vermutlich an der Art der induzierten primären Mutationen in den Tumoren Nr. 2 und 6, die zu einer weiteren Akkumulation von sekundären Mutationen führen können (z.B. in DNA-Reparaturgenen wie *Atm* in Tumor Nr. 2). In Abhängigkeit von der Strahlendosis wurde kein Unterschied in der Zahl der somatischen SNV festgestellt. Anhand einer *In silico*-Vorhersage mittels der Computerwerkzeuge SIFT und Polyphen wurden somatische SNV, die schädlich für die Proteinfunktion sind, identifiziert. In Genen, die bekannt sind für eine ursächliche Krebsassoziation und deshalb enthalten sind in dem *Cancer Gene Census*-Katalog (COSMIC-Datenbank, Wellcome Sanger Institut, Hinxton, Großbritannien), abgekürzt als „CGC-Gene“, wurden schädliche somatischen SNV in vier der

strahleninduzierten Tumore (Nr. 2, 3, 4 und 6) detektiert. Diese sind bereits im Zusammenhang mit pB-ALL beschrieben worden (St. Jude Children's Research Hospital — PeCan Data Portal, Memphis, TN, USA). Mutationen in *ATM*, *SH2B3*, *PTPN11*, und *KRAS* sind auch für die humane *ETV6-RUNX1*-positive pB-ALL beschrieben worden. Mutationen in *SH2B3* und *PTPN11* sind außerdem assoziiert mit einer Keimbahnprädisposition für humane pB-ALL. In den Tumoren Nr. 3 und 6 fallen Gene auf, deren Mutationen bekanntermaßen rekurrent in humanen Tumoren auftreten. Diese Mutationen in den CGC-Genen *Jak1*, *Jak3*, *Pttn11* und *Kras* sind mit einer Erhöhung des Jak-Stat- bzw. des Ras-Mapk-Signalwegs verbunden und ursächlich mit einer erhöhten Proliferation von B-Zellen assoziiert. Eine Go-Term-Analyse (Computerwerkzeug der internationalen Bioinformatikinitiative Gene *Ontology* (GO)) ergab eine signifikante Anreicherung dieser Signalwege (FDR $P < 0.05$). Für die in den Tumoren Nr. 2 und 4 detektierten SNV in Genen, die mit Krebs assoziiert sind, fehlt bisher eine funktionelle Untersuchung, daher ist der konkrete Zusammenhang mit der Entstehung der Leukämie in diesen Fällen noch nicht geklärt. Eine Analyse mittels des PANTHER Überrepräsentationstests (Computerwerkzeug der internationalen Bioinformatikinitiative Gene *Ontology* (GO)) ergab allgemein eine signifikante Anreicherung bestimmter biologischer Funktionen in den strahleninduzierten Tumoren (Fisher-Test, FDR Korrektur), u.a. Proliferation, hämatopoetische Differenzierung und Zytokin-Signalweg, die zur Leukämieentstehung beitragen können. Neben SNV können auch andere Mutationen, wie z.B. kleine Insertionen oder Deletionen (Indels) somatisch in codierenden Genabschnitten induziert und mittels der Ganz-Exom-Sequenzierung analysiert werden. Allerdings wurden in den strahleninduzierten Tumoren in dieser Studie keine somatischen Indels detektiert. *In vitro*-Experimente mit induzierbaren pluripotenten Stammzellen deuten zwar an, dass Gamma-Strahlung durch Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen zu einer erhöhten Anzahl an Mikrohomologie-vermittelten Deletionen führen kann, jedoch ist die Strahlenbehandlung der Mäuse in dieser Studie einmalig und kurz und der Organismus komplexer. In sporadischen

humanen *ETV6-RUNX1*+ pB-ALL ist die Zahl der detektierten Indels mit weniger als einem Indel pro Patient ebenfalls sehr gering.

Tabelle 2 Somatische SNV in Krebs-assoziierten Genen des „Cancer Gene Census“ (CGC), die in den strahleninduzierten Tumoren (Nr. 1-6) von somatischen SNV betroffen waren.

Nr.	Dosis (Gy)	Tumorgehalt (%)	SNV (total)	Schädliche SNV (total)	CGC-Gene mit schädlichem SNV	Aminosäureaustausch	Betroffener Signalweg
1	0,5	44	13	2	-	-	-
2	0,5	79	192	86	<i>Atm</i>	V1535E	Serin/Threonin-Kinase, DNA-Reparatur
					<i>Csmd3</i>	P3046H	Nicht bekannt
					<i>Nsd3</i>	G729V	Histonmethylierung, Genexpression
					<i>Ret</i>	D303Y	Tyrosinkinase
					<i>Sh2b3</i>	Q210L	Jak-Stat, Zytokin, Hämatopoese
3	2	40	42	15	<i>Jak1</i>	R723H	Jak-Stat
					<i>Jak3</i>	R653H	Jak-Stat
					<i>Ptpn11</i>	S506L	Ras-MapK
4	2	60	10	4	<i>Ptprk</i>	S496Y	Tyrosin-Phosphatase
5	2	85	19	8	-	-	-
6	2	38	78	38	<i>Kras</i>	G13D	Ras-MapK
					<i>Sh2b3</i>	F403V	Jak-Stat, Zytokin, Hämatopoese
					<i>Wt1</i>	E143D	Transkription

7.2.2 Mutationssignaturen

Mutationssignaturen sind charakteristische Kombinationen von Mutationstypen, die durch spezifische mutagene Einflüsse, wie z.B. Bestrahlung, entstehen können und Aufschluss über die beteiligten zellulären Prozesse (z.B. DNA-Reparaturwege) geben können. Bei der Analyse der Mutationssignaturen der strahleninduzierten Tumore in dieser Studie zeigte sich eine

allgemeine Prävalenz von Übergängen zwischen Pyrimidinen (C>T, T>C) (Abbildung 6A). Der ebenfalls festgestellte erhöhte Beitrag von C>A Übergängen war im Wesentlichen nur in den hypermutierten Tumoren Nr. 2 und 6 zu beobachten. Aufgrund der relativ geringen Zahl an strahleninduzierten Tumoren sowie deren unterschiedliche und durchschnittlich relativ geringe Anzahl an somatischen SNV konnten bisher keine spezifischen Signaturen für die strahleninduzierten *Sca1-ETV6-RUNX1*-Leukämien identifiziert werden (Abbildung 6B). Die strahleninduzierten Tumore bildeten kein von anderen Tumoren getrenntes Cluster in der Analyse. Die COSMIC-Signaturen SBS42 ($p=0,027$; Abbildung 6C), SBS45 ($p=0,022$), SBS49 ($p=0,004$) und SBS52 ($p=0,011$) waren signifikant erhöht in strahleninduzierten *Sca1-ETV6-RUNX1*-Leukämien im Vergleich zu 16 nicht bestrahlten *Sca1-ETV6-RUNX1*-Kontroll-Leukämien ($p<0,05$, t-Test), allerdings nicht nach Bonferroni Korrektur. Die Signatur SBS42 wurde initial bei Expositionen gegenüber organischen Lösungsmitteln, insbesondere Halogenalkanen, identifiziert. Die Signaturen SBS45, SBS49 und SBS52 könnten auf den Sequenzierungsprozess zurückzuführen sein. Eine Analyse von Ganz-Genom-Daten würde hier aufgrund der größeren Zahl an auswertbaren SNV wahrscheinlich deutlichere Signale liefern als eine Analyse von Ganz-Exom-Daten, die nur einen kleineren Bruchteil (2-3%) des Gesamtgenoms abbilden.

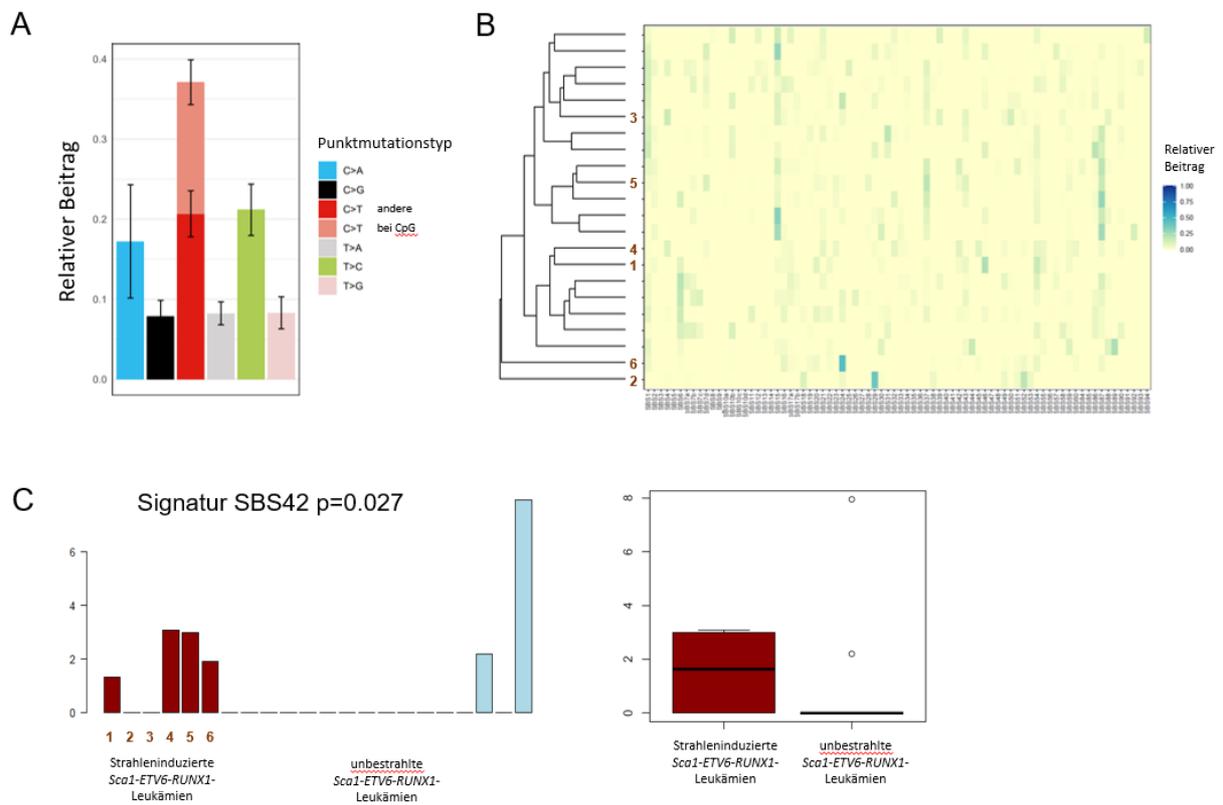


Abbildung 6 Analyse der strahleninduzierten Mutationssignaturen in *Sca1-ETV6-RUNX1*-Leukämien.

A) Mutationsspektrum (Häufigkeit der einzelnen Basenpaaraustausche) der identifizierten somatischen SNV nach der Filterung. **B)** Spektrumszerlegung mit COSMIC-Signaturen als Grundlage. Die Heatmap zeigt den relativen Beitrag der einzelnen Mutationssignaturen basierend auf den beschriebenen COSMIC-Signaturen zum Mutationsspektrum der sechs strahleninduzierten (mit 1-6 gekennzeichnet) und der 16 nicht-strahleninduzierten *Sca1-ETV6-RUNX1*-pB-ALL Kontrollproben. Die Fälle wurden aufgrund ihrer Mutationssignatur geclustert. Die Skala reicht von gelb (Signatur nicht detektiert) bis dunkelblau (Signatur hat einen hohen Beitrag am Mutationsspektrum). Die Heatmap zeigt, dass die strahleninduzierten Leukämien sich mit den Kontrollen vermischen und kein separates Cluster bilden. Eine spezifische strahleninduzierte Mutationssignatur ist nicht identifizierbar. **C)** Die COSMIC-Signatur SBS42 zeigt den höchsten relativen Gesamtbeitrag. Der Barplot zeigt die absolute Anzahl der SNV die zur COSMIC Signatur SBS42 in den einzelnen Fällen beitragen. Der Boxplot stellt die zwei Gruppen (strahleninduzierte Leukämien vs. Kontrollen) dar.

8. Voraussichtlicher Nutzen, Verwertbarkeit der Ergebnisse

Zusammenfassend zeigt sich in dieser Studie keine Leukämieentwicklung im Niedrigdosisbereich (50 mGy). Leukämien wurden nur bei *Sca1-ETV6-RUNX1*-Mäusen beobachtet, die einmalig mit 0,5 oder 2 Gy bestrahlt wurden. Die Exposition wurde durchgeführt zu einem Zeitpunkt, der dem des frühen Kindesalters beim Menschen gleicht. Expositionsbedingte somatische Mutationen in diesen prä B-ALLs betrafen Gene, die eine Rolle in der Proliferation von hämatopoietischen Zellen spielen (z.B. der Jak-Stat- und der Ras-MapK-Signalweg). Das Spektrum dieser betroffenen Gene überlappt nur z.T. mit den Genen, die in nicht-expositionsbedingten murinen und humanen *ETV6-RUNX1*-positiven Leukämien gefunden werden und sprechen für ein eigenständiges Mutationsmuster und Mechanismus der Leukämogenese.

In der hier durchgeführten Mutationsmuster-Analyse konnte allerdings aufgrund der geringen Fallzahl und der geringen Zahl an somatischen Varianten bisher keine spezifische strahleninduzierte Signatur identifiziert werden. Hier sollten in zukünftigen Projekten größere Kohorten oder Modelle mit einer höheren Tumorentstehung betrachtet und durch die Whole-Genome-Sequenzierung und ergänzende Omics-Analysen größere Datensätze generiert werden, um ein umfassendes Bild von spezifischen *ETV6-RUNX1*-assoziierten sekundären genomischen Veränderungen als Folge von niedrig dosierter Bestrahlung zu liefern.

Die durchgeführte Studie und die erzielten Ergebnisse bilden eine Grundlage um den Einfluss von Niedrigdosisstrahlung auf die Leukämieentwicklung bei Kindern mit genetischer Prädisposition zu verstehen und das Risiko dieser Kinder durch Strahlenbelastung z.B. bei Diagnoseverfahren mit niedrig dosierter Strahlung einzuschätzen.

IV. Anhang

9. Literatur

1. Schuz J, Dasenbrock C, Ravazzani P, et al. Extremely low-frequency magnetic fields and risk of childhood leukemia: A risk assessment by the ARIMMORA consortium. *Bioelectromagnetics*. 2016;37(3):183-189.
2. 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.
3. Martin-Lorenzo A, Hauer J, Vicente-Duenas C, et al. Infection Exposure is a Causal Factor in B-cell Precursor Acute Lymphoblastic Leukemia as a Result of Pax5-Inherited Susceptibility. *Cancer Discov*. 2015;5(12):1328-1343.
4. Erdmann F, Kaatsch P, Grabow D, Spix C. German Childhood Cancer Registry-Annual Report 2019 (1980-2018). . *Institute of Medical Biostatistics, Epidemiology and Informatics (IMBEI) at the University Medical Center of the Johannes Gutenberg University Mainz*. 2020;
5. 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.
6. Michaelis J, Keller B, Haaf G, Kaatsch P. Incidence of childhood malignancies in the vicinity of west German nuclear power plants. *Cancer causes & control : CCC*. 1992;3(3):255-263.
7. Spix C, Schulze-Rath R, Kaatsch P, Blettner M. Case-control study on risk factors for leukaemia and brain tumours in children under 5 years in Germany. *Klinische Padiatrie*. 2009;221(6):362-368.
8. Spix C, Schmiedel S, Kaatsch P, Schulze-Rath R, Blettner M. Case-control study on childhood cancer in the vicinity of nuclear power plants in Germany 1980-2003. *European journal of cancer*. 2008;44(2):275-284.
9. Kaatsch P, Kaletsch U, Meinert R, Michaelis J. An extended study on childhood malignancies in the vicinity of German nuclear power plants. *Cancer causes & control : CCC*. 1998;9(5):529-533.
10. Sermage-Faure C, Laurier D, Goujon-Bellec S, et al. Childhood leukemia around French nuclear power plants--the Geocap study, 2002-2007. *Int J Cancer*. 2012;131(5):E769-780.
11. Bollaerts K, Simons K, Van Bladel L, et al. Childhood leukaemia near nuclear sites in Belgium, 2002-2008. *Eur J Cancer Prev*. 2018;27(2):184-191.
12. Schmidt JA, Hornhardt S, Erdmann F, et al. Risk Factors for Childhood Leukemia: Radiation and Beyond. *Front Public Health*. 2021;9(805757).
13. Hsu WL, Preston DL, Soda M, et al. The incidence of leukemia, lymphoma and multiple myeloma among atomic bomb survivors: 1950-2001. *Radiation research*. 2013;179(3):361-382.
14. UNSCEAR. 2000 Report, Scientific Annex G: Biological Effects at Low Radiation Doses. . *New York: United Nations*. 2020;
15. UNSCEAR. Biological mechanisms of radiation actions at low doses. A white paper to guide the Scientific Committee's future programme of work. . *New York: United Nations*. 2012;

16. 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(3):312-314.
17. 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)
18. Laurier D, Grosche B, Auvinen A, et al. Childhood leukaemia risks: from unexplained findings near nuclear installations to recommendations for future research. *J Radiol Prot.* 2014;34(3):R53-68.
19. 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.
20. Schafer D, Olsen M, Lahnemann D, et al. 5% of healthy newborns have an ETV6-RUNX1 fusion as revealed by DNA-based GIPFEL screening. *Blood.* 2018;
21. Ichimaru M, Ishimaru T, Belsky JL. Incidence of leukemia in atomic bomb survivors belonging to a fixed cohort in Hiroshima and Nagasaki, 1950--71. Radiation dose, years after exposure, age at exposure, and type of leukemia. *Journal of radiation research.* 1978;19(3):262-282.
22. Folley JH, Borges W, Yamawaki T. Incidence of leukemia in survivors of the atomic bomb in Hiroshima and Nagasaki, Japan. *The American journal of medicine.* 1952;13(3):311-321.
23. Greaves M. Infection, immune responses and the aetiology of childhood leukaemia. *Nature reviews. Cancer.* 2006;6(3):193-203.
24. UNSCEAR. UNSCEAR 2013 REPORT VOLUME II. Sources, effects and risks of ionizing radiation. Scientific annex B: Effects of radiation exposure of children. *New York, NY: United Nations.* 2013;
25. Richardson D, Sugiyama H, Nishi N, et al. Ionizing radiation and leukemia mortality among Japanese Atomic Bomb Survivors, 1950-2000. *Radiation research.* 2009;172(3):368-382.
26. Murray R, Heckel P, Hempelmann LH. Leukemia in children exposed to ionizing radiation. *N Engl J Med.* 1959;261(585-589).
27. Simpson CL, Hempelmann LH, Fuller LM. Neoplasia in children treated with X-rays in infancy for thymic enlargement. *Radiology.* 1955;64(6):840-845.
28. Kutanzi KR, Lumen A, Koturbash I, Miousse IR. Pediatric Exposures to Ionizing Radiation: Carcinogenic Considerations. *Int J Environ Res Public Health.* 2016;13(11)
29. Pearce MS, Salotti JA, Little MP, et al. Radiation exposure from CT scans in childhood and subsequent risk of leukaemia and brain tumours: a retrospective cohort study. *Lancet.* 2012;380(9840):499-505.
30. Abalo KD, Rage E, Leuraud K, et al. Early life ionizing radiation exposure and cancer risks: systematic review and meta-analysis. *Pediatr Radiol.* 2021;51(1):45-56.
31. Little MP, Wakeford R, Borrego D, et al. Leukaemia and myeloid malignancy among people exposed to low doses (<100 mSv) of ionising radiation during childhood: a pooled analysis of nine historical cohort studies. *Lancet Haematol.* 2018;5(8):e346-e358.
32. Baaken D, Hammer GP, Seidenbusch MC, et al. Second follow-up of a German cohort on childhood cancer incidence after exposure to postnatal diagnostic x-ray. *J Radiol Prot.* 2019;39(4):1074-1091.

33. BfS. Umweltradioaktivität und Strahlenbelastung im Jahr 2015: Unterrichtung durch die Bundesregierung. *Bonn: Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit*. 2017;
34. Spix C, Eletr D, Blettner M, Kaatsch P. Temporal trends in the incidence rate of childhood cancer in Germany 1987-2004. *Int J Cancer*. 2008;122(8):1859-1867.
35. Kaatsch P, Steliarova-Foucher E, Crocetti E, Magnani C, Spix C, Zambon P. Time trends of cancer incidence in European children (1978-1997): report from the Automated Childhood Cancer Information System project. *European journal of cancer*. 2006;42(13):1961-1971.
36. Steliarova-Foucher E, Colombet M, Ries LAG, et al. International incidence of childhood cancer, 2001-10: a population-based registry study. *Lancet Oncol*. 2017;18(6):719-731.
37. UNSCEAR. United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation 2000 Report, Vol I. Annex B, Sources, Effects and Risks of Ionizing Radiation. *New York, NY: United Nations*. 2020;
38. Wakeford R, Kendall GM, Little MP. The proportion of childhood leukaemia incidence in Great Britain that may be caused by natural background ionizing radiation. *Leukemia*. 2009;23(4):770-776.
39. Mazzei-Abba A, Folly CL, Coste A, et al. Epidemiological studies of natural sources of radiation and childhood cancer: current challenges and future perspectives. *J Radiol Prot*. 2020;40(1):R1-R23.
40. Kendall GM, Little MP, Wakeford R. A review of studies of childhood cancer and natural background radiation. *Int J Radiat Biol*. 2021;97(6):769-781.
41. Munley MT, Moore JE, Walb MC, et al. Cancer-prone mice expressing the K-rasG12C gene show increased lung carcinogenesis after CT screening exposures. *Radiation research*. 2011;176(6):842-848.
42. Campos-Sanchez E, Vicente-Duenas C, Rodriguez-Hernandez G, et al. Novel ETV6-RUNX1 Mouse Model to Study the Role of ELF-MF in Childhood B-Acute Lymphoblastic Leukemia: a Pilot Study. *Bioelectromagnetics*. 2019;40(5):343-353.
43. 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;
44. Jangiam W, Udomtanakunchai C, Reungpatthanaphong P, et al. Late Effects of Low-Dose Radiation on the Bone Marrow, Lung, and Testis Collected From the Same Exposed BALB/cJ Mice. *Dose-response : a publication of International Hormesis Society*. 2018;16(4):1559325818815031.
45. Harada H, Harada Y, Tanaka H, Kimura A, Inaba T. Implications of somatic mutations in the AML1 gene in radiation-associated and therapy-related myelodysplastic syndrome/acute myeloid leukemia. *Blood*. 2003;101(2):673-680.