

Aus der Klinik für Pädiatrie mit Schwerpunkt Onkologie/Hämatologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Der genomische Bruchpunkt der *ETV6-RUNX1* Fusion als Marker zum
Response Monitoring bei der akuten lymphoblastischen Leukämie im
Kindesalter

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Jana Hoffmann

aus Berlin

Datum der Promotion: 17.09.2021

Inhaltsverzeichnis

1	Abstract (Deutsch)	4
2	Abstract (English)	5
3	Forschungsstand	6
3.1	<i>Akute lymphoblastische Leukämie im Kindesalter</i>	6
3.2	<i>Risikostratifizierung im ALL Rezidiv</i>	6
3.3	<i>Minimale Resterkrankung</i>	7
3.4	<i>Das Fusionsgen ETV6-RUNX1</i>	8
3.5	<i>Ziel der Arbeit</i>	10
4	Methoden	12
4.1	<i>Materialien und Geräte</i>	12
4.2	<i>Patienten und Proben</i>	13
4.3	<i>Isolierung mononukleärer Zellen</i>	14
4.4	<i>DNA-Extraktion</i>	14
4.5	<i>Identifizierung des genomischen Bruchpunkts der ETV6-RUNX1 Fusion</i>	15
4.6	<i>Quantifizierung der minimalen Resterkrankung unter Verwendung des genomischen Bruchpunkts der chromosomalen Translokation t(12;21)</i>	15
4.6.1	<i>Quantitative Real-Time PCR (RQ-PCR)</i>	15
4.6.2	<i>Etablierung der patientenspezifischen quantitativen Real-Time PCR</i>	16
4.6.3	<i>Quantifizierung der Verlaufskontrollen</i>	19
4.7	<i>Quantitative Auswertung</i>	20
4.8	<i>Statistische Auswertung</i>	21
5	Neue Ergebnisse	23
5.1	<i>Auswahl und Repräsentativität der 52 Patienten</i>	23
5.2	<i>Der genomische Bruchpunkt der ETV6-RUNX1 Fusion als MRD- Marker</i>	23
5.3	<i>Übereinstimmung der Methoden</i>	24
5.4	<i>Heterogenes Ansprechen</i>	25
6	Klinische Anwendung	26
7	Literaturverzeichnis	28
	Eidesstattliche Versicherung	33
	Anteilerklärung an der erfolgten Publikation	34
	Journal Summary List	35
	Publikation	36
	Lebenslauf	52
	Publikationsliste	53
	Danksagung	54

1 Abstract (Deutsch)

Die akute lymphoblastische Leukämie (ALL) stellt die häufigste maligne Erkrankung im Kindesalter dar. Als häufigste genetische Veränderung lässt sich die Genfusion *ETV6-RUNX1* bei etwa 25% der Patienten nachweisen. Die Messung der minimalen Resterkrankung (MRD) stellt in aktuellen Therapieprotokollen einen wichtigen Bestandteil in der Risikostratifizierung und der Steuerung der Therapie sowohl in der Ersterkrankung als auch im Rezidiv dar. Hierzu kommt als Goldstandard der molekulargenetische Nachweis von patientenspezifischen klonalen Immunglobulin- oder T-Zell-Rezeptor (Ig/TCR) Genumlagerungen zur Anwendung. Die vorgelegte Arbeit hatte das Ziel, zu untersuchen, ob sich der genomische Bruchpunkt der *ETV6-RUNX1* Fusion als stabiler und sensitiver Marker zur MRD Messung in einer repräsentativen, nach der *ALL-REZ BFM 2002* Therapieoptimierungsstudie einheitlich behandelten Kohorte aus 52 *ETV6-RUNX1*-positiven ALL Rezidiven eignet.

Der genomische Bruchpunkt wurde hierbei für eine patientenspezifische quantitative Real-Time PCR genutzt. Die jeweils im Therapieverlauf bestimmten MRD Werte wurden mit den MRD Ergebnissen der Ig/TCR Genumlagerungen aus der Routine Diagnostik verglichen. Unter Verwendung der *ETV6-RUNX1* Bruchpunkt- und damit Patienten-spezifischen Primer und Sonden Kombinationen konnte für alle eingeschlossenen Patienten eine Sensitivität von 10^{-4} erreicht werden. Im Vergleich dazu war dies nur für 76% der Ig/TCR Genumlagerungen diese Sensitivität möglich.

Insgesamt zeigte sich eine sehr gute Übereinstimmung mit den Ergebnissen der MRD Quantifizierung anhand der Ig/TCR Genumlagerungen (Korrelation nach Spearman 0,85, $p < 0,01$), insbesondere mit dem jeweils höchsten verfügbaren Ig/TCR Marker der jeweiligen Patienten (Spearman Korrelationskoeffizient 0,899, $p < 0,01$). Ebenso konnte die Stabilität des Bruchpunkts über Ersterkrankung, Rezidiv und ggf. Folgerezidive bestätigt werden. Falsch positive Ergebnisse durch den Nachweis einer eventuell persistierenden präleukämischen Vorläuferzelle wurden nicht beobachtet.

Zusammenfassend konnten wir zeigen, dass sich der genomische Bruchpunkt der *ETV6-RUNX1* Genfusion als sehr spezifischer und sensitiver MRD-Marker in dieser Patientengruppe hervorragend zur präzisen Quantifizierung der minimalen Resterkrankung einsetzen lässt. Darüber hinaus stellt die *ETV6-RUNX1* Fusion einen stabilen Marker über Ersterkrankung, Rezidiv und eventueller Folgerezidive dar und ist hier somit den konventionellen Ig/TCR Genumlagerungen überlegen, da diese durch andauernde Genumlagerungen oder klonale Selektion im Verlauf der Therapie verloren gehen können.

2 Abstract (English)

Acute lymphoblastic leukemia is the most common malignancy in childhood. The fusion gene *ETV6-RUNX1* is the most frequent genetic alteration in this disease and occurs in about 25% of patients. The quantification of minimal residual disease (MRD) at specific time-points during therapy is an important element in risk stratification and tailoring of therapy intensity both during frontline and secondline treatment. For this purpose, the detection and quantification of patient specific clonal immunoglobulin- or T-cell receptor (Ig/TCR) gene rearrangements represent the current gold-standard.

The aim of this study was to determine the usability of the genomic breakpoint of the *ETV6-RUNX1* fusion as a specific and sensitive marker for MRD detection in a representative subgroup of 52 patients with an *ETV6-RUNX1*-positive ALL relapse. All patients were treated according to the *ALL-REZ BFM 2002* study.

The genomic breakpoint of the *ETV6-RUNX1* fusion was used as the target for a patient specific Real-Time PCR and MRD values from different time-points during therapy were then compared to the results from routine diagnostics using the Ig/TCR markers.

Using the *ETV6-RUNX1* fusion and patient specific primer/probe combinations, we were able to achieve a sensitivity of 10^{-4} for all included patients, while this goal was only reached in 76% of Ig/TCR markers.

We observed a particularly good concordance of the results obtained by the two methods (Spearman correlation 0.85, $p < .01$), especially when comparing the results obtained by the quantification of *ETV6-RUNX1* to the highest available Ig/TCR marker for each patient (Spearman correlation 0.899, $p < .01$). Additionally, we were able to confirm the stability of the genomic breakpoint from initial diagnosis throughout relapse and eventual subsequent relapses. We did not observe any false positive results due to the detection on a persisting pre-leukemic clone.

To conclude, we were able to confirm the genomic fusion site of the *ETV6-RUNX1* fusion as a strikingly specific and sensitive MRD marker, that is excellently suitable for precise and reliable MRD quantification in this subset of patients. Its stability from initial diagnosis to subsequent relapse represents an advantage compared to the conventional Ig/TCR markers that can get lost during the course of the disease due to ongoing gene rearrangement or clonal selection.

3 Forschungsstand

3.1 Akute lymphoblastische Leukämie im Kindesalter

Die akute lymphoblastische Leukämie (ALL) stellt die häufigste maligne Erkrankung im Kindesalter dar. Sie macht allein etwa 25% aller Krebserkrankungen im Kindesalter aus. Die Inzidenz beträgt ca. 4/100.000 Kinder unter 15 Jahren. Jungen sind etwas häufiger betroffen als Mädchen (1,3 : 1). Es wird ein Häufigkeitsgipfel im Alter von 2 – 4 Jahren beobachtet.⁽¹⁻³⁾ Mit Hilfe großer, multizentrischer Therapieoptimierungsstudien konnte die Prognose der Erkrankung über die letzten Jahrzehnte deutlich verbessert werden. Sodass die aktuelle Gesamtüberlebenschance bei 80 - 90% liegt.⁽³⁻⁵⁾ Dennoch erleiden weiterhin ca. 15-20% der Patienten ein Rezidiv der Erkrankung.⁽³⁾ Einen großen Anteil an der Verbesserung der Prognose im Rahmen der Therapieoptimierungsstudien erbringt eine verfeinerte Stratifizierung der Patienten in verschiedene Risikogruppen mit entsprechender Anpassung der Therapieintensität. Es geht hierbei sowohl darum Patienten zu identifizieren, welche zur langfristigen Kontrolle der Leukämie eine intensivere Behandlung benötigen (z.B. Stammzelltransplantation), als auch Patienten mit einer eher günstigen Prognose vor (teils schwerwiegenden) Komplikationen durch unnötig intensive Therapie zu schützen. Neben genetischen Risikofaktoren und beschreibenden Charakteristika der Leukämie bei Erstdiagnose oder Rezidiv wird hierzu insbesondere die verlässliche Quantifizierung der Minimalen Resterkrankung (MRD) im Therapieverlauf herangezogen.^(6,7)

3.2 Risikostratifizierung im ALL Rezidiv

Zur Risikostratifizierung im Falle eines Rezidivs werden sowohl der Immunphänotyp als auch der Zeitpunkt und der Ort des Rezidivs herangezogen.

Beim Immunphänotyp werden Rezidive der B- und T-Zellreihe unterschieden. Die Bestimmung erfolgt anhand der Kriterien der EGIL (European Group for Immunological Characterization of Leukemias).⁽⁸⁾ Der Immunphänotyp im Rezidiv ist in der Regel übereinstimmend mit dem bei Erstdiagnose. Abweichungen werden jedoch gelegentlich beobachtet.^(1,9) Während die weitere Risikostratifizierung bei B-Vorläufer Leukämien vom Ort und Zeitpunkt des Rezidivs abhängt, werden alle Rezidive der T-Zellreihe mit Knochenmarkbeteiligung aufgrund ihres aggressiveren Verlaufs der Hochrisikogruppe zugeordnet.⁽¹⁰⁻¹³⁾

Der Zeitpunkt des Rezidivs wurde und wird in nationalen (*ALL-REZ BFM*) und internationalen (*IntReALL SR 2010, IntReALL HR 2010*) Studien zur Behandlung von Kindern/Jugendlichen mit einem ALL-Rezidiv in *sehr früh*, *früh* und *spät* unterteilt. Alle Rezidive, die innerhalb von 18 Monaten nach initialer Diagnose auftreten werden als *sehr früh* definiert. Rezidive mit mindestens 6 Monaten Latenz zum Ende der Erstlinientherapie werden als *spät* klassifiziert. *Frühe* Rezidive, sind demnach alle Rezidive zwischen 18 und 30 Monaten nach initialer

Diagnose.⁽¹³⁾ (Die Dauer der Erstlinientherapie beträgt zwei Jahre, ca. 6-8 Monate intensive Chemotherapie gefolgt von einer oralen Erhaltungstherapie bis zum Abschluss von 2 Jahren nach Diagnosestellung. Ausgenommen sind Patienten, die bereits in der Erstlinientherapie eine Stammzelltransplantation benötigen.)

Als dritter Faktor wird der Ort des Rezidivs herangezogen. Hier wird zwischen isolierten Knochenmarkrezidiven, isoliert extramedullären Rezidiven und kombinierten Rezidiven unterschieden. Für die Diagnose eines isoliert extramedullären Rezidivs dürfen, neben dem Nachweis von Leukämiezellen in einem extramedullären Kompartiment (am häufigsten ZNS oder Hoden), im Knochenmark nur weniger als 5% Blasten nachweisbar sein. Ein kombiniertes Rezidiv liegt vor, wenn neben der Beteiligung eines extramedullären Kompartiments eine Knochenmarkbeteiligung von $\geq 5\%$ vorliegt.^(11, 13) In Tabelle 1 ist die entsprechende Einteilung nach Risikogruppen dargestellt.

Tabelle 1: Risikostratifizierung im Rezidiv gemäß der ALL-REZ BFM Studiengruppe

Zeitpunkt	B-Vorläuferzell			T-Zell		
	IEM	kombiniert	KM	IEM	kombiniert	KM
sehr früh	IR	HR	HR	IR	HR	HR
früh	IR	IR	HR	IR	HR	HR
spät	SR	IR	IR	SR	HR	HR

KM – Knochenmark; IEM - isoliert extramedullär; SR - Standard Risiko ; IR - Intermediäres Risiko; HR - Hochrisiko

Während alle Patienten der Hochrisikogruppe nach Erreichen einer 2. Remission einer allogenen Stammzelltransplantation zum Remissionserhalt unterzogen werden, richtet sich die Transplantationsindikation bei Patienten der intermediären Risikogruppe seit der ALL-REZ BFM 2002 Studie und in allen Folgestudien bzw. Registern (*IntReALL SR 2010*, *ALL-REZ BFM Register*) nach dem Ansprechen auf die Induktionstherapie gemessen am Nachweis von residuellen Leukämiezellen auf MRD-Niveau.⁽¹⁴⁾ Hiermit konnte insbesondere das ereignisfreie Überleben nach 8 Jahren von Patienten mit Rezidiv einer ALL und unzureichendem Ansprechen auf die Induktionstherapie von 18% auf 64% verbessert werden.⁽¹⁵⁾

3.3 Minimale Resterkrankung

Der technologische und klinische Goldstandard zur MRD-Quantifizierung im Therapieverlauf basiert auf dem Nachweis von klonalen Immunglobulin (Ig) und T-Zell Rezeptor (TCR) Genumlagerungen in den Leukämiezellen mittels quantitativer Real-Time-PCR.⁽¹⁶⁾ Diese Genumlagerungen, haben den Vorteil patienten- und leukämiespezifisch zu sein. Dennoch können sie durch andauernde Umlagerungsprozesse im Verlauf der Therapie oder zwischen

Ersterkrankung und Rezidiv bzw. Folgerezidiven verloren gehen.⁽¹⁷⁻²⁰⁾ Das Vorhandensein (bzw. die Entstehung) von verschiedenen Subklonen mit jeweils individuellen Genumlagerungen schon bei Diagnose oder deren Selektion im weiteren Verlauf der Therapie durch unterschiedlich schnelles Ansprechen durch eventuelle Resistenzmechanismen trägt hier ebenso zur Komplexität bei und verdeutlicht die Dynamik der Situation.^(21,22) Aus diesem Grund werden zur Erhöhung der diagnostischen Sicherheit und zur Vermeidung falsch negativer Ergebnisse jeweils mindestens zwei sensitive und spezifische Marker pro Patient gefordert.⁽¹⁶⁾ Zusätzlich muss mit den entsprechenden Markern eine Sensitivität von mindestens 10^{-4} erreicht werden. Dies entspricht dem Nachweis von einer Leukämiezelle auf 10.000 Gesamtzellen.⁽²³⁾ Auch wenn sich in der Mehrzahl der Patienten entsprechende sensitive Ig/TCR Marker zur Quantifizierung der minimalen Resterkrankung im Therapieverlauf etablieren lassen, ist dies jedoch in bis zu 21% nicht der Fall.⁽²⁴⁾ Für diese Patientin steht somit ein essenzieller Baustein in der Therapiesteuerung nicht zur Verfügung. Es kann auf alternative Verfahren zur Messung der minimalen Resterkrankung zurückgegriffen werden, beispielsweise auf durchflusszytometrische Verfahren, welche in den letzten Jahren durch technologische Fortschritte eine zunehmende Bedeutung in der Beurteilung des Ansprechens auf die Therapie erlangt haben.⁽²⁵⁾ Jedoch ist die Vergleichbarkeit bezüglich etablierter Schwellenwerte nicht in jedem Fall gegeben.

3.4 Das Fusionsgen *ETV6-RUNX1*

Die kryptische Translokation t(12;21), aus der das Fusionsgen *ETV6-RUNX1* (siehe Abbildung 1) resultiert, ist die häufigste genetische Aberration der ALL im Kindesalter. Sie tritt nur in B-Vorläuferzell Leukämien auf und lässt sich in etwa 20-25% der Patienten bei initialer Diagnose der ALL nachweisen.^(26, 27) Sie ist insgesamt mit einer eher günstigen Prognose assoziiert.^(26, 28) Dennoch treten auch hier bei einem Teil der Patienten Rezidive der Erkrankung auf, die Inzidenz im Rezidiv wird protokollabhängig etwas niedriger beschrieben als bei initialer Diagnose.^(11, 29-32) Rezidive in dieser Patientengruppe entstehen häufig spät (bis zu 10 Jahre nach Ersterkrankung) und sprechen für gewöhnlich erneut gut auf die Rezidiv-Chemotherapie an.^(30, 31, 33, 34)

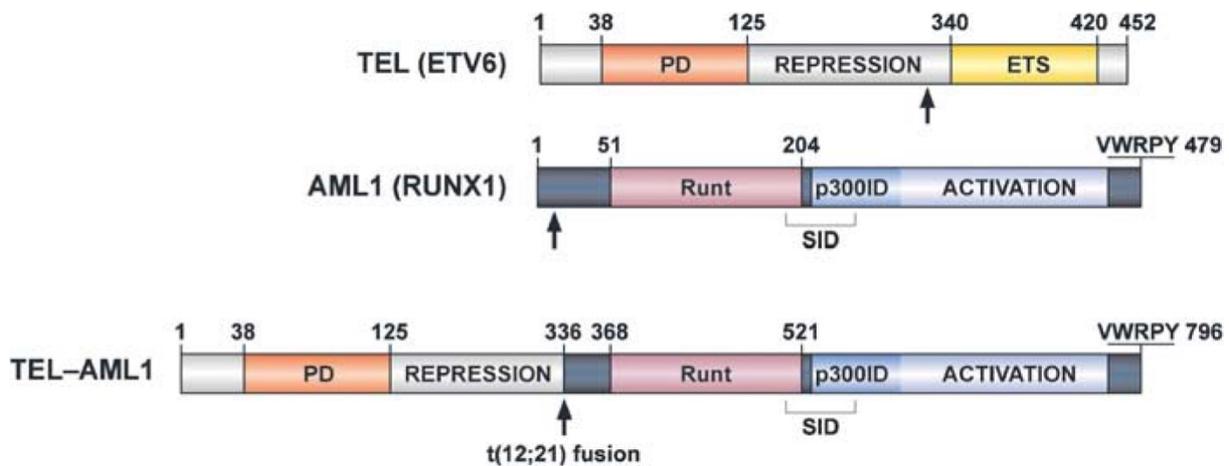


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Gene *ETV6* und *RUNX1* sowie des resultierenden Fusionsgens *ETV6-RUNX1* (ältere Gen-Bezeichnungen *TEL-AML1*). Das Fusionsgen umfasst die funktionellen Anteile des *RUNX1* Gens und die aminoterminal zur ETS Domain gelegenen Anteile des *ETV6* Gens. Abbildung entnommen aus ⁽³⁵⁾

Die Genfusion *ETV6-RUNX1* geht der Leukämieentstehung voraus, führt jedoch erst in Kombination mit später erworbenen Mutationen schlussendlich zur malignen Transformation der Zelle.⁽³⁵⁻³⁹⁾ Als häufigste Mutation wäre hier der Verlust des zweiten *ETV6*-Allels zu nennen.⁽⁴⁰⁾ Auf verschiedenen Wegen konnte gezeigt werden, dass die Entstehung einer prämaligen *ETV6-RUNX1* Vorläuferzelle der Leukämieentstehung um Jahre vorausgehen kann und dass die Vorläuferzellen bereits während der intrauterinen Entwicklung entstehen. So lässt sich oftmals in Guthrie-Karten, von Patienten, die im weiteren Verlauf eine *ETV6-RUNX1*-positive Leukämie entwickeln, bereits eine *ETV6-RUNX1* Fusion nachweisen.⁽⁴¹⁻⁴³⁾ Außerdem konnte in seltenen Fällen einer konkordanten Leukämie bei identischen Zwillingen der Nachweis übereinstimmender *ETV6-RUNX1* Bruchpunkte erfolgen, was für eine Entstehung und Übertragung in utero spricht.^(41, 44-46) Schon früh wurde der Verdacht geäußert, dass sich *ETV6-RUNX1* Fusionstranskripte im Nabelschnurblut gesunder Neugeborener mit einer Häufigkeit von ca. 1% nachweisen lassen.⁽⁴⁷⁾ Aufgrund widersprüchlicher Ergebnisse anderer Studien war dies These allerdings lang umstritten.^(48, 49) In neueren DNA basierten Studien konnte eine *ETV6-RUNX1* Fusion mit einer Häufigkeit von bis zu 5% im Nabelschnurblut gesunder Neonaten nachgewiesen werden.⁽⁵⁰⁾ Dies übersteigt die Prävalenz der *ETV6-RUNX1*-positiven Leukämie bis zu einem 500-fachen und legt den Schluss nahe, dass nur aus einem Bruchteil dieser prämaligen Vorläuferzellen tatsächliche Leukämien entstehen. Dies bestätigt zusätzlich die These, dass zur vollständigen malignen Transformation dieser Vorläuferzellen ein „second hit“ notwendig ist.^(39, 49)

Der Bruchpunkt der Translokation *t(12;21)* ist jeweils patientenspezifisch und es wird angenommen, dass er über den Therapieverlauf und bei Entstehung evtl. Folgerezidive stabil bleibt⁽⁵¹⁾, weshalb er sich hervorragend als Marker für die Messung der minimalen

Resterkrankung eignen würde. Allerdings besteht die Befürchtung, dass die Messung ggf. falsch positive Ergebnisse liefern könnte, wenn ein evtl. persistierender prä-leukämischer Klon durch die Quantifizierung miterfasst würde.^(52, 53)

Bei *BCR-ABL*-positiven Leukämien oder Leukämien mit *MLL*-Rearrangement wird oftmals das Fusionstranskript zur Quantifizierung der minimalen Resterkrankung genutzt und liefert bei diesen Formen der Leukämie gute Ergebnisse.⁽⁵⁴⁾ Ähnliche Versuche gab es in der Vergangenheit auch für *ETV6-RUNX1*, wobei diese Methode aktuell in der Routine-Diagnostik nicht eingesetzt wird.^(55, 56) Der Nachteil besteht hier insbesondere darin, dass RNA im Vergleich zu DNA weniger stabil ist und die Menge der RNA Transkripte pro Zelle zwischen Patienten oder unterschiedlichen Subklonen variieren kann. Außerdem können sich weitere Abweichungen in der RNA Expression im Therapieverlauf ergeben. Somit liefert diese Methode weniger robuste Ergebnisse zur Verlaufsbeurteilung.

Die, für die Rekombination der Ig- und TCR, verantwortlichen Enzyme (*RAG1* und *RAG2*), zeigen bei *ETV6-RUNX1* positiven Leukämien oftmals eine gesteigerte Aktivität.^(57, 58) Hierdurch stehen bei diesen Patienten häufig eine Vielzahl an MRD-Markern zur Verfügung. Allerdings steigt hiermit zum einen das Risiko für den Verlust eines Markers aufgrund von voranschreitender Rekombination, zum anderen finden sich häufig MRD-Marker, die nur in einem gewissen Subklon der Leukämie nachweisbar sind oder es liegt Oligoklonalität vor.^(18, 58, 59) Eine eindeutige Aussage welchen prozentualen Anteil ein MRD-Marker an der Gesamtheit der Leukämie bei Diagnose ausmacht, war in der Vergangenheit nicht möglich. Dies kann jedoch zur Über- oder Unterschätzung des verwendeten Markers führen, beispielsweise durch unterschiedlich schnelles Ansprechen eines Subklons auf die durchgeführte Therapie. Aktuellere Methoden, wie *Next Generation Sequencing*, die inzwischen standardisiert in vielen MRD-Laboren zur Identifizierung der Ig/TCR Genrearrangements bei Diagnose eingesetzt wird, kann zur Quantifizierung der Indexklone und somit Erkennung von Suklonen bei Diagnose eingesetzt werden.^(60, 61)

3.5 Ziel der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit war die Überprüfung, ob sich der patientenspezifische Bruchpunkt des Fusionsgens *ETV6-RUNX1* in einem gleich behandelten Patienten-Kollektiv mit Rezidiv einer *ETV6-RUNX1*-positiven ALL als spezifischer und sensitiver Marker zur Beurteilung des Ansprechens auf die Therapie eignet. Außerdem sollte geprüft werden, ob der genomische Bruchpunkt des *ETV6-RUNX1* Fusionsgen über die Behandlung und Erkrankungsstadien stabil ist. Darüber hinaus ergab sich die Frage, ob ein Nachweis von präleukämischen Vorläuferzellen zu falsch positiven MRD Befunden führen könnte. Nicht zuletzt sollte die

Stabilität des Bruchpunkts im Krankheitsverlauf (von Ersterkrankung bis zu evtl. Folgerezidiven) bestätigt werden.

4 Methoden

4.1 Materialien und Geräte

Bovine Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
DMSO (Dimethylsulphoxide)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Ficoll (Separating Solution)	Biochrom AG Seromed®, Berlin, Deutschland
PBS-Dulbecco (1x), w/o Ca ²⁺ , Mg ²⁺	Biochrom AG Seromed®, Berlin, Deutschland
RPMI 1649 Medium w 20 mM HEPES, w stable Glutamine	Biochrom AG Seromed®, Berlin, Deutschland
Puregene™ DNA-Isolierungskit	Biozym Diagnostics GmbH, Oldendorf, Deutschland
Wasser, HPLC gereinigt	Merck, Eurolab GmbH, Darmstadt, Deutschland
dNTP Set 100 mM	Invitrogen™ Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland
MgCl ₂ 50 mM	Invitrogen™ Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland
PCR Puffer (ohne MgCl ₂)	Invitrogen™ Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland
PCR-Primer	TIB Molbiol, Berlin, Deutschland
TaqMan® Sonden	TIB Molbiol, Berlin, Deutschland
NanoDrop Mikrovolumen-Spektrophotometer	ThermoFisher Scientific
Zentrifuge Labofuge 400/ 400R	Heraeus, Instruments, Berlin, Deutschland
Zentrifuge Megafuge 1.0	Heraeus, Instruments, Berlin, Deutschland
LightCycler	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
StepOnePlus™	ThermoFisher Scientific, Schwerte, Deutschland

4.2 Patienten und Proben

Zwischen 2002 und 2013 wurden 104 Patienten mit einem Rezidiv einer *ETV6-RUNX1*-positivem ALL in der Therapieoptimierungsstudie *ALL-REZ BFM 2002* (n = 102) bzw. nach Abschluss dieser Studie nach dem *ALL-REZ BFM Registry*, welches dem Therapiearm A der *ALL-REZ BFM 2002* Studie gefolgt ist^(15, 62), eingeschlossen und behandelt. Die Durchführung der Studie erfolgte in Übereinstimmung mit der Deklaration von Helsinki und nach positivem Votum der zuständigen Ethikkommission. Von allen Patienten bzw. deren Sorgeberechtigten wurde eine schriftliche Einwilligung zur Studienteilnahme, pseudonymisierten Datenspeicherung und Materialverwendung eingeholt. Die Therapie erfolgte, stratifiziert nach Risikogruppen, gemäß des in Abbildung 2 dargestellten Schemas.

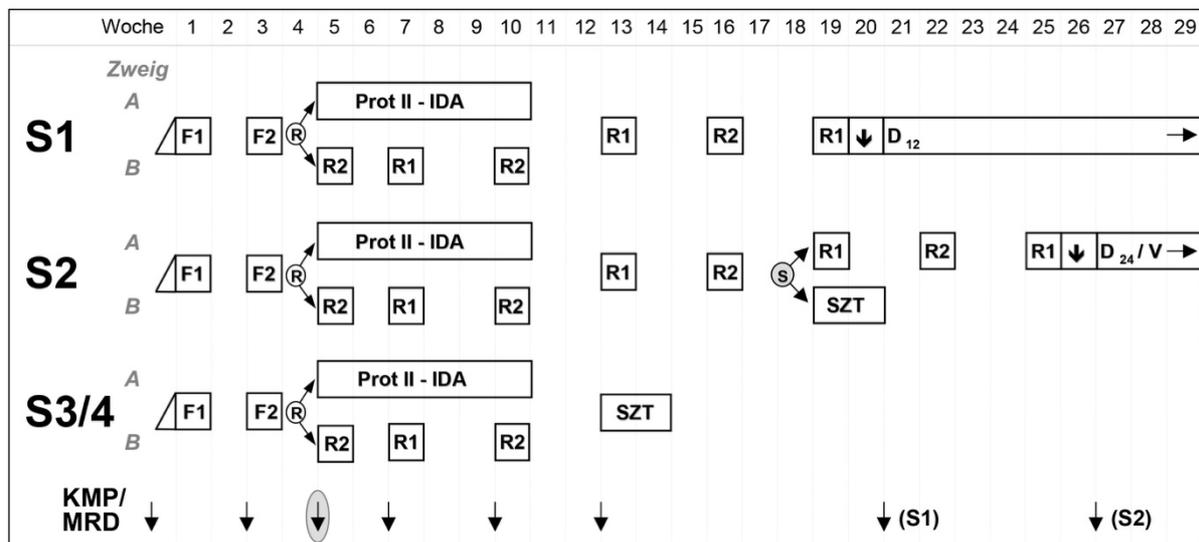


Abbildung 2: Therapieübersicht des ALL-REZ BFM 2002 Studienprotokolls. S1 Standardrisiko, S2 intermediäres Risiko, S3/4 Hochrisiko; Chemotherapieblöcke F1, F2, R1, R2, Prot II-IDA; D₁₂/D₂₄ Dauertherapie für 12 bzw. 24 Monate; SZT Stammzelltransplantation; R Randomisierung; ↓ Zeitpunkte für Knochenmarkspunktionen (KMP) und Messung der minimalen Resterkrankung (MRD), hervorgehoben ist der relevante Zeitpunkt zur MRD-Bestimmung nach Induktionstherapie zur Stratifizierung (S) in der S2 Gruppe. (aus dem Studienprotokoll der Therapieoptimierungsstudie *ALL-REZ BFM 2002* zur Behandlung von Kindern/Jugendlichen mit Rezidiv einer ALL)

Von allen Patienten, von denen sowohl von Rezidiv Diagnose (oder initialer Diagnose) und von mindestens einem Zeitpunkt während der Rezidivtherapie DNA (oder Zellen zur DNA-Isolation) in der *ALL-REZ* Biobank vorhanden waren, wurde DNA zur Sequenzierung des patientenspezifischen genomischen Bruchpunkts der *ETV6-RUNX1* Fusion bereitgestellt (n = 74). Verlaufskontrollen (Knochenmark und ggf. Blut) wurden zu definierten Zeitpunkten während der Therapie gewonnen. Bei IEM oder kombinierten Rezidiven stand ggf. Material aus dem extramedullärem Kompartiment bei Diagnose oder im Therapieverlauf zur Verfügung. Insgesamt konnten 401 Proben von Verlaufskontrollen im Therapieverlauf untersucht werden.

Hierbei handelte es sich um 299 Proben aus Knochenmark, 99 Kontrollen aus peripherem Blut. Zusätzlich standen zwei Proben aus Hodengewebe und eine Probe aus Liquor zur Verfügung. Von vier Patienten konnten zudem auch Proben eines Folgerezidivs untersucht werden (18 Proben).

4.3 Isolierung mononukleärer Zellen

Die Isolierung mononukleärer Zellen aus dem Knochenmark oder Blut erfolgte über das Prinzip der Dichtegradienten-Zentrifugation in einer isotonischen Lösung (Ficoll).^(63, 64) Hierbei wird das Knochenmark bzw. Blut zunächst entsprechend der Zellzahl (meist 1:3) mit RPMI verdünnt. Anschließend werden 5 ml dieser Lösung mit 4 ml Ficoll unter- oder überschichtet, dann erfolgt die Zentrifugation bei 2000 U/min über 18 min. Im Anschluss wird der entstandene Zellring vorsichtig abgenommen, mit 10 ml PBS aufgefüllt und erneut bei 1500 U/min für 10 min zentrifugiert. Danach wird der Überstand abgekippt und das Pellet aufgewirbelt. Dieser Schritt wird noch zweimal wiederholt. Abschließend werden die Zellen zur anschließenden DNA-Extraktion direkt in Lysepuffer gegeben oder zur weiteren Lagerung in DMSO (1:10) bei -80°C eingefroren und später in Flüssigstickstoff umgelagert.

4.4 DNA-Extraktion

Die angestrebte Zellzahl für die DNA-Extraktion beträgt in Abhängigkeit von der Isolationsmethode 4×10^6 (5×10^5 - 8×10^6) bzw. 8×10^6 (1×10^6 – 1×10^7). Die DNA-Extraktion der in dieser Studie untersuchten Proben erfolgte mit einem Säulen-basierten Kit von der Firma Machery-Nagel (Nucleo-Spin Tissue Kit) entsprechend der Vorgaben des Herstellers. Ältere Proben wurden mit dem Puregene™ DNA-Isolierungskit (Biozym Diagnostic GmbH) nach Herstellerangaben aufgearbeitet. Dieser basiert auf dem Prinzip der modifizierten Salzpräzipitation.

Die Konzentration und Reinheit der DNA wurde anschließend durch die Bestimmung der optischen Dichte (OD) mit einem Photometer (Nanodrop, ThermoFisher) beurteilt. DNA absorbiert bei einer Wellenlänge von 260 nm, während Verunreinigungen durch bspw. Proteine bei 280 nm absorbieren. Die Berechnung der DNA-Konzentration erfolgt durch das Photometer nach folgender Formel: Verdünnungsfaktor (in der Regel 1:40) x 50 µg/ml (1 OD von doppelsträngiger DNA = 50 µg/ml H₂O) x OD der gemessenen Probe (Einheit µg/ml bzw. ng/µl).

4.5 Identifizierung des genomischen Bruchpunkts der *ETV6-RUNX1* Fusion

Die chromosomalen Bruchereignisse der Translokation t(12;21) konzentrieren sich auf bestimmte Cluster Regionen (BCR). So treten die Bruchereignisse im *ETV6*-Gen nahezu ausschließlich in einem 15 Kilobasen (kb) umfassendem Abschnitt im Intron 5 auf. Die BCR im *RUNX1*-Gen erstreckt sich jedoch über einen deutlich längeren Abschnitt von 155 kb im Intron 1 und eine 5,5 kb Abschnitt im Intron 2.⁽⁶⁵⁻⁶⁷⁾ Die insgesamt sehr große BCR kann die Identifizierung und Sequenzierung der Bruchpunkte schwierig gestalten.

Zur Identifizierung der patientenspezifischen genomischen Bruchpunkte der *ETV6-RUNX1* Fusion wurde die Methode der Nested Multiplex Long-Range PCR verwendet.⁽⁶⁸⁾ Dieser Teil der Arbeit wurde im Rahmen einer Kooperation mit Prof. Dr. med. Markus Metzler an der Uniklinik Erlangen durchgeführt. Hierbei wird zunächst eine Long-Range PCR mit einem Forward-Primer (sense) im *ETV6*-Gen und einer Kombination von 8 (Intron 1) bis 10 (Intron 1 und 2) Reverse-Primern (antisense) im *RUNX1*-Gen durchgeführt. Es erfolgt anschließend eine Erfolgskontrolle mittels Gel-Elektrophorese. Im Falle einer erfolgreichen Amplifikation, wurde das gewonnene PCR-Produkts des ersten Laufs als Template für eine zweite Long-Range PCR mit jeweils einzelnen *RUNX1* antisense Primern verwendet. Abschließend erfolgte zur Kürzung des PCR-Produkts für die Sequenzierung nochmals eine PCR mit dem identifiziertem *RUNX1*-Primer und innenliegenden *ETV6*-Primern. Das kürzeste PCR-Produkt wurde schließlich direkt sequenziert (Sanger Sequenzierung).

Wenn das beschriebene Prozedere für einen Patienten nicht erfolgreich war, erfolgte analog der Versuch den Bruchpunkt des reziproken Fusionsgens *RUNX1-ETV6* zu identifizieren.

4.6 Quantifizierung der minimalen Resterkrankung unter Verwendung des genomischen Bruchpunkts der chromosomalen Translokation t(12;21)

4.6.1 Quantitative Real-Time PCR (RQ-PCR)

Als zentrale Methode zur Quantifizierung von Genabschnitten kam die quantitative Real-Time PCR zur Anwendung.^(16, 69) Hierbei wird eine mit Fluoreszenzfarbstoffen markierte TaqMan-Sonde (Hydrolisierungssonde) verwendet, um quantitative Aussagen über die eingesetzte Kopienzahl der amplifizierten Genabschnitts zu treffen. Man nutzt hierbei, dass die *Thermus aquaticus* (Taq) Polymerase neben der 3' → 5' Polymeraseaktivität eine 5' → 3' Exonukleaseaktivität aufweist. Trifft die Taq-Polymerase während der Elongations Phase auf die, zwischen dem Forward- und Reverse-Primer lokalisierte, Taq-Man Sonde, wird diese hydrolysiert. Dabei wird der Reporter Farbstoff (hier FAM (6-carboxy fluorescein)) am 5'-Ende

vom Quencher (Unterdrücker) Farbstoff (hier TAMRA (6-carboxytetramethyl rhodamine) oder BHQ-1 (*BlackHole Dark Quencher*)) am 3'-Ende getrennt und somit die Fluoreszenz des Reporter Farbstoffs freigesetzt. Die Fluoreszenz nimmt während der Amplifikation proportional zum entstehenden PCR-Produkt zu. Der C_t Wert (cycle threshold) beschreibt nach wie vielen PCR Zyklen das von der TaqMan® Sonde freigesetzte Fluoreszenzsignal das Hintergrundsignal überschreitet. Dies ist mit dem Übergang der PCR in die exponentielle Phase gleichzusetzen und direkt proportional zur Nukleinsäuremenge.

4.6.2 Etablierung der patientenspezifischen quantitativen Real-Time PCR

4.6.2.1 Primer und TaqMan® Sonden Design

Anhand der erhaltenen genomischen Bruchpunkte der *ETV6-RUNX1* Fusion wurden für jeden Patienten individuell Primer und TaqMan® Sonden für die Real-Time PCR designet und auf ihre Sensitivität und Spezifität hin getestet. Das Ziel war jeweils eine Sensitivität von mindestens 10^{-4} zu erreichen.

Die Primer wurden so gelegt, dass jeweils ein Primer im *ETV6*-Gen und der gegenläufige Primer im *RUNX1*-Gen lokalisiert waren. Die Primer sollten einen Abschnitt von etwa 150 – 250 Basenpaaren (bp) umfassen. Es wurde eine Schmelztemperatur von 60-65°C anvisiert bei einer Primer Länge von sequenzabhängig ca. 20 bp. Für die Berechnung der Schmelztemperatur wurde die Webseite des Herstellers TIB Molbiol Berlin (www.tib-molbiol.de) genutzt. Die Sequenz der Primer sollte zur optimalen Spezifität eine möglichst abwechslungsreiche Basenabfolge ohne hoch repetitive Elemente beinhalten. Für die TaqMan® Sonde wurde eine Lokalisation innerhalb der beiden Primer gewählt. Hierbei wurden die besten Ergebnisse hinsichtlich Sensitivität und vor allem Spezifität erzielt, wenn die TaqMan® Sonde möglichst direkt über dem spezifischen Bruchpunkt platziert wurde. Es wurde eine Länge der TaqMan® Sonde von ca. 25 -30 bp und eine Schmelztemperatur ca. 5°C über der gewählten Primer Kombination anvisiert. Bei den Sonden musste zusätzlich darauf geachtet werden, dass die Sequenz am 5' Ende nicht auf G (Guanin) endete, da dieses die Fluoreszenz des Farbstoffs unterdrücken würde. In Abbildung 3 sind beispielhaft drei Bruchpunktsequenzen dargestellt.

Proben # 8892*RUNX1/ETV6* (der21)

TTAAGCTCCACTACTTTCTTGCCCTTGTGATCTTGGGCAAATTAACCACCTCTCAGCCTCAGTTTTCTGATCTGTAAAACAGG
 GCTCTATCTAATGTATAGAAGTGTGCAGATGAAGTGGGGTAAGAAATGCAAGAGCACTATGTAAGTGAATGTGAGACCTCA
 CCAATGTGCCTTTCTCCTGGGGACATCAGAGACCCACAGGAGGGGACTGCTCCATCGAGACCGCCCTGGGATGTGGCTGGC
 ACATAGCCATCCCTGTCTGGCATGCAGCAGTGAGAAGAAAGGAAATTCAGTAGGTGGTTGACAGTTTAAATACAAATCAC
 AAATGACATCTTTTTAAATATAACAAGTAGCTTATTTTTAAAGGTGCACCTACTTTGCAAAGTATAAGGAGAACTGTTAT
 TAAGAATTTACCAGGTTGGAATGGCTAGTGTATGGGAGAGAGTTTAGCACAAGACGGAGTGAGACAAGATTGCTGGGGT
 CTTATTTTGAATCCAGCAGCCAACGCTGTATGGAATAGTGAAAAAGTTGCCCTCTTTCTGTGCTTGTTTTCTACTTGGTATC
 TTTAAGAATGGGCTATTTAGGAGCAAGGAGCCTAGCAGAAAGCATCTGTCAATCTTCTAAAACCTTACCTACAAAAGTTTT
 ACTGGCTTGTGTCCCA

Proben # 10728*ETV6/RUNX1* (der12)

ACTTTCTCTCCCTCCCATATCACTAATAATAATCCGTAAAGTAAGTGCTGTTATTTCCCACTTCATAAGTGAGGCAA
 CAGAACCCTCAGGAAGGTTAAGAAGCGTGTCCAGGGTGGCCCAACTGAATCCCCCTTGTAATATATCCCCAGAGAAGGGT
 GTATGTTTCTCTGCAATGCGGATGTGTGGCTTACAGAGCCTACTATGTGGCAGGCCCTCTGTCTATACTAACAGTACCAT
 TAATGTGCTCTAAAATATTCATTGTATGGTGTCTGCGCTTGCAAGCTTCCATCCATGTCCAAAGTAAATGGCAAATTCGA
 GGCAAGGGAACCTTATTGAATTCAGAGTCTGAATATACAGGTAAGTCATCTATAGTCAAAGGAAAAGGCTCAGGAGAAATG
 AGTAGCCCCCTGCATCCACCCAAGGCCAGAGGAGAAGAAAACCGTTTTTGACCCAGGGCACTTGCATGGCACTCACCA

Proben # 17138*ETV6/RUNX1* (der12)

TGTGAAGGGATTGCATGAAAGTGCTGGGGCAAGTCTCAGCCCTCGGCCCTTGTGGAAGGTGTGGGGTGTGCAGACACAT
 GTGCACCTTCGCACACATGCATCTGTGCATAAATATCTGTGTTGCAGGAAAGAAAAGATAGGGTGTGGGATGTCCCCAG
 AAGCCACAGGGATTCCAGTGTTTTAGTACCAGGTGAAAGAGCCGCTTCTCCACACTATCTCAGGGAGATGCCCTTCTGT
 AGACCTCTGTAGCCAGTACCCTCAAGAGCTCCTGGAGACAGATGGCCCCGAACAGTCTTAGGGAAGCAGTTTGGCATCGG
 TTTGGAAATGTTGAGCTCAGATCCAATCACTACTCATCTGTTTATATCCTATCTGTCATCACACATGTCTGTATATCTGGA
 AACAAATTACGTGACTGATCCGGAGTTTTCAGGTATGCATCAGATGTGTGCTTCCAAATGCCTGCATCTCAAAGACTAGGAA
 GGCAATGGGAACAGTCTCTGAGGGTGTAAAAGAGGGACCCAGGCTGGGGCAATGGGACTGAGGGGACTATATAGATGAG
 TCTTCTCT

Abbildung 3: Repräsentative Beispiele für die Lokalisation von *forward* Primer, TaqMan-Sonde und *reverse* Primer über den genomischen Bruchpunkten der *ETV6-RUNX1* Fusion. Dargestellt sind die Sequenzen von drei patientenspezifischen Bruchpunktregionen der *ETV6-RUNX1* Fusion. *Forward* und *reverse* Primer sind durch unterstrichende Sequenzen markiert, TaqMan® Sonden wurden fett gedruckt und mit einer gestrichelten Linie hervorgehoben.

4.6.2.2 Test der Spezifität

Der erhaltenen Primer und TaqMan® Sonden Kombinationen wurden anschließend zunächst auf ihre Spezifität getestet. Hierzu wurden 100 ng Diagnose DNA eingesetzt. Als Negativkontrolle wurde DNA von mononukleären Zellen aus dem Blut gesunder Spender ($n \geq 10$) gepoolt (als *buffy coat* (BC) bezeichnet) in gleicher Menge eingesetzt. Es wurden jeweils drei Negativkontrollen angesetzt. Zusätzlich wurde zur Kontrolle auf Verunreinigungen immer eine Kontrolle mit Wasser statt DNA mitgeführt.

Für die Durchführung der Real-Time PCR wurde entweder das LightCycler System (Roche Diagnostics) oder das StepOnePlus™ Real-Time PCR System (ThermoFisher Scientific) verwendet.

Die Primer wurden als spezifisch gewertet, wenn der Ct-Wert des Fluoreszenzsignals der Leukämiezell-DNA zwischen 23 und 28 Zyklen lag und für den Fall eines positiven Signals im BC, dieser mindestens 3 Zyklen Abstand zum Ct-Wert der Patienten-DNA aufwies.

Für den Fall, dass eine Amplifikation von Diagnose DNA mit der ausgewählten Kombination nicht erfolgreich war oder eine Amplifikation in einer Negativkontrolle auffiel, erfolgte zunächst ein Neudesign der Primer (mit gleicher TaqMan® Sonde). Bei einem späten, unspezifischen Signal im BC mit ausreichendem Abstand zum Signal in der Positivkontrolle konnte ggf. dennoch eine Testung der Sensitivität erfolgen. Konnte auch mit erneutem Primer-Design keine spezifische DNA-Amplifikation erreicht werden, wurde auf den Bruchpunkt des reziproken Fusionsgens *RUNX1-ETV6* zurückgegriffen (wenn verfügbar) und eine neue Primer/ TaqMan® Sonden Kombination designt.

4.6.2.3 Bestimmung und Optimierung der Sensitivität

Die Sensitivität wurde anhand einer Verdünnungsreihe von DNA vom Zeitpunkt der Diagnose in BC bestimmt. Hierzu erfolgte eine Verdünnung in 5 Log-Stufen (von 10^{-1} bis 10^{-5}). Jeder Verdünnungsschritt wurde in Doppelbestimmung angesetzt. Insgesamt wurden je Verdünnungsschritt 670 ng DNA eingesetzt (entsprechend dem DNA Gehalt von 100.000 Zellen bei 6,7pg DNA pro Zelle). Zusätzlich wurden jeweils zwei Negativkontrollen aus BC und eine Negativkontrolle mit Wasser mitgeführt. Die Zusammensetzung eines PCR-Ansatz in Tabelle 2 dargestellt.

Tabelle 2: Zusammensetzung der PCR für 20 µl Ansatz

Bestandteil, Konzentration	Eingesetztes Volumen (auf 20 µl Endvolumen)	Finale Konzentration im Ansatz
Forward Primer 10 µM	1 µl	500 nM
Reverse Primer 10 µM	1 µl	500 nM
TaqMan Sonde 10 µM	0,2 µl	100 nM
Platinum Taq-Polymerase 5 U/µl	0,2 µl	1 U
dNTPs 2 nM	2 µl	0,2 nM
PCR-Puffer ohne MgCl ₂ (10x)	2 µl	1x
MgCl ₂ 50 mM	2 µl	5 mM
BSA 10 µg/µl	0,5 µl	250 ng/µl
Wasser	4,4 µl	-
DNA 100 ng/µl	6,7 µl	-

Der letzte Verdünnungsschritt, bei dem noch ein Fluoreszenzsignal oberhalb der Hintergrundaktivität detektiert werden kann, beschreibt die Sensitivität des Tests. Allerdings muss im Falle eines positiven Signals in der Negativkontrolle (BC) ein Mindestabstand von $\geq 1 C_t$ zum höchsten C_t im BC bestehen.

Folgende Bedingung für die Real-Time PCR wurden angewendet:

1. Initiale Denaturierung bei 94°C für 10 min
2. 50 Zyklen: Denaturierung bei 94°C für 20 s und Annealing/Elongation bei 60 – 69°C für 23s.
3. Abkühlen

Zur Optimierung des Assays bei unzureichender Sensitivität des wurde nach folgendem Stufenschema sukzessive vorgegangen:

1. Steigerung der Annealing-Temperatur – initial Beginn mit 60°C, dann schrittweise Steigerung auf 63°C, 65°C, 67°C bis max. 69°C
2. Steigerung der MgCl₂ Konzentration (maximal Verdopplung), insbesondere bei flachen Kurven mit unzureichendem Übergang in die exponentielle Phase der PCR
3. Verdopplung der Annealing-/Denaturierungszeiten der PCR Zyklen (40 s/46 s)

4.6.3 Quantifizierung der Verlaufskontrollen

Nach erfolgreicher Etablierung der PCR mit dem gewünschten Sensitivitätsniveau erfolgte die MRD-Quantifizierung für allen Proben aus Verlaufskontrollen während der Therapie, für die noch eine ausreichende Menge DNA verfügbar war. Bei unzureichender Materialverfügbarkeit wurden die Verlaufskontrollen in Ausnahmefällen 1:10 verdünnt eingesetzt. Wobei hier jedoch zu beachten ist, dass durch die zusätzliche Verdünnung ggf. niedrig positive Ergebnisse nicht detektiert werden können. Zeitpunkte, für die kein Material mehr verfügbar war, wurden nicht berücksichtigt. Zur Quantifizierung wurde erneut eine Verdünnungsreihe in Zehnerpotenzen von 10^{-1} – 10^{-5} in BC angesetzt. Zur genaueren Quantifizierung wurde jeweils ein zusätzlicher Verdünnungsschritt in Höhe einer halben Log-Stufe bei 5×10^{-4} mit angesetzt. Jede Verlaufskontrolle wurde in Dreifachbestimmung gemessen, die jeweiligen Verdünnungsschritte der Standardreihe wurden bis zum Verdünnungsschritt 10^{-2} in Doppelbestimmung gemessen. Alle folgenden Verdünnungsschritte der Standardreihe wurden ebenfalls in Dreifachbestimmung gemessen. Es wurden erneut sechs Negativkontrollen aus BC mit angesetzt. Zusätzlich eine Negativkontrolle mit Wasser.

Um für Schwankungen in der eingesetzten Quantität und Qualität (Amplifizierbarkeit) der DNA zu korrigieren, erfolgte die Normalisierung mittels eines Referenzgens. Hierfür verwendeten

wir β -Globin, welches als einfaches Gen (single copy gene) in allen Zellen vorkommt. Für die β -Globin Verdünnungsreihe wurde BC-DNA in Zehnerpotenzen in Wasser verdünnt. Durch die Bestimmung von der Häufigkeit/Amplifizierbarkeit von β -Globin in einem PCR-Ansatz mit der gleichen Menge DNA wie in der klonspezifischen PCR kann die genau eingesetzte DNA-Menge berechnet werden.⁽⁷⁰⁾

4.7 Quantitative Auswertung

Zur abschließenden quantitativen Auswertung und Berechnung wurden die Euro-MRD Leitlinien angewandt.⁽²³⁾

Zur quantitativen Auswertung wird die Standardkurve gebildet indem die C_t Werte jedes Punkts der Standardreihe in einem Diagramm auf der y-Achse gegen den logarithmischen Wert des Verdünnungsschritts auf der x-Achse aufgetragen werden. Der negative Anstieg der sich hieraus ergebenden Gerade beschreibt die Effizienz der PCR. Als optimal wird ein Anstieg von -3,3 angesehen.

Die Sensitivität der PCR beschreibt den niedrigsten Verdünnungsschritt, bei dem noch ein Fluoreszenzsignal detektiert werden kann. Der quantifizierbare Bereich (*quantitative range*) beschreibt derweil bis zu welchem Verdünnungsschritt der Standardreihe eine reproduzierbare und akkurate MRD-Quantifizierung möglich ist. Nur bis zu diesem Wert kann ein quantitatives Ergebnis verlässlich bestimmt werden. Positive Proben unterhalb des Grenzwertes des quantitativen Bereichs werden als „positiv, nicht quantifizierbar“ bewertet.

Es werden folgende Kriterien zur Bestimmung des quantitativen Bereichs herangezogen:

1. Die Abweichung der C_t Werte eines Verdünnungsschritts der Standardreihe muss $\leq 1,5$ sein.
2. Der Abstand des letzten Verdünnungsschritts zum Hintergrund muss $> 3 C_t$ sein.
3. Der Abstand zwischen zwei Verdünnungsschritten sollte bei 10-fach Verdünnung $2,6 - 4 C_t$ und für 2-fach Verdünnungen $0,5 - 1,5 C_t$ betragen.

Die hieraus resultierende Standardkurve sollte einen Anstieg zwischen -3,1 und -3,9 aufweisen mit einem Regressionskoeffizienten von $\geq 0,98$. Zudem sollte sie mindestens zwei log-Stufen und drei Punkte (Verdünnungsschritte) umfassen.

Mit Hilfe der Gleichung für die Gerade der Standardkurve kann aus den gemessenen C_t Werten der Verlaufskontrollen (bzw. aus dem Mittelwert der drei Replikate) die ursprünglich eingesetzte Leukämiezellzahl berechnet werden.

Zur Normalisierung wird, die mittels Bruchpunkt-spezifischer RQ-PCR ermittelte Leukämiezellzahl, nach Dreisatz mit 100.000 multipliziert und durch die Anzahl der tatsächlich eingesetzten Zellen, gemessen mittels β -Globin, dividiert.

Als Vergleich wurden für alle Patienten die Ergebnisse herangezogen, die mit den etablierten Ig/TCR Markern aus der Routinediagnostik erzielt wurden. Die Identifizierung und die PCR-Optimierung für die spezifischen Ig/TCR Marker erfolgte gemäß vorbeschriebener Abläufe und Standards.^(16, 71, 72) Zur quantitativen Auswertung wurden die gleichen Leitlinien gemäß Euro-MRD herangezogen.⁽²³⁾ In Abbildung 4 ist exemplarisch eine Standardreihe für ein patientenspezifisches *ETV6-RUNX1* Assay und die resultierende Standardkurve dargestellt.

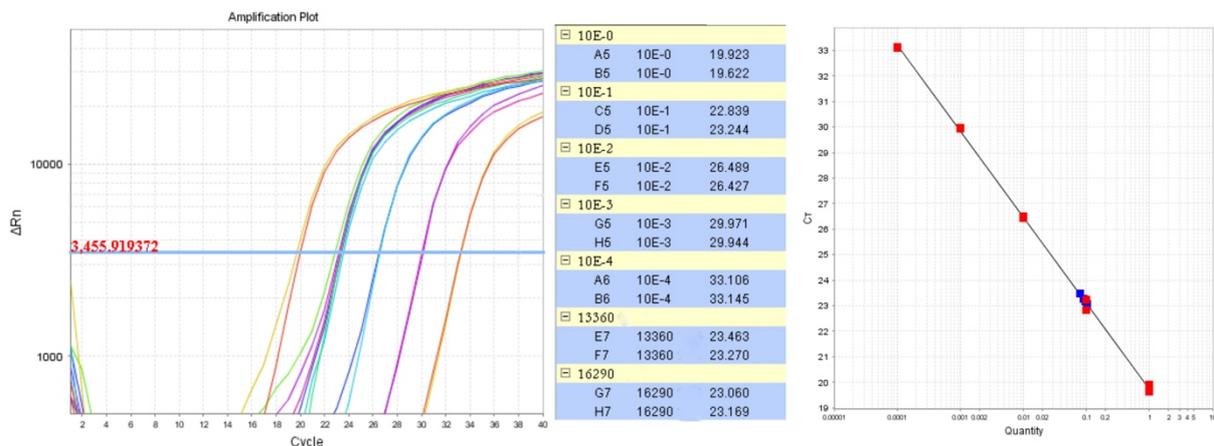


Abbildung 4: Exemplarische Darstellung einer Verdünnungsreihe und Standardkurve für ein patientenspezifisches *ETV6-RUNX1* Fusionsgen-Assay. Die Standardreihe beginnt mit der unverdünnten DNA bis zu einer Konzentration von 10^{-4} und mit zwei MRD- Proben, welche etwa ein Signal beim Verdünnungsschritt 10^{-1} zeigen, sowie zugehöriger Standardkurve (Slope -3,36; Regressionskoeffizient R 0,99). Darstellung wie im Analyse Modul von StepOnePlus™.

4.8 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit der SPSS-Software (SPSS Inc. Chicago, USA, Version 19.0). Zur Repräsentativitätsanalyse wurden der Chi-Quadrat-Test oder der Fisher's Exact Test verwendet. Diese überprüfen ob sich die Verteilung einer Variablen in zwei Stichproben signifikant unterscheidet.

Um eine abschließende statistische Auswertung der MRD-Ergebnisse zu ermöglichen wurden alle negativen Ergebnisse numerisch auf 10^{-8} festgesetzt und für sämtliche positiven Ergebnisse außerhalb des quantifizierbaren Bereichs wurde 10^{-6} herangezogen.

Es wurde nur Abweichungen $> \frac{1}{2}$ log-Stufe zwischen den Markern als relevante Abweichung gezählt, da dies dem normalen Schwankungsbereich der Real-Time PCR entspricht. Wenn sich Differenzen durch unterschiedliche Sensitivität oder quantitativen Range der Marker erklären ließen, wurden sie ebenso nicht als echte Unterschiede bewertet. Wenn ein Marker ein niedrig positives, aber nicht quantifizierbares Ergebnis lieferte während ein anderer ein

negatives Ergebnis erbrachte, wurde dies nur als Unterschied gewertet, wenn alle drei Replikate positiv waren und das Ergebnis erneut nicht durch unterschiedliche Sensitivitäten der Marker erklärbar war.

Zur Überprüfung der Korrelation zwischen den quantitativen Ergebnissen gemessen anhand des Fusionsgens *ETV6-RUNX1* und den klassischen Ig/TCR Markern wurde der Korrelationskoeffizient nach Spearman verwendet. Dieser untersucht den monotonen Zusammenhang zwischen zwei stetigen oder ordinal skalierten Variablen. Zusätzlich zur grafischen Darstellung im Punktediagramm, erfolgte die Darstellung mittels Bland-Altman-Plot. Hierzu wurde die GraphPad Prism Software (GraphPad Software Inc. California, USA, Version 6.00) verwendet. Der Bland-Altman-Plot eignet sich besonders zum Vergleich von zwei Messmethoden, da er systematische Unterschiede/Fehler sichtbar machen kann. Hierzu wird der Mittelwert aller Messwerte $((A+B)/2)$ auf der X-Achse aufgetragen und die Differenz beider Messwerte $(A-B)$ auf der Y-Achse.

5 Neue Ergebnisse

5.1 Auswahl und Repräsentativität der 52 Patienten

Von 82 Patienten konnte DNA zur Identifizierung des Bruchpunkts der genomischen Translokation t(12;21) bereitgestellt werden. Wobei jedoch nur für 74 Proben die DNA-Qualität als ausreichend für die Long-Range RCR eingeschätzt wurde. Hiervon konnte für 57 Patienten ein Bruchpunkt identifiziert werden (77%). Für drei Patienten ließ sich mit verschiedenen Primer Kombinationen keine bzw. keine spezifische Amplifikation erreichen, sodass Korrektheit der übermittelten Sequenz in Frage zu stellen ist. Hier kommen beispielsweise Proben Verwechslungen in Frage. Für einen Patienten konnte die RQ-PCR nicht die geforderte Qualität erreichen. Dieses Vorgehen ist in der *Figure S1 (supporting information)* dargestellt.

Mit dem im Abschnitt 4.6.2.3 dargestellten Procedere zur Optimierung der Sensitivität der RQ-PCR konnte für die weiteren 53 Patienten eine Sensitivität von mindestens 10^{-4} unter Verwendung der genomischen *ETV6-RUNX1* Fusion erzielt werden. Ein Patient musste aufgrund fehlender Ig/TCR Marker zum Vergleich von der weiteren Analyse ausgeschlossen werden.

Die eingeschlossenen 52 Patienten sind anhand der Charakteristika ihrer Erkrankung repräsentativ für das Gesamtkollektiv (siehe *Supplemental Table S1*).

5.2 Der genomische Bruchpunkt der *ETV6-RUNX1* Fusion als MRD-Marker

Für alle 52 eingeschlossenen Patienten konnte unter Verwendung des genomischen Bruchpunkts der *ETV6-RUNX1* Fusion eine RQ-PCR mit einer Sensitivität von 10^{-4} erreicht werden. In nahezu der Hälfte der Fälle (24/52, 46%), konnte sogar eine Sensitivität von 10^{-5} erzielt werden. Im Vergleich erreichten nur 76% (106/140) der Ig/TCR Marker eine Sensitivität von 10^{-4} , bzw. 31/140 Markern (22%) eine Sensitivität von 10^{-5} . Ebenso konnte in 73% (38/52) ein quantitativer Bereich von mindestens 10^{-4} erreicht werden, wobei dieser für Ig/TCR Marker nur bei 47% lag. Diese Ergebnisse sind in der *Figure 1* des Manuskripts dargestellt. Hieran zeigt sich, dass die Verwendung des genomischen Bruchpunkts der *ETV6-RUNX1* Fusion in technischer Hinsicht dem Goldstandard nicht nur gleichwertig, sondern in Teilen sogar überlegen ist und somit einen sehr sensitiven und verlässlichen MRD-Marker für diese Patientengruppe darstellt.

Bisher konnte nur in Einzelfällen belegt, werden dass der Bruchpunkt der *ETV6-RUNX1* Fusion, wie angenommen zwischen Ersterkrankung und Rezidiv stabil bleibt. Wir konnten dies mit Material aus der Ersterkrankung für 30/52 Patienten aus unserer Kohorte bestätigen.

Darüber hinaus konnte wir die Stabilität des Bruchpunkts in weiteren Folgerezidiven für vier Patienten bestätigen. In zwei Fällen lagen im Folgerezidiv erneut Verlaufskontrollen zur MRD-Messung vor. Im Vergleich zeigte sich für die Ig/TCR Marker ein gemischtes Bild. Nur für einen kleinen Anteil zeigten sich alle Marker stabil zwischen Ersterkrankung und Rezidiv. Für die meisten Patienten zeigte sich ein Teil der Marker stabil, während im Rezidiv teils (zusätzlich) neue Marker gefunden wurden. In fast 14% wurden im Rezidiv ausschließlich andere Ig/TCR Marker gefunden.

In unseren Untersuchungen zeigte sich kein Hinweis auf persistierende falsch positive Ergebnisse durch den Nachweis eines eventuell persistierenden präleukämischen Klons, welcher die *ETV6-RUNX1* Fusion trägt.

5.3 Übereinstimmung der Methoden

Wir konnten zeigen, dass der genomische Bruchpunkt der Translokation t(12;21) als sensitiver und sehr spezifischer Marker für die MRD-Diagnostik geeignet ist und die Ergebnisse gut mit denen der herkömmlichen MRD-Marker korrelieren (Spearman Korrelationskoeffizient 0,85; $p < 0,1$). Aus 1038 Vergleichen (*ETV6-RUNX1* gegen jeden verfügbaren MRD-Marker des jeweiligen Patienten) konnte nur 72 relevante Unterschiede $> \frac{1}{2}$ Log-Stufe eruiert werden (6,9%). (*Figure 2 A, B*) In 76,4% (55/72) lieferte hierbei *ETV6-RUNX1* das höhere Ergebnis. Die beobachteten Abweichungen waren in ihrer Schwankungsbreite etwa vergleichbar mit den Abweichungen, welche auch Ig/TCR Marker untereinander zeigen (Spearman Korrelationskoeffizient 0,78; $p < 0,1$). (*Figure 2 E, F*) Insgesamt konnte beobachtet werden, dass die quantitativen Ergebnisse unter Verwendung des Bruchpunkts der *ETV6-RUNX1* Fusion die beste Korrelation mit dem jeweils höchsten Ig/TCR Marker der einzelnen Patienten aufweist (Spearman Korrelationskoeffizient 0,899; $p < 0,1$). In diesem Fall reduzierte sich die Anzahl der relevanten Unterschiede auf 23, da die meisten Unterschiede jeweils nur im Vergleich zu einem Ig/TCR Marker des Patienten auftraten, während die anderen Marker eine gute Übereinstimmung zeigten (*Figure 2 C, D*).

Bei Betrachtung auf Patientenebene fiel auf, dass die Mehrzahl der Unterschiede jeweils nur zu einem Zeitpunkt während der Therapie und im Vergleich zu einem Ig/TCR Marker auftrat, während weitere Marker eine gut Übereinstimmung zeigten. Nur in einer kleinen Untergruppe von Patienten konnte Unterschiede über einen längeren Zeitraum beobachtet werden. Hierzu gehörten beispielsweise zwei Patienten mit Verlust eines Ig/TCR Markers zu einem frühen Zeitpunkt in der Therapie (*Figure 4 B*). Auch ein unterschiedlich schnelles Ansprechen verschiedener Subklone auf die Therapie ließ sich erkennen (*Figure 4 E*).

5.4 Heterogenes Ansprechen

Bei Betrachtung der MRD-Kinetik in unserer Kohorte von 52 Patienten viel ein deutlich heterogenes Ansprechen auf die Rezidivtherapie auf. Eine Übersicht ist in *Figure 5* des Manuskripts dargestellt. Während 60% (25/42) der Patienten mit Knochenmarkbeteiligung bei Rezidivdiagnose ein gutes Ansprechen auf die Rezidivtherapie zeigten (MRD nach Induktionstherapie $< 10^{-3}$), wurde für die restlichen 40% bei unzureichendem Ansprechen diagnostiziert und die Indikation zur hämatopoetischen Stammzelltransplantation gestellt. Hiervon zeigten 5 Patienten (29%) anhaltend ein MRD-Niveau von $> 10^{-4}$.

Von den 5 eingeschlossenen Patienten mit isoliert extramedullärem Rezidiv zeigten zwei eine submikroskopische Knochenmarkbeteiligung $\geq 10^{-4}$ bei Rezidivdiagnose.

6 Klinische Anwendung

Schon heute ist die MRD-Diagnostik zu verschiedenen Zeitpunkten während der Therapie als wichtiges Mittel zur Risikostratifizierung aus der Therapie der kindlichen ALL nicht mehr wegzudenken. Mit zunehmenden Fortschritten in der Leukämietherapie und dem Wunsch, die Therapieintensität möglichst präzise auf die einzelnen Patienten zuzuschneiden, wächst die Bedeutung einer akkuraten und verlässlichen MRD-Diagnostik zunehmend.

Wir konnten zeigen, dass der genomische Bruchpunkt des Fusionsgens *ETV6-RUNX1* einen ausgesprochen sensitiven und stabilen Marker für die Quantifizierung der minimalen Resterkrankung in dieser Patientengruppe darstellt. Er kann im Therapieverlauf allein oder in Kombination mit Ig/TCR Markern angewendet werden. Der große Vorteil der Verwendung der genomischen Bruchpunkts der *ETV6-RUNX1* Fusion zum MRD-Monitoring besteht darin, dass er während des Krankheitsverlaufs oder bei evtl. Folgerezidiven stabil bleibt und somit im Gegensatz zu den Ig/TCR Markern kein Risiko eines Verlusts besteht. Außerdem erübrigt sich zeitaufwändiges und kostspieliges erneutes Screening nach MRD-Markern bei Rezidiven. Darüber hinaus ist vorstellbar, dass diese Methode in unklaren Fällen zur Bestätigung oder Ausschluss eines Rezidivs verwendet werden kann. Wobei bei Verwendung der vorausgegangenen Ig/TCR Marker ggf. falsch negative Ergebnisse durch den Verlust eines Markers nicht ausgeschlossen werden können.

Die Befürchtung, dass bei Verwendung des genomischen Bruchpunkts persistierende falsch positive Ergebnisse durch den Nachweis des evtl. überdauernden präleukämischen Klons auftreten, konnte in unseren Untersuchungen nicht bestätigt werden.

Von den untersuchten Patienten zeigte sich in einem Fall, dass einer der verwendeten Ig/TCR Marker früh in der Therapie und anhaltend negativ getestet wurde. Hier ist von einem Verlust des Markers durch fortschreitende Rearrangement-Prozesse auszugehen. Dies birgt das Risiko falsch negativer Ergebnisse in der MRD-Diagnostik. Dieses Risiko kann häufig durch einen zweiten Ig/TCR Marker ausgeglichen werden. Aufgrund der nachgewiesenen Stabilität des *ETV6-RUNX1* Bruchpunkts besteht hier jedoch keine Gefahr des Verlusts.

Ein weiteres Problem der Ig/TCR Marker besteht darin, dass mit der verwendeten Methodik eingeschätzt werden kann, ob der entsprechende Marker in allen, oder nur in einem Teil der Leukämiezellen nachweisbar ist. Dennoch wird in der weiteren Analyse davon ausgegangen, dass alle Zellen erfasst werden. Durch unterschiedlich schnelles Ansprechen verschiedener Subklone der Leukämie auf die Therapie, könnte ein heterogenes Bild bei Beobachtung der MRD-Ergebnisse, die mit einzelnen Ig/TCR Markern gemessen wurden, entstehen. Dies könnte beispielweise auch die beschriebenen Abweichungen zwischen verschiedenen MRD-Markern erklären. Der Vorteil in der Verwendung des genomischen Bruchpunkts der *ETV6-RUNX1* Genfusion besteht hier darin, dass sicher alle Leukämiezellen erfasst werden. Dies

umfasst sowohl Subklone welche schneller auf die Therapie ansprechen als auch solche, welche durch etwaige Resistenzmechanismen, ein schlechteres Ansprechen zeigen. Somit kann eine generelle Aussage über das Therapieansprechen der Leukämie des jeweiligen Patienten getroffen werden.

Ein Problem stellte die oft langwierige und in nur 80-90 % erfolgreiche Sequenzierung⁽⁶⁸⁾ der genomischen Bruchpunkte für die einzelnen Patienten mit der hier verwendeten Methode der *Nested Multiplex Long-Range PCR* dar. Im Gegensatz zu anderen Translokationen, existiert bei der Translokation *t(12;21)* kein sicherer Cluster der Bruchereignisse, sodass über lange DNA-Intron Bereiche sequenziert werden muss. Hier sollten neuere Methoden, wie zum Beispiel *Next Generation Sequencing* in Zukunft Erleichterung schaffen und sowohl schneller als auch zuverlässiger Ergebnisse liefern.⁽⁷³⁻⁷⁵⁾

Bei anderen Formen der Leukämie wie zum Beispiel der Säuglings-ALL mit *MLL*-Rearrangement oder der Philadelphia-Chromosom (*BCR-ABL*) positiven Leukämie wird das Fusionsgen bzw. das Fusionstranskript bereits in der Routinediagnostik zum Monitoring des Therapieansprechens eingesetzt.^(76, 77) Diese Methode kommt auch bei der chronisch myeloischen Leukämie (CML) zum Einsatz⁽⁷⁸⁾. Für Patienten mit *ETV6-RUNX1*-positiver ALL steht ein ebenso verlässlicher und sensitiver MRD-Marker zur Verfügung, der jedoch in der klinischen Routine bisher nicht zum Einsatz kommt.

7 Literaturverzeichnis

1. Onciu M. Acute lymphoblastic leukemia. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2009;23(4):655-74.
2. Pui C-H, Robison LL, Look AT. Acute lymphoblastic leukaemia. *The Lancet.* 2008;371(9617):1030-43.
3. Erdmann F KP, 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.
4. Stanulla M, Schrappe M. Treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Semin Hematol.* 2009;46(1):52-63.
5. Pui CH, Evans WE. Treatment of acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med.* 2006;354(2):166-78.
6. Szczepanski T, Orfao A, van der Velden VH, San Miguel JF, van Dongen JJ. Minimal residual disease in leukaemia patients. *Lancet Oncol.* 2001;2(7):409-17.
7. Campana D. Minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia. *Semin Hematol.* 2009;46(1):100-6.
8. Bene MC, Castoldi G, Knapp W, Ludwig WD, Matutes E, Orfao A, van't Veer MB. Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL). *Leukemia.* 1995;9(10):1783-6.
9. van Wering ER, Beishuizen A, Roeffen ET, van der Linden-Schrever BE, Verhoeven MA, Hahlen K, Hooijkaas H, van Dongen JJ. Immunophenotypic changes between diagnosis and relapse in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia.* 1995;9(9):1523-33.
10. Henze G, Fengler R, Hartmann R, Kornhuber B, Janka-Schaub G, Niethammer D, Riehm H. Six-year experience with a comprehensive approach to the treatment of recurrent childhood acute lymphoblastic leukemia (ALL-REZ BFM 85). A relapse study of the BFM group. *Blood.* 1991;78(5):1166-72.
11. Henze G, v Stackelberg A, Eckert C. ALL-REZ BFM--the consecutive trials for children with relapsed acute lymphoblastic leukemia. *Klinische Padiatrie.* 2013;225 Suppl 1:S73-8.
12. Herold R, von Stackelberg A, Hartmann R, Eisenreich B, Henze G. Acute lymphoblastic leukemia-relapse study of the Berlin-Frankfurt-Munster Group (ALL-REZ BFM) experience: early treatment intensity makes the difference. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology.* 2004;22(3):569-70; author reply 70-1.
13. Einsiedel HG, von Stackelberg A, Hartmann R, Fengler R, Schrappe M, Janka-Schaub G, Mann G, Hahlen K, Gobel U, Klingebiel T, Ludwig WD, Henze G. Long-term outcome in children with relapsed ALL by risk-stratified salvage therapy: results of trial acute lymphoblastic leukemia-relapse study of the Berlin-Frankfurt-Munster Group 87. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology.* 2005;23(31):7942-50.
14. Eckert C, Biondi A, Seeger K, Cazzaniga G, Hartmann R, Beyermann B, Pogodda M, Proba J, Henze G. Prognostic value of minimal residual disease in relapsed childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet.* 2001;358(9289):1239-41.
15. Eckert C, Henze G, Seeger K, Hagedorn N, Mann G, Panzer-Grümayer R, Peters C, Klingebiel T, Borkhardt A, Schrappe M, Schrauder A, Escherich G, Sramkova L, Niggli F, Hitzler J, von Stackelberg A. Use of allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation based on minimal residual disease response improves outcomes for children with relapsed acute lymphoblastic leukemia in the intermediate-risk group. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology.* 2013;31(21):2736-42.
16. van der Velden VH, Hochhaus A, Cazzaniga G, Szczepanski T, Gabert J, van Dongen JJ. Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: principles, approaches, and laboratory aspects. *Leukemia.* 2003;17(6):1013-34.
17. Eckert C, Flohr T, Koehler R, Hagedorn N, Moericke A, Stanulla M, Kirschner-Schwabe R, Cario G, Stackelberg A, Bartram CR, Henze G, Schrappe M, Schrauder A. Very early/early relapses of acute

lymphoblastic leukemia show unexpected changes of clonal markers and high heterogeneity in response to initial and relapse treatment. *Leukemia*. 2011;25(8):1305-13.

18. Panzer-Grumayer ER, Cazzaniga G, van der Velden VH, del Giudice L, Peham M, Mann G, Eckert C, Schrauder A, Germano G, Harbott J, Basso G, Biondi A, van Dongen JJ, Gadner H, Haas OA. Immunogenotype changes prevail in relapses of young children with TEL-AML1-positive acute lymphoblastic leukemia and derive mainly from clonal selection. *Clin Cancer Res*. 2005;11(21):7720-7.
19. Li AH, Rosenquist R, Forestier E, Lindh J, Roos G. Detailed clonality analysis of relapsing precursor B acute lymphoblastic leukemia: implications for minimal residual disease detection. *Leuk Res*. 2001;25(12):1033-45.
20. Guggemos A, Eckert C, Szczepanski T, Hanel C, Taube T, van der Velden VH, Graf-Einsiedel H, Henze G, Seeger K. Assessment of clonal stability of minimal residual disease targets between 1st and 2nd relapse of childhood precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*. 2003;88(7):737-46.
21. Greaves M, Maley CC. Clonal evolution in cancer. *Nature*. 2012;481(7381):306-13.
22. Anderson K, Lutz C, van Delft FW, Bateman CM, Guo Y, Colman SM, Kempinski H, Moorman AV, Tittley I, Swansbury J, Kearney L, Enver T, Greaves M. Genetic variegation of clonal architecture and propagating cells in leukaemia. *Nature*. 2011;469(7330):356-61.
23. van der Velden VH, Cazzaniga G, Schrauder A, Hancock J, Bader P, Panzer-Grumayer ER, Flohr T, Sutton R, Cave H, Madsen HO, Cayuela JM, Trka J, Eckert C, Foroni L, Zur Stadt U, Beldjord K, Raff T, van der Schoot CE, van Dongen JJ, European Study Group on MRDdiALL. Analysis of minimal residual disease by Ig/TCR gene rearrangements: guidelines for interpretation of real-time quantitative PCR data. *Leukemia*. 2007;21(4):604-11.
24. Koehler R, Bartram CR. Molecular genetic detection of minimal residual disease (MRD) in children with acute lymphoblastic leukemia. *Klinische Padiatrie*. 2013;225 Suppl 1:S40-4.
25. Dworzak MN, Panzer-Grumayer ER. Flow cytometric detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Lymphoma*. 2003;44(9):1445-55.
26. Borkhardt A, Cazzaniga G, Viehmann S, Valsecchi MG, Ludwig WD, Burci L, Mangioni S, Schrappe M, Riehm H, Lampert F, Basso G, Masera G, Harbott J, Biondi A. Incidence and clinical relevance of TEL/AML1 fusion genes in children with acute lymphoblastic leukemia enrolled in the German and Italian multicenter therapy trials. *Associazione Italiana Ematologia Oncologia Pediatrica and the Berlin-Frankfurt-Munster Study Group*. *Blood*. 1997;90(2):571-7.
27. Harrison CJ, Moorman AV, Barber KE, Broadfield ZJ, Cheung KL, Harris RL, Jalali GR, Robinson HM, Strefford JC, Stewart A, Wright S, Griffiths M, Ross FM, Harewood L, Martineau M. Interphase molecular cytogenetic screening for chromosomal abnormalities of prognostic significance in childhood acute lymphoblastic leukaemia: a UK Cancer Cytogenetics Group Study. *Br J Haematol*. 2005;129(4):520-30.
28. Rubnitz JE, Downing JR, Pui CH, Shurtleff SA, Raimondi SC, Evans WE, Head DR, Crist WM, Rivera GK, Hancock ML, Boyett JM, Buijs A, Grosveld G, Behm FG. TEL gene rearrangement in acute lymphoblastic leukemia: a new genetic marker with prognostic significance. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 1997;15(3):1150-7.
29. Loh ML, Silverman LB, Young ML, Neuberg D, Golub TR, Sallan SE, Gilliland DG. Incidence of TEL/AML1 fusion in children with relapsed acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 1998;92(12):4792-7.
30. Seeger K, Buchwald D, Peter A, Taube T, von Stackelberg A, Schmitt G, Henze G. TEL-AML1 fusion in relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 1999;94(1):374-6.
31. Seeger K, Buchwald D, Taube T, Peter A, von Stackelberg A, Schmitt G, Kochling J, Henze G. TEL-AML1 positivity in relapsed B cell precursor acute lymphoblastic leukemia in childhood. *Berlin-Frankfurt-Munster Study Group*. *Leukemia*. 1999;13(9):1469-70.
32. Zuna J, Hrusak O, Kalinova M, Muzikova K, Stary J, Trka J. Significantly lower relapse rate for TEL/AML1-positive ALL. *Leukemia*. 1999;13(10):1633.
33. Seeger K, von Stackelberg A, Taube T, Buchwald D, Korner G, Suttorp M, Dorffel W, Tausch W, Henze G. Relapse of TEL-AML1--positive acute lymphoblastic leukemia in childhood: a matched-

- pair analysis. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2001;19(13):3188-93.
34. Ford AM. Origins of "late" relapse in childhood acute lymphoblastic leukemia with TEL-AML1 fusion genes. *Blood*. 2001;98(3):558-64.
 35. Zelent A, Greaves M, Enver T. Role of the TEL-AML1 fusion gene in the molecular pathogenesis of childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Oncogene*. 2004;23(24):4275-83.
 36. Pine SR, Wiemels JL, Jayabose S, Sandoval C. TEL-AML1 fusion precedes differentiation to pre-B cells in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Res*. 2003;27(2):155-64.
 37. van der Weyden L, Giotopoulos G, Rust AG, Matheson LS, van Delft FW, Kong J, Corcoran AE, Greaves MF, Mullighan CG, Huntly BJ, Adams DJ. Modeling the evolution of ETV6-RUNX1-induced B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia in mice. *Blood*. 2011;118(4):1041-51.
 38. Tsuzuki S, Seto M, Greaves M, Enver T. Modeling first-hit functions of the t(12;21) TEL-AML1 translocation in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(22):8443-8.
 39. Morrow M, Horton S, Kioussis D, Brady HJ, Williams O. TEL-AML1 promotes development of specific hematopoietic lineages consistent with preleukemic activity. *Blood*. 2004;103(10):3890-6.
 40. O'Connor HE, Butler TA, Clark R, Swanton S, Harrison CJ, Secker-Walker LM, Foroni L. Abnormalities of the ETV6 gene occur in the majority of patients with aberrations of the short arm of chromosome 12: a combined PCR and Southern blotting analysis. *Leukemia*. 1998;12(7):1099-106.
 41. 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):1057-62.
 42. McHale CM, Wiemels JL, Zhang L, Ma X, Buffler PA, Guo W, Loh ML, Smith MT. Prenatal origin of TEL-AML1-positive acute lymphoblastic leukemia in children born in California. *Genes, chromosomes & cancer*. 2003;37(1):36-43.
 43. Wiemels JL, Cazzaniga G, Daniotti M, Eden OB, Addison GM, Masera G, Saha V, Biondi A, Greaves MF. Prenatal origin of acute lymphoblastic leukaemia in children. *Lancet*. 1999;354(9189):1499-503.
 44. Wiemels JL, Cazzaniga G, Daniotti M, Eden OB, Addison GM, Masera G, Saha V, Biondi A, Greaves MF. Prenatal origin of acute lymphoblastic leukaemia in children. *The Lancet*. 1999;354(9189):1499-503.
 45. 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):4584-8.
 46. Alpar D, Wren D, Ermini L, Mansur MB, van Delft FW, Bateman CM, Titley I, Kearney L, Szczepanski T, Gonzalez D, Ford AM, Potter NE, Greaves M. Clonal origins of ETV6-RUNX1(+) acute lymphoblastic leukemia: studies in monozygotic twins. *Leukemia*. 2015;29(4):839-46.
 47. Mori H, Colman SM, Xiao Z, Ford AM, Healy LE, Donaldson C, Hows JM, Navarrete C, Greaves M. Chromosome translocations and covert leukemic clones are generated during normal fetal development. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(12):8242-7.
 48. 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):186-9.
 49. Hein D, Borkhardt A, Fischer U. Insights into the prenatal origin of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Metastasis Rev*. 2020;39(1):161-71.
 50. Schafer D, Olsen M, Lahnemann D, Stanulla M, Slany R, Schmiegelow K, Borkhardt A, Fischer U. Five percent of healthy newborns have an ETV6-RUNX1 fusion as revealed by DNA-based GIPFEL screening. *Blood*. 2018;131(7):821-6.
 51. Zuna J, Ford AM, Peham M, Patel N, Saha V, Eckert C, Kochling J, Panzer-Grumayer R, Trka J, Greaves M. TEL deletion analysis supports a novel view of relapse in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Clin Cancer Res*. 2004;10(16):5355-60.
 52. Metzler M, Mann G, Monschein U, Lodzinski M, Gall C, Flohr T, Viehmann S, Langer T, Schrappe M, Gadner H, Haas OA, Panzer-Grumayer ER. Minimal residual disease analysis in children with t(12;21)-positive acute lymphoblastic leukemia: comparison of Ig/TCR rearrangements and the genomic fusion gene. *Haematologica*. 2006;91(5):683-6.

53. Hong D, Gupta R, Ancliff P, Atzberger A, Brown J, Soneji S, Green J, Colman S, Piacibello W, Buckle V, Tsuzuki S, Greaves M, Enver T. Initiating and cancer-propagating cells in TEL-AML1-associated childhood leukemia. *Science*. 2008;319(5861):336-9.
54. Zaliova M, Fronkova E, Krejckova K, Muzikova K, Mejstrikova E, Sary J, Trka J, Zuna J. Quantification of fusion transcript reveals a subgroup with distinct biological properties and predicts relapse in BCR/ABL-positive ALL: implications for residual disease monitoring. *Leukemia*. 2009;23(5):944-51.
55. Seeger K, Kreuzer KA, Lass U, Taube T, Buchwald D, Eckert C, Korner G, Schmidt CA, Henze G. Molecular quantification of response to therapy and remission status in TEL-AML1-positive childhood ALL by real-time reverse transcription polymerase chain reaction. *Cancer research*. 2001;61(6):2517-22.
56. Seeger K, Viehmann S, Buchwald D, Harbott J, Schrappe M, Sary J, Henze G, Trka J. Treatment response and residual-disease monitoring in initial and relapsed TEL-AML1 positive childhood ALL. *Leukemia*. 2001;15(2):280-2.
57. Zuna J, Krejci O, Madzo J, Fronkova E, Sramkova L, Hrusak O, Kalina T, Vaskova M, Sary J, Trka J, Czech Paediatric Haematology Working G. TEL/AML1 and immunoreceptor gene rearrangements-which comes first? *Leuk Res*. 2005;29(6):633-9.
58. Papaemmanuil E, Rapado I, Li Y, Potter NE, Wedge DC, Tubio J, Alexandrov LB, Van Loo P, Cooke SL, Marshall J, Martincorena I, Hinton J, Gundem G, van Delft FW, Nik-Zainal S, Jones DR, Ramakrishna M, Tittley I, Stebbings L, Leroy C, Menzies A, Gamble J, Robinson B, Mudie L, Raine K, O'Meara S, Teague JW, Butler AP, Cazzaniga G, Biondi A, Zuna J, Kempski H, Muschen M, Ford AM, Stratton MR, Greaves M, Campbell PJ. RAG-mediated recombination is the predominant driver of oncogenic rearrangement in ETV6-RUNX1 acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet*. 2014;46(2):116-25.
59. Rothman R, Trakhtenbrot L, Bielgorai B, Izraeli S, Ishoev G, Amariglio N, Rechavi G, Toren A. Co-existence of multiple subclones in TEL-AML1 at diagnosis of acute lymphoblastic leukaemia in association with submicroscopic deletion of AML1. *Br J Haematol*. 2005;129(4):491-8.
60. Bruggemann M, Kotrova M, Knecht H, Bartram J, Boudjogrha M, Bystry V, Fazio G, Fronkova E, Giraud M, Grioni A, Hancock J, Herrmann D, Jimenez C, Krejci A, Moppett J, Reigl T, Salson M, Scheijen B, Schwarz M, Songia S, Svaton M, van Dongen JJM, Villarese P, Wakeman S, Wright G, Cazzaniga G, Davi F, Garcia-Sanz R, Gonzalez D, Groenen P, Hummel M, Macintyre EA, Stamatopoulos K, Pott C, Trka J, Darzentas N, Langerak AW, EuroClonality NGSwg. Standardized next-generation sequencing of immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations for MRD marker identification in acute lymphoblastic leukaemia; a EuroClonality-NGS validation study. *Leukemia*. 2019;33(9):2241-53.
61. Knecht H, Reigl T, Kotrova M, Appelt F, Stewart P, Bystry V, Krejci A, Grioni A, Pal K, Stranska K, Plevova K, Rijntjes J, Songia S, Svaton M, Fronkova E, Bartram J, Scheijen B, Herrmann D, Garcia-Sanz R, Hancock J, Moppett J, van Dongen JJM, Cazzaniga G, Davi F, Groenen P, Hummel M, Macintyre EA, Stamatopoulos K, Trka J, Langerak AW, Gonzalez D, Pott C, Bruggemann M, Darzentas N, EuroClonality NGSWG. Quality control and quantification in IG/TR next-generation sequencing marker identification: protocols and bioinformatic functionalities by EuroClonality-NGS. *Leukemia*. 2019;33(9):2254-65.
62. Eckert C, Hagedorn N, Sramkova L, Mann G, Panzer-Grumayer R, Peters C, Bourquin JP, Klingebiel T, Borkhardt A, Cario G, Alten J, Escherich G, Astrahantseff K, Seeger K, Henze G, von Stackelberg A. Monitoring minimal residual disease in children with high-risk relapses of acute lymphoblastic leukemia: prognostic relevance of early and late assessment. *Leukemia*. 2015;29(8):1648-55.
63. Boyum A. Isolation of leucocytes from human blood. Further observations. Methylcellulose, dextran, and ficoll as erythrocyteaggregating agents. *Scand J Clin Lab Invest Suppl*. 1968;97:31-50.
64. Boyum A. Isolation of lymphocytes, granulocytes and macrophages. *Scand J Immunol*. 1976;Suppl 5:9-15.

65. Wiemels JL, Greaves M. Structure and possible mechanisms of TEL-AML1 gene fusions in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Cancer research*. 1999;59(16):4075-82.
66. 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):219-28.
67. Thandla SP, Ploski JE, Raza-Egilmez SZ, Chhalliyil PP, Block AW, de Jong PJ, Aplan PD. ETV6-AML1 translocation breakpoints cluster near a purine/pyrimidine repeat region in the ETV6 gene. *Blood*. 1999;93(1):293-9.
68. von Goessel H, Jacobs U, Semper S, Krumbholz M, Langer T, Keller T, Schrauder A, van der Velden VH, van Dongen JJ, Harbott J, Panzer-Grumayer ER, Schrappe M, Rascher W, Metzler M. Cluster analysis of genomic ETV6-RUNX1 (TEL-AML1) fusion sites in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Res*. 2009;33(8):1082-8.
69. Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. Real time quantitative PCR. *Genome research*. 1996;6(10):986-94.
70. Eckert C, Landt O. Real-time PCR to detect minimal residual disease in childhood ALL. *Methods in Molecular Medicine*. 2004;91:175-82.
71. van der Velden VH, Panzer-Grumayer ER, Cazzaniga G, Flohr T, Sutton R, Schrauder A, Basso G, Schrappe M, Wijkhuijs JM, Konrad M, Bartram CR, Masera G, Biondi A, van Dongen JJ. Optimization of PCR-based minimal residual disease diagnostics for childhood acute lymphoblastic leukemia in a multi-center setting. *Leukemia*. 2007;21(4):706-13.
72. van der Velden VH, van Dongen JJ. MRD detection in acute lymphoblastic leukemia patients using Ig/TCR gene rearrangements as targets for real-time quantitative PCR. *Methods in molecular biology*. 2009;538:115-50.
73. Jin Y, Wang X, Hu S, Tang J, Li B, Chai Y. Determination of ETV6-RUNX1 genomic breakpoint by next-generation sequencing. *Cancer Med*. 2016;5(2):337-51.
74. Stadt UZ, Escherich G, Indenbirken D, Alawi M, Adao M, Horstmann MA. Rapid Capture Next-Generation Sequencing in Clinical Diagnostics of Kinase Pathway Aberrations in B-Cell Precursor ALL. *Pediatr Blood Cancer*. 2016;63(7):1283-6.
75. Zur Stadt U, Alawi M, Adao M, Indenbirken D, Escherich G, Horstmann MA. Characterization of novel, recurrent genomic rearrangements as sensitive MRD targets in childhood B-cell precursor ALL. *Blood Cancer J*. 2019;9(12):96.
76. Van der Velden VH, Corral L, Valsecchi MG, Jansen MW, De Lorenzo P, Cazzaniga G, Panzer-Grumayer ER, Schrappe M, Schrauder A, Meyer C, Marschalek R, Nigro LL, Metzler M, Basso G, Mann G, Den Boer ML, Biondi A, Pieters R, Van Dongen JJ, Interfant-99 Study G. Prognostic significance of minimal residual disease in infants with acute lymphoblastic leukemia treated within the Interfant-99 protocol. *Leukemia*. 2009;23(6):1073-9.
77. Pfeifer H, Cazzaniga G, van der Velden VHJ, Cayuela JM, Schafer B, Spinelli O, Akiki S, Avigad S, Bendit I, Borg K, Cave H, Elia L, Reshmi SC, Gerrard G, Hayette S, Hermanson M, Juh A, Jurcek T, Chillon MC, Homburg C, Martinelli G, Kairisto V, Lange T, Lion T, Mueller MC, Pane F, Rai L, Damm-Welk C, Sacha T, Schnittger S, Touloumenidou T, Valerhaugen H, Vandenberghe P, Zuna J, Serve H, Herrmann E, Markovic S, Dongen J, Ottmann OG. Standardisation and consensus guidelines for minimal residual disease assessment in Philadelphia-positive acute lymphoblastic leukemia (Ph + ALL) by real-time quantitative reverse transcriptase PCR of e1a2 BCR-ABL1. *Leukemia*. 2019;33(8):1910-22.
78. Goldman J. Monitoring minimal residual disease in BCR-ABL-positive chronic myeloid leukemia in the imatinib era. *Curr Opin Hematol*. 2005;12(1):33-9.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Jana Hoffmann, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: Der genomische Bruchpunkt der *ETV6-RUNX1* Fusion als Marker zum Response Monitoring bei der akuten lymphoblastischen Leukämie im Kindesalter (The genomic breakpoint of the *ETV6-RUNX1* fusion as a marker for response monitoring in children with acute lymphoblastic leukemia) selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Erstbetreuer/in, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Anteilserklärung an der erfolgten Publikation

Hoffmann J, Krumbholz M, Gutiérrez HP, Fillies M, Szymansky A, Bleckmann K, Zur Stadt U, Köhler R, Kuiper RP, Horstmann M, von Stackelberg A, Eckert C, Metzler M. ***High sensitivity and clonal stability of the genomic fusion as single marker for response monitoring in ETV6-RUNX1-positive acute lymphoblastic leukemia.***

Pediatr Blood Cancer. 2019 Aug;66(8):e27780. doi: 10.1002/pbc.27780.

IMPACT FACTOR: 2.355

Beitrag im Einzelnen:

- Identifizierung der Proben im Labordatenbank-System und Heraussuchen der Proben
- Extraktion von DNA aus mononukleären Zellen, wenn erforderlich
- Primer/Sonden Design für spezifische *ETV6-RUNX1* Bruchpunkte
- Etablierung der patientenspezifischen Real-Time PCR mit dem Ziel eine Sensitivität von mindestens 10^{-4} zu erreichen
- Quantifizierung aller MRD-Verlaufskontrollen sowie Ersterkrankungs-, Erstrezidiv-, Proben ohne mikroskopischen Knochenmark-Befall und Folgerezidiv-Proben, was die Vorbereitung, das Pipettieren der Ansätze sowie die Auswertung der Real-Time PCR Läufe einschließt
- Wiederholung von unklaren oder fehlenden Messungen unter Verwendung der etablierten patientenspezifischen Ig-/TCR Marker, wenn erforderlich
- Zusammentragen Auswertung aller Quantifizierungsergebnisse unter Verwendung der verschiedenen Marker
- Komplette statistische Auswertung (Auswertungskonzept und Durchführung)
- Erstellung aller Abbildungen und Tabellen der Publikation
- Schreiben der ersten Fassung der Publikation und Begleitung des Überarbeitungsprozess bis zur eingereichten Version
- Anteil an der Publikation mindestens 50%

Unterschrift, Datum und Stempel des der betreuenden Hochschullehrerin

Unterschrift der Doktorandin

Journal Summary List

Pediatric Blood & Cancer rank 26/124 in category "Pediatrics"

Journal Data Filtered By: **Selected JCR Year: 2017** Selected Editions: SCIE,SSCI
 Selected Categories: **"PEDIATRICS"** Selected Category Scheme: WoS
Gesamtanzahl: 124 Journale

Rank	Full Journal Title	Total Cites	Journal Impact Factor	Eigenfactor Score
1	JAMA Pediatrics	5,870	10.769	0.033730
2	JOURNAL OF THE AMERICAN ACADEMY OF CHILD AND ADOLESCENT PSYCHIATRY	19,482	6.250	0.019260
3	PEDIATRICS	77,301	5.515	0.118620
4	PEDIATRIC ALLERGY AND IMMUNOLOGY	4,341	4.137	0.006970
5	JOURNAL OF ADOLESCENT HEALTH	14,174	4.098	0.026400
6	Pediatric Obesity	1,632	3.980	0.007020
7	Archives of Disease in Childhood-Fetal and Neonatal Edition	3,893	3.953	0.009610
8	JOURNAL OF PEDIATRICS	31,289	3.667	0.047810
9	EUROPEAN CHILD & ADOLESCENT PSYCHIATRY	4,492	3.553	0.007980
10	Seminars in Fetal & Neonatal Medicine	2,246	3.435	0.005380
11	DEVELOPMENTAL MEDICINE AND CHILD NEUROLOGY	11,671	3.289	0.013680
12	ARCHIVES OF DISEASE IN CHILDHOOD	16,281	3.258	0.015810
13	Maternal and Child Nutrition	2,405	3.233	0.006190
14	PEDIATRIC DIABETES	3,033	3.161	0.007530
15	PEDIATRIC PULMONOLOGY	6,730	3.157	0.009940
16	PEDIATRIC RESEARCH	13,691	3.123	0.015050
17	Pediatric Critical Care Medicine	5,763	3.092	0.011600
18	CLINICS IN PERINATOLOGY	2,377	2.915	0.004200
19	JOURNAL OF CHILD AND ADOLESCENT PSYCHOPHARMACOLOGY	2,677	2.901	0.004860
20	SEMINARS IN PERINATOLOGY	3,088	2.885	0.005580
21	PEDIATRIC CLINICS OF NORTH AMERICA	3,177	2.808	0.004830
22	Academic Pediatrics	2,106	2.806	0.008100
23	JOURNAL OF PEDIATRIC GASTROENTEROLOGY AND NUTRITION	11,417	2.752	0.018600
24	Neonatology	2,432	2.688	0.006290
25	CURRENT OPINION IN PEDIATRICS	3,264	2.673	0.006780
26	PEDIATRIC BLOOD & CANCER	9,907	2.646	0.023240
27	PEDIATRIC NEPHROLOGY	8,625	2.627	0.011860

Publikation

Hoffmann J, Krumbholz M, Gutiérrez HP, Fillies M, Szymansky A, Bleckmann K, Zur Stadt U, Köhler R, Kuiper RP, Horstmann M, von Stackelberg A, Eckert C, Metzler M. ***High sensitivity and clonal stability of the genomic fusion as single marker for response monitoring in ETV6-RUNX1-positive acute lymphoblastic leukemia.***

Pediatr Blood Cancer. 2019 Aug;66(8):e27780. doi: 10.1002/pbc.27780.

IMPACT FACTOR: 2.355

<https://doi.org/10.1002/pbc.27780>

Publikation Seiten 37 – 47

Supporting Information Seiten 48 - 51

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Publikationsliste

Publikationen

Hoffmann J, Krumbholz M, Gutiérrez HP, Fillies M, Szymansky A, Bleckmann K, Zur Stadt U, Köhler R, Kuiper RP, Horstmann M, von Stackelberg A, Eckert C, Metzler M. High sensitivity and clonal stability of the genomic fusion as single marker for response monitoring in *ETV6-RUNX1*-positive acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Blood Cancer*. 2019;66(8):e27780. Impact factor 2,355

Reiter M, **Hoffmann J**, Kleber F, Schumich A, Peter G, Kromp F, Kempel M, Dworzak M. Towards automation of flow cytometric analysis for quality-assured follow-up assessment to guide curative therapy for acute lymphoblastic leukaemia in children. *Memo – Magazine for European Medical Oncology*. 2014;7:219-226. Impact factor 0,14

Kongressbeiträge

Hoffmann J, Metzler M, von Stackelberg A, Eckert C.
MRD-quantification during treatment of *ETV6-RUNX1* positive ALL relapses using the genomic breakpoint of the fusion gene.
25. Jahrestagung der Kind-Philipp-Stiftung für Leukämieforschung in Wilsede (2012)

Berger M, **Hoffmann J**, Moor K, Klaeser B, Pabst T.
Zevalin (90Yttrium ibritumomab tiuxetan) and BEAM conditioning chemotherapy (Z-BEAM) is superior to rituximab and BEAM (R-BEAM) prior to autologous stem cell transplantation in patients with mantle cell lymphoma. *EBMT* (2012)
„Best abstract“-Preis der 80. Jahresversammlung der Schweizerischen Gesellschaft für Allgemeine Innere Medizin (2012)

Hoffmann J, Krumbholz M, Fillies M, Stackelberg A, Metzler M, Eckert C
Genomic breakpoint of *ETV6-RUNX1* gene fusion – a highly sensitive, reliable and stable marker for response monitoring in *ETV6-RUNX1* positive ALL
4th ESLOH Symposium New Developments in MRD Diagnostics (2015)

Hoffmann J, Krumbholz M, Stackelberg A, Metzler M, Eckert C
A more precise sensitive response monitoring using genomic breakpoint of *ETV6-RUNX1* gene fusion in *ETV6-RUNX1* positive ALL (Poster)
32. Deutscher Krebs Kongress (2016)

Danksagung

In erster Linie danke ich ausdrücklich meiner Betreuerin Frau PD Dr. Cornelia Eckert für die Überlassung des Themas und die, sowohl fachlich als auch menschlich, immer so hervorragende Betreuung dieser Arbeit. Ich danke ihr für ihr Engagement, ihre Unterstützung und Geduld von der Einarbeitung in die Thematik, über die Auswertung bis zur Fertigstellung der Arbeit und der Publikation, für ihr Interesse und ihre Motivation, die konstruktive Kritik, die immer neuen Ideen und ihre Bereitschaft in langen Gesprächen jederzeit ihr Wissen mit mir zu teilen.

Des Weiteren bedanke ich mich bei Prof. Dr. Markus Metzler und seiner Arbeitsgruppe an der Uniklinik Erlangen für die Zusammenarbeit und die Durchführung der *ETV6-RUNX1* Bruchpunktsequenzierung, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Ebenso gilt mein Dank der *ALL-BFM* sowie *CoALL* Studiengruppe für die Bereitstellung von Patientenproben aus der Ersterkrankung, sowie allen Kliniken welche im Rahmen der *ALL-REZ BFM* Studien Material der behandelten Patienten eingesandt haben.

Darüber hinaus möchte ich herzlichst unseren Mitarbeitern im Labor Marion Fillies, Claudia Hanel, Susanne Pawlik, Ute Schwiem und Wilhelmine Keune für die immer angenehme Arbeitsatmosphäre und für ihre Hilfe und Unterstützung bei praktischen Fragestellungen im täglichen Alltag danken.

Nicht zuletzt danke ich allen, die mich während der verschiedenen Etappen dieser Arbeit begleitet und unterstützt haben.