# Aus der III. Medizinischen Klinik der Medizinischen Fakultät Mannheim (Direktor: Prof. Dr. med. Wolf-Karsten Hofmann)

# Etablierung einer RNA-basierten, quantitativen TaqMan PCR zum Nachweis der *KIT* D816V Mutation und Vergleich von RNA vs. DNA Allellast bei systemischer Mastozytose

Inauguraldissertation
zur Erlangung des medizinischen Doktorgrades
der
Medizinischen Fakultät Mannheim
der Ruprecht-Karls-Universität

zu

Heidelberg

vorgelegt von Sofie Baumann

aus Fürth/Bayern 2024

Dekan: Herr Prof. Dr. med. Sergij Goerdt

Referentin: Frau Prof. Dr. rer. nat. Alice Fabarius

## Inhaltsverzeichnis

# Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverze	eichnis	1
1 Einleitu	ung	1
1.1 Sys	stemische Mastozytose	1
1.1.1	Herkunft, Entwicklung und Funktion der Mastzelle	1
1.1.2	Klassifikation	2
1.1.3	Epidemiologie	3
1.1.4	Diagnosekriterien der SM	4
1.1.5	Klinik, Therapie und Prognose	5
1.2 Re	zeptortyrosinkinasen	6
1.2.1	Genetik der Rezeptortyrosinkinasen	6
1.2.2	CD117/KIT	7
1.2.3	Mutationen in KIT	
1.3 Mo	lekulargenetische Detektionsmethoden	11
1.3.1	Historie molekulargenetischer Detektionsmethoden bis zur PCR	11
1.3.2	Prinzip der PCR	12
1.3.3	Erste Weiterentwicklungen der PCR	13
1.3.4	Quantitative PCR	13
1.3.5	Quantitative real-time PCR (qPCR)	14
1.3.6	LightCycler- und TaqMan	15
1.3.7	Digitale PCR	17
1.3.8	Messungen auf gDNA- und RNA/cDNA-Ebene	18
1.4 Zie	lsetzungen der Arbeit	19
2 Materia	al und Methoden	21
2.1 Ma	terial	21
2.1.1	Geräte	21
2.1.2	Chemikalien	23
2.1.3	Plasmide	24
2.1.4	KIT-Systeme	24
2.1.5	Primer/Synthetische Oligonukleotide	25
2.1.6	PCR-Sonden	25
2.1.7	Enzyme	26
2.1.8	Puffer und Lösungen	26
2.1.9	Software	27
2.1.10	Patient*innenenproben für die Etablierung der TaqMan-qPCR	28
2.1.11	Patient*innen für die Bestimmung des EAB/VAF Koeffizienten	28

## Inhaltsverzeichnis

	2.2 Me	thoden	. 29
	2.2.1	Leukozytenisolation aus PB mittels Erythrozytenlyse	. 29
	2.2.2	DNA-Isolation mittels QIAcube	. 29
	2.2.3	RNA-Isolation	. 30
	2.2.4	Qualitätskontrolle der DNA und RNA	. 31
	2.2.5	cDNA-Synthese	. 32
	2.2.6	Plasmid-Synthese	. 32
	2.2.7	Quantitative Polymerase Kettenreaktion (qPCR)	. 33
	2.2.8	DNA-basierte Beurteilung von KIT D816V	. 35
	2.2.9	Statistische Analyse	. 35
3	Ergebn	isse	. 37
,	3.1 Eta	blierung der TaqMan-basierten qPCR	. 37
	3.1.1	Aufbau des Plasmids	. 37
	3.1.2	Robustheit der PCR und Etablierung der Standardreihe	. 37
	3.1.3	Effizienz der PCR	. 38
	3.1.4	Festlegung der Auswertekriterien	. 40
	3.1.5 prädikti	Klinische Sensitivität, diagnostische Spezifität, positiv und neg iver Wert und diagnostische Odds-Ratio	
	3.1.6 Spezifi	ROC-Analyse zur Validierung der klinischen Sensitivität, diagnostischen sensitivitat, diagnostischen se	
	3.1.7 <i>KIT</i> D8	"Accuracy": Korrelation der TaqMan- <i>KIT</i> D816V EAB mit den LightCyc	
	3.1.8	Verlaufsmessungen	. 46
	3.1.9 Reprod	Präzision: Intra- und Interassayvariabilität (Repeatability lucibility)	
,	3.2 Ver	gleich zwischen DNA- und RNA-basierter Messung von KIT D816V	. 48
	3.2.1	Patient*innencharakteristika	. 48
	3.2.2	Vergleich zwischen EAB und VAF	. 50
	3.2.3	Krankheitscharakteristika in Kohorte A und B	. 52
	3.2.4	Prognostischer Wert von EAB, VAF und dem EAB/VAF Koeffizienten	. 54
	3.2.5	Überlebensanalysen	. 54
4	Diskus	sion	. 56
5	Zusam	menfassung	. 68
6		ırverzeichnis	
7	Abbildu	ungsverzeichnis	. 82
8		enverzeichnis	
9	Lebens	slauf	. 84
10	Danksa	agung	. 85

## 1 Einleitung

## 1.1 Systemische Mastozytose

## 1.1.1 Herkunft, Entwicklung und Funktion der Mastzelle

Im Jahr 1879 entdeckte Paul Ehrlich die Mastzelle. Die Vermutung Ehrlichs, dass die Granula im Zellinneren durch "Überernährung" entstehen, führte zur Namensgebung der "Mastzelle". In den 1950er Jahren wurde diese These widerlegt, als man herausfand, dass die Granula der Mastzellen Heparin <sup>2</sup> und Histamin <sup>3</sup> enthalten. Daraus folgerte man, dass Mastzellen eine wichtige Rolle bei anaphylaktischen Reaktionen spielen. Heute weiß man, dass die Mastzellen nicht nur Heparin und Histamin ausschütten, sondern durch die Synthese verschiedener Zytokine, Chemokine und Wachstumsfaktoren <sup>4-7</sup> an vielfältigen immunologischen Prozessen beteiligt sind und eine entscheidende Rolle bei der angeborenen und erworbenen Immunantwort spielen. 8 1977 konnten Kitamura et al. zeigen, dass Mastzellen im Knochenmark (KM) gebildet werden. <sup>9</sup> In den 90er Jahren folgte die Erkenntnis, dass Mastzellen zur myelomonozytären Zelllinie gehören und sich, wie alle myeloischen Zellen, aus pluripotenten, CD34-positiven (CD34+) hämatopoetischen Stammzellen entwickeln. 10, 11 Die Vorläuferzellen der Mastzelle weisen die Oberflächenmarker CD34 und CD117 auf (CD34+ und CD117+). 10 Sie halten sich entweder im KM auf oder zirkulieren im peripheren Blut (PB). Im Gewebe differenzieren sie durch verschiedene Wachstumsfaktoren, vor allem durch den stem cell factor (SCF) sowie Zytokine und Interleukine, zu reifen Mastzellen. Die reifen Mastzellen sind gewebegebunden und in allen vaskularisierten Organen in unterschiedlicher Quantität zu finden, zirkulieren jedoch nicht im PB. 10, 12, 13

## 1.1.2 Klassifikation

Mastozytosen sind seltene, heterogene Erkrankungen, welche durch Entartung hämatologischer Vorläuferzellen im KM entstehen und zu unkontrollierter Mastzellproliferation und zur Akkumulation von Mastzellen in verschiedenen Organsystemen führen. Zunächst wurde die kutane Form der Mastozytose als dermatologische Erkrankung mit pigmentierten makulopapulösen Effloreszenzen als *Urtikaria pigmentosa* beschrieben. <sup>14</sup> Die systemische Form, mit welcher sich die vorliegende Arbeit beschäftigt, wurde erstmals 1949 entdeckt. <sup>15</sup> Sie zeichnet sich durch die Ansammlung klonaler Mastzellen in einem oder mehreren Organen aus und führt so zu sehr variablen klinischen Ausprägungen. <sup>16, 17</sup> Seit 2016 wird die systemische Mastozytose (SM) aufgrund distinkter klinischer und pathologischer Merkmale nicht mehr unter den myeloproliferativen Neoplasien, sondern als eigene Krankheitsentität unter den myeloischen Neoplasien geführt. <sup>18</sup> Die SM wurde im Jahr 1979 das erste Mal systematisch in Subtypen klassifiziert. <sup>19</sup> Seitdem wurde die Klassifikation mehrmals überarbeitet. Die aktuell gültige Klassifikation stammt aus dem Jahr 2022 und ist in Tabelle 1 dargestellt.

#### Tabelle 1: WHO-Klassifikation der Mastozytose

#### **Kutane Mastozytose (CM)**

- a. Urticaria pigmentosa (UP)/makulopapulöse kutane Mastozytose (MPCM)
- b. Diffuse kutane Mastozytose (DCM)
- c. Mastozytom der Haut

## Systemische Mastozytose (SM)

- a. Indolente systemische Mastozytose (ISM)
- b. Schwelende (*smoldering*) systemische Mastozytose (SSM)
- c. Systemische Mastozytose mit assoziierter hämatologischer Neoplasie (SM-AMN)
- d. Aggressive systemische Mastozytose (ASM)
- e. Mastzellleukämie (MCL)

## Mastzellsarkom (MCS)

Tabelle modifiziert nach Arber et al., 2022 20

## 1.1.3 Epidemiologie

Die SM ist eine seltene Erkrankung. Über einen Beobachtungszeitraum von 9 Jahren wurde in der Metropolregion Rhein Neckar mit 2,4 Millionen Einwohnern eine Inzidenz von 2 Personen pro Jahr und eine Prävalenz von 4,6 pro 100.000 Einwohnern errechnet. Auf ganz Deutschland bezogen betrug die Inzidenz 68 Personen pro Jahr bei ca. 82,8 Millionen Einwohnern und die Prävalenz 5,2 pro 100.000 Einwohner. Das Verhältnis von Männern zu Frauen betrug 2:1. Die Lebenserwartung war abhängig vom Subtyp, dem Geschlecht und dem Alter bei Diagnosestellung. <sup>21</sup> Mastozytosen sind meist erworben, in seltenen Fällen ist jedoch eine familiäre Häufung beobachtet worden. <sup>22</sup> Sowohl Kinder als auch Erwachsene können betroffen sein. Während sich die Erkrankung bei pädiatrischen Patient\*innen meist auf die Haut (kutane Mastozytose, CM) beschränkt <sup>23</sup> und oft spontan regressiv ist <sup>24</sup>, ist bei Erwachsenen die chronische SM mit Beteiligung des Knochenmarks die häufigste Ausprägungsform.

## 1.1.4 Diagnosekriterien der SM

Die Diagnosekriterien sind in Tabelle 2 aufgeführt.

## Tabelle 2: Diagnosekriterien der systemischen Mastozytose

#### Hauptkriterium

a. Histologischer Nachweis multifokaler, dichter Infiltrate von Mastzellen im KM oder in einem extramedullären Organsystem (≥ 15 Mastzellen in entsprechenden Aggregaten)

#### Nebenkriterien

- a. > 25 % aller Mastzellen im kompakten Infiltrat des KM-Ausstriches weisen einen atypischen Phänotyp auf (spindelförmig oder unreif)
- b. Detektion der *KIT* D816V Punktmutation oder anderer aktivierender (gain-of-function) *KIT*-Mutationen im KM, PB oder in anderen Organen
- c. Mastzellen im Knochenmark, Blut oder extramedullären Organsystem exprimieren einen aberranten Immunphänotyp: CD25, CD 30 und/oder CD2
- d. Serumtryptase-Spiegel überschreitet 20 ng/ml. Bei Vorliegen einer SM-AMN zählt die Serumtryptase nicht als Nebenkriterium.

#### **B-findings** (borderline benign)

- a. > 30 % Mastzellinfiltration in Knochenmarksbiospien und Serumtryptase-Spiegel > 200 ng/ml
- b. Zeichen einer Dysplasie oder Proliferation, nicht ausreichend für die Diagnose einer AMN
- c. Organomegalie und/oder Lymphadenopathie ohne Funktionseinschränkung

#### **C-findings (consider cytoreduction)**

- a. Zytopenien ( $\geq$  1) im Blutbild (ANC < 1,0x10 $^9$  /L, Hb < 10 g/dL oder Thromboyzten < 100x10 $^9$  /L)
- b. Palpable Hepatomegalie mit Leberfunktionsstörung, Aszites und/oder portaler Hypertension
- c. Palpable Splenomegalie mit assoziiertem Hypersplenismus
- d. Gastrointestinale Mastzellinfiltration mit Malabsorption und Gewichtsverlust
- e. Skelettale Beteiligung mit großen Osteolysen und/oder pathologischen Frakturen

**Abkürzungen:** AMN, assoziierte myeloische Neoplasie; ANC, Gesamtzahl neutrophiler Granulozyten (engl. absolute neutrophil count); Hb, Hämoglobin; KM, Knochenmark. Tabelle modifiziert nach Arber et al, 2022

Zur Diagnosestellung der SM müssen mindestens ein Hauptkriterium und ein Nebenkriterium oder drei Nebenkriterien erfüllt sein. Liegen lediglich Haupt- und Nebenkriterien, keine AMN und keine B-findings vor, so spricht man von einer

indolenten systemischen Mastozytose (ISM). Diese stellt mit ca. 90% die häufigste Form der Erkrankung dar. <sup>25</sup> Die fortgeschrittenen Formen der Erkrankung (AdvSM) umfassen die aggressive SM (ASM), die Mastzellleukämie (MCL) und die SM mit assoziierter myeloischer Neoplasie (SM-AMN). <sup>26</sup>

Tritt eine AMN auf, ist diese myeloischen Ursprungs, z.B. myelomonozytäre Leukämie (CMML), myelodysplastische Syndrome (MDS), myeloproliferative Neoplasien (MPN), oder die chronische Eosinophilenleukämie (CEL). <sup>27-29</sup> Zusätzlich zu den diagnostischen Kriterien der SM müssen bei der SM-AMN die jeweiligen Diagnosekriterien der AMN erfüllt sein. Die AMN muss, wie bei alleinigem Vorkommen, vollständig durch zusätzliche Diagnostik klassifiziert werden.

Die sogenannten C-findings sind Zeichen von Organdysfunktionen und damit auch Zeichen einer aggressiven Form der Erkrankung. Bei Vorliegen mindestens eines C-findings kann die Diagnose einer ASM gestellt werden. <sup>30</sup> Die aggressivste Form der SM ist die Mastzellleukämie. Diese ist definiert durch mehr als 20 % Mastzellen im Knochenmarkausstrich, C-findings sind nicht erforderlich, liegen jedoch häufig vor. <sup>30</sup> Der Begriff B-findings steht für "borderline benign", also grenzwärtig benigne. Sind zusätzlich zu Haupt- und Nebenkriterien mindestens zwei B-findings erfüllt, kann die Diagnose einer schwelenden SM (SSM) gestellt werden, welche eine Übergangsform zwischen indolenter und AdvSM darstellt. <sup>30</sup>

## 1.1.5 Klinik, Therapie und Prognose

Die SM zeigt klinisch ein heterogenes Bild. Bei der ISM sind die Folgen der Freisetzung von Histamin und Heparin als Mastzellmediatoren führend. Es kommt zu anaphylaktischen Reaktionen, Diarrhöen, Flush, Pruritus, Nahrungsmittelunverträglichkeiten und Osteoporose mit pathologischen Frakturen. <sup>31</sup> Bei der SM-AMN kommt es je nach Form der assoziierten Neoplasie zu Veränderungen des Blutbildes (u.a. Eosinophilie, Monozytose). Die Klinik der ASM ergibt sich als Folge der Organdysfunktionen (siehe C-findings). Es kommt unter anderem zu Aszites, hypalbuminämischen Ödemen, Gewichtsverlust durch Malabsorption und Knochenschmerzen sowie pathologischen Frakturen durch osteolytische Läsionen. <sup>32</sup>

Die Prognose der SM ist vor allem vom Subtyp der Erkrankung abhängig. <sup>33</sup> Während das Gesamtüberleben bei Patient\*innen mit ISM im Vergleich zu gesunden

Kontrollgruppen nicht reduziert ist <sup>27, 34</sup>, ist die Prognose bei Patient\*innen mit AdvSM zwar heterogen, aber insgesamt deutlich schlechter. <sup>27, 34-36</sup>

Negativ beeinflusst wird die Prognose bei der AdvSM durch eine erhöhte alkalische Phosphatase (AP), Mutationen im sogenannten S/A/R Gen-Panel (*SRSF2, ASXL1, RUNX1*) und einen ungünstigen Karyotyp. <sup>37-39</sup> Bei der SM–AMN ist die assoziierte AMN prognoseentscheidend. <sup>28</sup> Bei *KIT* D816V-positiven Patient\*innen ist zudem die Allellast auf DNA-Ebene prognostisch relevant. <sup>40</sup> Wichtig für die Prognose ist daher die genaue molekulargenetische, zytogenetische und klinische Charakterisierung der Erkrankung.

Aufgrund des sehr heterogenen Charakters der SM erfolgt die Therapie nach individueller Abwägung je nach Allgemeinzustand des\*r Patient\*in, der klinischen Symptomatik, dem Subtyp, der Organdysfunktion und den nachgewiesenen molekularen Markern. Während bei der ISM symptomatische Therapien mit u.a. H1und H2-Blockern und Mastzellstabilisatoren ausreichend sind, ist bei den AdvSM eine zusätzliche zytoreduktive Therapie notwendig. Bis 2016 kam vor allem das Purinanalogon Cladribin als Erstlinientherapie Anwendung. Der zur Multikinaseinhibitor Midostaurin, welcher 2016 in den USA und 2017 in Europa zugelassen wurde, zeigte in einem statistisch optimierten, retrospektiven Vergleich zur Therapie mit Cladribin jedoch eine Verbesserung des Gesamtüberlebens. 41 Eine weitere neuere Substanz, welche in Europa seit März 2022 zugelassen ist, ist der Tyrosinkinaseinhibitor Avapritinib. Die einzige kurative Therapieoption bleibt die allogene Stammzell-Transplantation. Eine Überarbeitung der therapeutischen Algorithmen findet stetig statt.

## 1.2 Rezeptortyrosinkinasen

## 1.2.1 Genetik der Rezeptortyrosinkinasen

Alle Zellen exprimieren auf ihrer Oberfläche spezifische Rezeptoren, um Signale durch extrazelluläre Botenstoffe empfangen zu können. Eine bestimmte Gruppe dieser Rezeptoren sind Rezeptortyrosinkinasen. Diese vermitteln unter anderem Signale, welche die Zellproliferation und -differenzierung sowie das Überleben einer Zelle beeinflussen. Bisher sind 4 Typen (Typ I – IV) von Rezeptortyrosinkinasen bekannt, welche sich anhand ihres Aufbaus und ihrer Proteinstruktur unterscheiden.

#### 1.2.2 CD117/KIT

und Mastzellen ihre hämatopoetischen Vorläuferzellen exprimieren transmembran verlaufende Typ III Rezeptortyrosinkinase namens KIT oder auch CD117. 42, 43 KIT wurde erstmals 1986 als v-kit (virales kit), als Onkogen, welches von einem Sarkom-induzierenden Retrovirus exprimiert wird, beschrieben. 44 Die Aminosäurestruktur des Onkogens dieses Retrovirus ähnelte stark der schon zuvor bekannten Struktur anderer Rezeptortyrosinkinasen. Kurze Zeit später wurde c-kit, das zelluläre Homolog von v- kit, erstmals als Rezeptortyrosinkinase identifiziert. 45 Die strukturelle Ähnlichkeit von c-kit mit dem Rezeptor für macrophage growth factor (CSF-1) und dem platelet derived growth factor (PDGF) ließ vermuten, dass es sich bei c-kit auch um einen Wachstumsfaktorrezeptor handelt. Unklar blieb jedoch zunächst, welcher Ligand für die Aktivierung von c-kit verantwortlich ist. Diese Frage konnte kurze Zeit später beantwortet werden. 1990 wurde SCF als Ligand für c-kit identifiziert. <sup>46</sup> SCF kann entweder von Stromazellen auf ihrer Oberfläche exprimiert werden, oder als lösliches Molekül vorliegen. 47, 48 Die Aktivierung von c-kit durch SCF führt zur Ausreifung und Differenzierung der Zellen <sup>49</sup>. So stellt KIT einen notwendigen Schritt in der Entwicklung und Differenzierung der Mastzellen und ihrer Vorläuferzellen, sowie in der Migration der Mastzellen in ihr Zielgewebe, dar. 12,50

Auch erythrozytäre, leukozytäre und megakaryozytäre hämatopoetische Vorläuferzellen sowie intestinale Cajal-Zellen und Keimzellen exprimieren KIT, so dass KIT allgemein eine wichtige Rolle in der Entwicklung und Differenzierung hämatologischer und anderer Zellen spielt. <sup>51, 52</sup>

#### 1.2.2.1 Genetik und Aufbau von CD117/KIT

Das Gen, welches für KIT codiert, befindet sich beim Menschen auf dem langen Arm von Chromosom 4 (4q12). <sup>45</sup> Die molekulare Masse des Translationsproduktes beträgt 145kDa <sup>53, 54</sup> und der Rezeptor besteht aus 976 Aminosäuren und 21 Exons. <sup>45</sup> Abbildung 1 zeigt eine schematische Darstellung des KIT-Rezeptors.

Der KIT-Rezeptor besteht aus zwei Rezeptormonomeren, die bei Aktivierung dimerisieren. Ein Rezeptormonomer lässt sich in drei Bereiche gliedern, einen C-

terminalen intrazellulären, einen transmembranen und einen N-terminalen extrazellulären Anteil.

Der extrazelluläre Teil enthält die Bindungsstelle für den Liganden SCF und besteht aus insgesamt fünf Immunglobulin-ähnlichen Domänen. <sup>55, 56</sup> Während die ersten drei Immunglobulin-ähnlichen Domänen SCF binden, unterstützen die vierte und fünfte Domäne zunächst die Dimerisierung des Rezeptors bei Aktivierung und dienen später der Stabilisierung der Dimere. <sup>55, 57-61</sup> Die fünfte Immunglobulin-ähnlichen Domäne ist zudem an der proteolytischen Spaltung des Rezeptors von der Zelloberfläche beteiligt.

Die transmembrane Domäne besteht aus 23 vorwiegend hydrophoben Aminosäuren und verankert so den Rezeptor in der Membran.

Der C-terminale intrazelluläre Anteil des Rezeptors besteht aus zwei Anteilen, der Juxtamembrandomäne und der Tyrosinkinasedomäne. Die Juxtamembrandomäne enthält alphahelikale Elemente, welche als Bindungsstelle für eine Vielzahl von Signalproteinen dienen und eine autoinhibitorische Wirkung durch Herunterregulierung der Tyrosinphosphorylierung entfalten. 63-66

Die Tyrosinkinasedomäne ist durch ein Kinaseinsert in 2 Teile aufgeteilt und enthält eine ATP-Binderegion und eine Phosphotransferasedomäne. Sie stellt das Bindeglied zwischen Rezeptor und Signalmolekülen mit dem Rezeptor assoziierter *downstream pathways* dar und ist somit entscheidend für die Signaltransduktion. <sup>67</sup>

#### 1.2.2.2 Aktivierung und downstream-Pathways von CD 117/KIT

Zur Aktivierung des Rezeptors bindet SCF kovalent gleichzeitig an den extrazellulären Anteil von zwei Rezeptormonomeren. 61 Daraufhin kommt es zur Dimerisierung der Rezeptormonomere. <sup>58, 60</sup> Hierdurch liegen der transmembrane und der intrazelluläre Teil des Rezeptors näher aneinander, so dass die Transphosphorylierung der vereinfacht stattfinden kann. 64, Als **Tyrosinreste** erstes Juxtamembrandomäne phosphoryliert, wodurch ihre autoinhibitorische Wirkung außer Kraft gesetzt wird <sup>68</sup>. Weitere Phosporylierungen führen zu Konformationsänderungen und Aktivierung der intrinsischen Tyrosinkinasedomäne. zur Autophosphorylierung weiterer Tyrosinreste ermöglicht dann das Andocken von Adaptermolekülen (mit Src homology 2 (SH2) domains) an die Tyrosinkinasedomäne oder das Kinaseinsert. Beteiligte Proteine sind zum Beispiel die Pl3 Kinase <sup>70</sup>, Grb2 sowie Grb7. <sup>67</sup> Über diese Adaptermoleküle werden verschiedene intrazelluläre Signalkaskaden zum Beispiel der "Mitogen-Activated Protein Kinase" (MAPK) Signalweg, Pathways der Januskinase (JAK) oder der "Signal Transducer and Activator of Transcription" (STAT) Signalweg <sup>71</sup> in Gang gesetzt, welche letztendlich zur Proliferation, Differenzierung und Apoptoseresistenz der Zellen führen. <sup>60</sup>

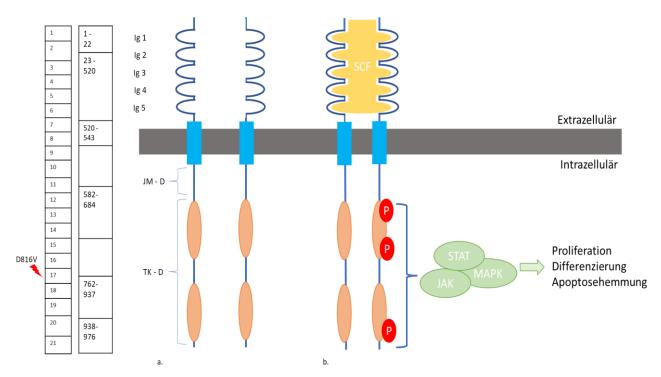


Abbildung 1: Schematische Darstellung des KIT-Rezeptors und seiner Funktionsweise

- **a.** Zwei Rezeptormonomere im inaktiven Zustand sind dargestellt. Extrazellulär befinden sich fünf Immunglobulin-ähnliche Domänen, intrazellulär sind zwei Tyrosinkinasedomänen, sowie die Juxtamembrandomäne dargestellt.
- **b.** Zwei dimerisierte Rezeptormonomere nach Bindung von SCF sind dargestellt. Phosphorylierte Tyrosinreste an der TK-D des Rezeptors fungieren als Bindungsstellen für Adaptermoleküle, welche downstream-Signalkaskaden über STAT, JAK oder MAPK in Gang setzen

**Roter Blitz:** Darstellung der D816V-Mutation in Exon 17 des *KIT*-Gens Abkürzungen: JM-D, Juxtamembrandomäne; TK-D, Tyrosinkinasedomänen; SCF, Stem Cell Factor; JAK, Januskinase; MAPK, MAP-Kinase; STAT, Signal traducer and activator of transcription; Ig, Immunglobulin-ähnliche Domäne; P, Phosphorylierte Tyrosinreste

#### 1.2.3 Mutationen in KIT

Da eine kontinuierliche, fehlgeleitete Aktivierung von *KIT* zu einer unkontrollierten Proliferation und somit zur Entartung der Mastzellen führt, wird das Gen, welches für den *KIT*-Rezeptor codiert, als Proto-Onkogen bezeichnet. Bisher sind einige

somatische Punktmutationen und in-frame Deletionen/Insertionen in diesem Gen bekannt, welche im Sinne einer "Gain of function"-Mutation zu einer dysregulierten ligandenunabhängigen Aktivierung des Rezeptors und so zu einer Veränderung der Signalweiterleitung durch den KIT-Rezeptor führen. 72-76 Durch diese Mutationen wird das Proto-Onkogen KIT zu einem aktiven Onkogen, welches zur neoplastischen Transformation der KIT exprimierenden Zellen führen kann. 77 Aufgrund des unterschiedlichen Mechanismus, welcher zur ligandenunabhängigen Aktivierung des KIT-Rezeptors führt, lassen sich zwei Formen von KIT-Mutationen unterscheiden. 78 Beim regulatorischen Typ, welcher zum Beispiel bei gastrointestinalen Stromatumoren aber auch bei Mastzellneoplasien zu finden ist <sup>79-81</sup>, liegen Mutationen im Exon 11 und 9 vor. Diese Mutationen führen durch die veränderte Struktur einer amphiphatischen Alphahelix zu einer verminderten Aktivität der autoinhibitorischen Juxtamembrandomäne, welche normalerweise bei fehlender Bindung des Liganden die enzymatische Funktion der Tyrosinkinasedomäne unterdrückt. 66, 78 Fällt die Autoinhibition durch die Juxtamembrandomäne weg, kommt es zur ständigen ligandenunabhängigen Autophosphorylierung und damit zur Aktivierung oben beschriebener Signalkaskaden. Beim zweiten Typ, dem "enzymatic pocket type", welcher bei der SM zu finden ist, ist die Mutation im Exon 17 lokalisiert und führt zu einer veränderten Struktur des "activation loops" am Eingang zur enzymatischen pocket an der Tyrosinkinasedomäne des Rezeptors. Hierdurch kommt es zur dauerhaften ligandenunabhängigen Aktivierung der Tyrosinkinasedomäne und auch hier als Folge zur konstitutiven Autophosphorylierungen und zur Ingangsetzung der downstream Signalkaskaden.

#### 1.2.3.1 KIT D816V Mutation

In über 90 % der Fälle können bei der SM Mutationen im *activation loop* der Tyrosinkinasedomäne von *KIT*, d.h. *"enzymatic pocket loop*" Mutationen nachgewiesen werden. Am häufigsten ist die *KIT* D816V Mutation, welche bei über 80 % der Patient\*innen mit SM zu finden ist. <sup>82</sup> Hierbei kommt es durch eine Punktmutation (Substitution der Base Adenin durch Thymin an Position 7176 der genomischen DNA im *KIT*-Gen) zu einem Aminosäureaustausch (Asparagin → Valin) im Codon 816 (D816V). <sup>73</sup> Die Mutation führt zu Konformationsänderungen im activation loop der Tyrosinkinasedomäne und daher, wie oben beschrieben, zur

dauerhaften Ingangsetzung der *downstream* Signalkaskaden. Es kommt zur unkontrollierten Proliferation und Degranulation, sowie zur gestörten Apoptose und Migration der Mastzellen. <sup>81, 83-85</sup> Die *KIT* D816V Mutation hat zudem therapeutische Relevanz, da sie zu einer Resistenz gegen den Tyrosinkinaseinhibitor Imatinib führt, welcher bei Patient\*innen mit *KIT* D816V Mutation keine therapeutische Option darstellt. <sup>85</sup>

## 1.3 Molekulargenetische Detektionsmethoden

## 1.3.1 Historie molekulargenetischer Detektionsmethoden bis zur PCR

Heutzutage spielen die Sequenzierung von DNA und der spezifische Nachweis von Mutationen mittels molekulargenetischer Detektionsmethoden eine große Rolle bei der Diagnostik, Klassifizierung und Therapie einer Vielzahl von Erkrankungen. Die ersten Nachweismethoden für DNA und RNA wurden in den 1970er und 80er Jahren als Blotbasierte Verfahren entwickelt (Abbildung 2). Beim Southern Blot wird DNA gelelektrophoretisch aufgetrennt und dann auf ein Nitrocellulosegel geblottet, wo spezifische DNA- Abschnitte mittels radioaktiver Sonden nachgewiesen werden können <sup>86</sup>. Der Northern Blot funktioniert nach demselben Prinzip für RNA. <sup>87</sup> Mit diesen Methoden lassen sich zwar spezifische DNA- und RNA-Moleküle nachweisen, jedoch werden große Mengen benötigt. Das Blotting ist mit einem Zeitaufwand von mehreren Tagen bis Wochen verbunden und die Spezifität des Nachweises ist vor allem aufgrund der Technik des Nachweises mittels radioaktiver Sonden oft limitiert, da die Sonden auch an DNA-Abschnitte binden, welche eine ähnliche Basensequenz aufweisen wie die Zielsequenz. <sup>88</sup>

1986 wurde erstmals die Polymerase Kettenreaktion (PCR), ein Verfahren zur in-vitro Amplifikation von DNA beschrieben. 89 Hierbei wird in wiederholt ablaufenden Zyklen, bestehend aus den 3 Phasen Denaturierung, Annealing und Elongation, DNA durch eine **DNA-Polymerase** vervielfältigt. Die **PCR** stellte im Hinblick auf molekulargenetische Detektionsmethoden einen Durchbruch dar, da sie es ermöglicht, kleinste Mengen an DNA im Pico- und Nanogramm-Bereich selbst ausgehend von einem einzigen DNA-Molekül zu vervielfältigen und nachzuweisen. <sup>90-92</sup> Zudem wurde es möglich, mehrere Proben und auch mehrere Genloci in einem PCR-Ansatz gleichzeitig, automatisiert und in kürzester Zeit zu vervielfältigen. 90

## 1.3.2 Prinzip der PCR

Die Polymerase Kettenreaktion ist wie in Punkt 1.3.1 beschrieben ein Verfahren zur exponentiellen Vervielfältigung von DNA-Abschnitten, welches *in vitro* und in Zyklen abläuft. Die zu amplifizierenden DNA-Abschnitte werden auch DNA-*templates* oder *targets* genannt. Kennt man die Basensequenz einer DNA oder cDNA, so kann man spezifisch bindende kurze Oligonukleotide, sogenannte Primer, herstellen, welche komplementär an die DNA bzw. cDNA binden und so einen Bereich flankieren, der amplifiziert werden soll. Der Primer, der am 3'-Ende des zu amplifizierenden DNA-bzw. cDNA-Stranges bindet, wird als Vorwärts (Forward)-Primer bezeichnet. Den Primer, der am 5'-Ende bindet, nennt man Rückwärts (Reverse)-Primer. Sobald die Primer komplementär an die DNA bzw. cDNA gebunden haben, kann eine DNA-Polymerase die fehlenden Nukleotide zwischen den beiden Primern anheften und so einen ganzen komplementären DNA-Strang synthetisieren.

Die PCR läuft in Zyklen ab. Jeder Zyklus beinhaltet dabei drei Schritte. Der erste Schritt ist die Denaturierung. Hier werden durch hohe Temperaturen (95°C) die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den beiden komplementären DNA- bzw. cDNA-Strängen gespalten. Übrig bleiben zwei Einzelstränge, an die die sequenzspezifischen Primer andocken können. Dies geschieht im zweiten Schritt, dem Die optimale Temperatur für das Annealing hängt von Basenzusammensetzung der Primer ab. Cytosin und Guanin benötigen höhere Temperaturen als Adenin und Thymin (A/T = 2 °C; C/G = 4 °C pro Base). So lässt sich anhand der Basenzusammensetzung die Schmelztemperatur (Tm) des spezifischen Primers und im nächsten Schritt die optimale Annealing-Temperatur errechnen, welche meist zwischen 45 und 65 °C liegt. Der dritte Schritt der PCR ist die Elongation. Hierbei wird die Temperatur auf 72°C erhöht, so dass die Tag-Polymerase an das 3'OH - Ende des Forward Primers binden und die im Reaktionsgemisch vorhandenen Desoxynukleotide in 5′ → 3′-Richtung einbauen kann. Je nach Länge des zu amplifizierenden DNA-Abschnittes wird die Elongationszeit angepasst. Nach der Elongationsphase beginnt ein neuer PCR-Zyklus mit einer neuerlichen Denaturierung. Da sich bei optimaler Effizienz der PCR mit jedem neuen Zyklus die Anzahl des zu amplifizierenden DNA-Abschnittes verdoppelt, spricht man von einer exponentiellen Vermehrung der DNA-Abschnitte. Durch die Akkumulation des Produktes und limitierte Mengen an Primern, Taq-Polymerase und dNTPs kommt es nach einer variablen Anzahl an PCR-Zyklen zu einer Plateauphase, in der keine exponentielle Vermehrung der DNA mehr stattfindet.

## 1.3.3 Erste Weiterentwicklungen der PCR

Die PCR als molekulargenetische Detektionsmethode wurde seit ihrer ersten Beschreibung vielfach weiterentwickelt und mittlerweile existieren viele verschiedene Varianten der Methode. Die erste Weiterentwicklung war der Ersatz der nicht hitzestabilen DNA-Polymerase durch ein hitzestabiles Enzym, die Taq-Polymerase, isoliert aus dem Bakterium Thermus aquaticus. <sup>93, 94</sup> Dies ermöglichte es, die Reaktion bei höheren Temperaturen ablaufen zu lassen, was eine bessere Effizienz, Spezifität und Sensitivität der Methode mit sich brachte. <sup>91</sup> Zudem musste die DNA-Polymerase nicht mehr nach jedem PCR-Zyklus ausgetauscht werden, was den Arbeits- und Zeitaufwand deutlich reduzierte und es ermöglichte, automatisierte Thermocycler-Systeme zu entwickeln. Da das Ergebnis der PCR maßgeblich von der Qualität der synthetisch hergestellten Oligonukleotide als Primer abhängt, war zudem die Entwicklung einfach zu bedienender Maschinen zur Herstellung und die Möglichkeit des kommerziellen Erwerbs von Oligonukleotiden ein wichtiger Schritt. <sup>95</sup>

#### 1.3.4 Quantitative PCR

Bei der herkömmlichen PCR ist lediglich eine rein qualitative Aussage über das Vorhandensein oder nicht Vorhandensein einer bestimmten Mutation oder eines Gens möglich. Da es vor allem für Genexpressionsanalysen oder infektiologische Fragestellungen wichtig ist, eine quantitative Aussage über die Menge an eingesetzter DNA oder cDNA machen zu können, wurden schon bald nach der Erstbeschreibung der PCR-Methode quantitative PCR-Methoden entwickelt. Eine Quantifizierung der DNA kann über verschiedene Wege vorgenommen werden.

Die am häufigsten verwendete Methode ist die kinetische Methode, bei der die Verdünnungsreihe einer internen Kontrolle mit dem eigentlichen target koamplifiziert und anschließend anhand der Mengen an interner Kontrolle während der exponentiellen Phase der PCR eine Standardkurve berechnet wird. Anhand dieser kann eine relative Quantifizierung des targets vorgenommen werden. <sup>96-102</sup> Bei dieser

Methode kann im Vergleich zur Endpoint-Methode, bei der nach einer bestimmten Anzahl an Zyklen lediglich die Menge des Amplifikationsproduktes gemessen wird, die Effizienz der PCR berechnet und die Menge des eingesetzten targets genauer bestimmt werden. Als interne Kontrolle können entweder Referenz/housekeeping-Gene wie beta 2 Mikroglobulin, Aktine, die Dihydrofolatreduktase oder die Glyceraldehydreduktase, welche in konstanter Menge ubiquitär in Zellen exprimiert werden 103, 104, oder andere *in vitro* hergestellte zum Beispiel in Plasmide geklonte Gensequenzen verwendet werden. 105-107 Der Vorteil der *in vitro* hergestellten Gensequenzen besteht darin, dass man Sequenzen verwenden kann, die durch die gleichen Primer wie das *template* amplifiziert werden und einen ähnlichen Anteil an Guanin und Cytosin sowie eine ähnliche Länge besitzen. So können Fehler durch unterschiedlich effiziente Primer vermieden werden. Zudem kann die Expression von *housekeeping* Genen variieren, weshalb sie vor allem für den quantitativen Nachweis von RNA durch RT-PCR als interne Kontrolle nicht immer geeignet sind. 108, 109

Bis zur Entwicklung der real-time PCR fand die eigentliche Quantifizierung der DNA erst nach der PCR durch Gelelektrophorese und Färbung mit Ethidiumbromid, Blotting mit Hybridisierung oder Kapillarzonenelektrophorese statt. <sup>110-112</sup> Dies stellte einen erheblichen Arbeits- und Zeitaufwand dar und barg das Risiko von Carry-Over-Kontamination der Proben, so dass die PCR noch nicht als Routinemethode zur klinischen Diagnostik, sondern lediglich zu Forschungszwecken eingesetzt werden konnte.

## 1.3.5 Quantitative real-time PCR (qPCR)

1992 wurde erstmals eine real-time PCR-Methode (qPCR) beschrieben, bei der schon während der PCR durch Zugabe von Ethidiumbromid anhand von Fluoreszenzsignalen ein qualitativer Nachweis von DNA gelang. <sup>113</sup> Dabei interkaliert Ethidiumbromid mit DNA und erzeugt ein Fluoreszenzsignal. Der Nachteil hierbei bestand darin, dass es die DNA nicht spezifisch an einer bestimmten Stelle bindet und dass es die Effizienz der PCR beeinflussen kann. Eine erste Methode zur quantitativen Bestimmung von DNA in real time wurde 1996 beschrieben. <sup>114, 115</sup> Hierbei wurde die Quantifizierung anhand von Fluoreszenzsignalen, welche durch fluoreszenzmarkierte Oligonukleotide, sogenannte Sonden, entstehen, vorgenommen. Die Sonden hybridisieren spezifisch mit dem zu amplifizierenden DNA-Abschnitt und generieren

ein Fluoreszenzsignal, welches die Menge an Amplifikationsprodukt widerspiegelt. Zu Beginn ist das Signal schwach und kann nicht vom Hintergrundrauschen unterschieden werden. Das Signal steigt exponentiell an und erreicht letztendlich durch die sich erschöpfende Menge an Primern, dNTPs oder Sonden eine Plateauphase. Je nach Menge an ursprünglich eingesetzter DNA erreicht das Fluoreszenzsignal nach unterschiedlich vielen PCR-Zyklen einen Schwellenwert (Ct-Wert). Die Quantifizierung wird anhand einer Standardkurve eines internen Standards vorgenommen. Anhand der Standardkurve wird auch die Effizienz der PCR berechnet, welche ein wichtiges Qualitätskriterium darstellt. Die Berechnung der Effizienz erfolgt automatisch mittels der qPCR-Software. Hierbei werden die Ct-Werte der Verdünnungsreihe des Standards logarithmisch gegen die Konzentrationen der Verdünnungsreihe aufgetragen. Im Anschluss wird eine lineare Regressionskurve erstellt und deren Steigung (slope) berechnet. Anhand der Formel E =  $10 ^ (-1/slope)$ wird die Effizienz der PCR berechnet, wobei 90 % als Mindestwert gilt. Ein weiterer Parameter ist der Korrelationskoeffizient R2, welcher aussagt wie sich mittels des Ctbestimmten Verdünnungsstufe, der Ct-Wert Werts einer einer anderen Verdünnungsstufe vorhersagen lässt.

Die qPCR stellt auch heute noch, aufgrund ihrer Einfachheit, Geschwindigkeit, Sensitivität und Spezifität die Grundlage der meisten quantitativen Bestimmungen von DNA dar. Über die Jahre wurden die Detektionssysteme für Fluoreszenz und die PCR-Assays weiterentwickelt, so dass die Sensitivität und Spezifität der Methode weiter verbessert werden konnten. Genutzt wird die qPCR in der Medizin vor allem zur Diagnostik und zum Therapiemonitoring bei infektiologischen und onkologischen Fragestellungen, für Genexpressionsanalysen (siehe Punkt 1.1.4), zur Detektion von single nucleotide polymorphisms (SNPs) und zur Analyse chromosomaler Aberrationen. Als Forschungsmethode spielt sie zudem eine wichtige Rolle in der Landwirtschaft, Pharmakologie und Toxikologie, Biomedizin, Biotechnologie und Mikrobiologie.

## 1.3.6 LightCycler- und TaqMan

Zur Durchführung und Auswertung einer qPCR benötigt man einen Thermocycler, der die Reaktion erhitzt und abkühlt, eine Lichtquelle, ein Detektionssystem für Fluoreszenz und eine Software für die Auswertung und Abbildung der

Fluoreszenzsignale. Mittlerweile gibt es verschiedene Formen von Thermocyclern und Techniken zur Erzeugung und Detektion von Fluoreszenzsignalen. Im Folgenden sollen das LightCycler (LC)-System und das TagMan System näher erläutert werden, da beide in der vorliegenden Arbeit zur Anwendung kamen. Beide Systeme verwenden fluoreszenzmarkierte Oligonukleotide, sogenannte Sonden, welche zur Erzeugung von Fluoreszenzsignalen spezifisch mit der DNA hybridisieren. Im LC-System handelt es sich um zwei Hybridisierungssonden, eine Donor- und eine Akzeptorsonde. Beide Sonden hybridisieren während der Annealingphase der PCR spezifisch an den zu amplifizierenden DNA-Strang, die Donorsonde wird durch die Lichtquelle angeregt, überträgt das Signal per FRET (Förster-Resonanzenergietransfer) Akzeptorsonde und dessen Signal wird detektiert. <sup>116</sup> Zudem werden beim LC-System Glaskapillaren und eine Thermokammer, in welcher Luft erhitzt und abgekühlt wird, verwendet. Im TagMan-System gibt es nur eine Sonde, eine Hydrolysierungssonde, welche am 5'-Ende einen Reporter und am 3'- Ende einen Quencher-Farbstoff, enthält. Solange die Sonde intakt ist, wird das Signal des Reporters durch den Quencher ausgelöscht. Die Sonde hybridisiert während der Annealingphase spezifisch mit dem target. Während der Elongationsphase wird sie durch die 5'- 3'-Exonukleaseaktivität der Taq-Polymerase hydrolysiert, Reporter und Quencher entfernen sich voneinander und ein Fluoreszenzsignal kann detektiert werden <sup>117</sup>. Beide Systeme haben ihre Vor- und Nachteile. Das LC-System bietet den Vorteil, dass es sehr schnell erhitzen und abkühlen kann, die PCR also schneller abläuft <sup>118</sup>. Ein Nachteil ist, dass hierbei zwei Sonden anstatt der einen wie beim TaqMan benötigt werden. Dies erhöht das Risiko unspezifischer Bindungen und macht das Design der Sonden komplizierter, da jede einzelne Sonde spezifische Voraussetzung, z.B. im Hinblick auf die Schmelztemperatur, erfüllen muss. Weitere Unterschiede ergeben sich durch die Computersoftware, welche die Analysen durchführt. Hier besteht der Vorteil der TaqMan-Software (ABI PRISM 7700 SDS) in einem höheren Grad an Automatisierung durch einen gleichbleibenden Algorithmus zur Quantifizierung. Dies ist vor allem im Hinblick auf Routinediagnostik von Vorteil. Im Vergleich dazu bietet die LC-Software mehr Flexibilität und Geschwindigkeit. 119

## 1.3.7 Digitale PCR

Zwei wesentliche Nachteile der gPCR bestehen darin, dass immer ein interner Standard und die Berechnung der Effizienz der PCR für die Quantifizierung benötigt werden. Beides birgt ein Fehlerrisiko. Die digitale PCR verzichtet auf den Einsatz von Standards. Hierbei wird die Probe per Zufall, nach der Poisson-Verteilung, in ca. 20.000 kleinere Einheiten, sogenannte Partitionen, aufgeteilt, in denen die PCR mit Sonden und Primern, analog der real time PCR abläuft. Nach Beendigung aller PCR-Zyklen wird mittels eines Durchflusszytometers die Fluoreszenz in jeder einzelnen Partition gemessen. War das target in der Partition vorhanden, ist ein Fluoreszenzsignal zu messen, die Partition ist positiv und bekommt die Nummerierung "1", war das target nicht vorhanden ist keine Fluoreszenz messbar, die Partition ist negativ und bekommt die Nummerierung "0". Aufgrund der binären Markierung der Partitionen mit den Ziffern 0 und 1 nannte man die Methode digitale PCR. Die Anzahl an positiven und negativen Partitionen wird gezählt. Die Anzahl der target-Moleküle wird im Anschluss von der Software anhand der Poisson-Verteilung errechnet. Die Effizienz der PCR spielt somit keine Rolle, da es sich um eine Endpoint-Messung handelt. 120, 121

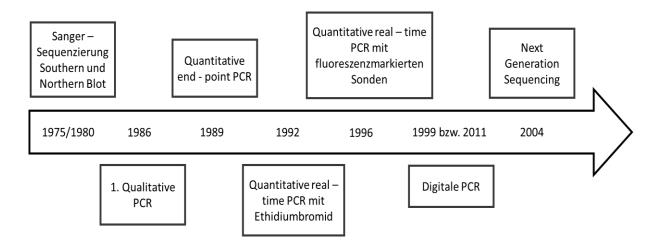


Abbildung 2: Historie molekulargenetischer Detektionsmethoden

Der Zeitstrahl zeigt den zeitlichen Ablauf der nacheinander entwickelten molekulargenetischen Detektionsmethoden, angefangen von den Blot-basierten Verfahren, über die verschiedenen PCR-Methoden, bis hin zum Next Generation Sequencing.

## 1.3.8 Messungen auf gDNA- und RNA/cDNA-Ebene

Auch RNA kann nach reverser Transkription als cDNA als template für die real-time PCR dienen. In diesem Fall spricht man von Reverse Transcription gPCR (RT-gPCR). <sup>122-124</sup> Nur Gene, die tatsächlich exprimiert werden, liegen in Form von RNA vor. So kann mittels RT-qPCR nicht nur das Vorhandensein genomischer DNA detektiert, sondern auch eine Aussage über die Expression der Gene gemacht werden. Die Expression von Genen kann über Microarrays oder über RT-qPCR analysiert werden. Sollen nur einzelne Gene untersucht werden, ist die RT-gPCR den Microarrays im Hinblick auf die Sensitivität überlegen. Geht es um komplexe Systeme und die Analyse vieler Gene gleichzeitig, sind die Microarrays im Vorteil. Häufig werden sie vor der RTqPCR genutzt, um Gene zu identifizieren, die später mit der RT-qPCR genauer untersucht werden. Genexpressionsanalysen spielen zum einen eine Rolle beim Monitoring biologischer Antworten auf verschiedene Stimuli z.B. für das Immunsystem. <sup>125, 126</sup> Zum anderen sind sie auch zunehmend relevant für die Diagnostik und das Monitoring maligner Erkrankungen. 127 Die Allellast auf RNA/cDNA-Ebene, d.h. die Expression mutierter Gene, wird hierbei als expressed allele burden (EAB) bezeichnet. Die Allellast auf Ebene genomischer DNA (gDNA) wird als variant allele frequency (VAF) bezeichnet. Ist der EAB erhöht, spricht das für eine erhöhte transkriptionelle Aktivität und damit für eine stärkere Aktivität dieser Gene. Bei der SM korreliert der KIT D816V EAB mit der Krankheitsaktivität, dem Subtyp und daher auch mit dem Gesamtüberleben. 128 Der Kennwert ist zudem hilfreich zum Monitoring der residual disease nach Chemotherapie oder Allografting 129 und kann als unabhängiger Marker für das Ansprechen auf eine Therapie mit Midostaurin genutzt werden. 130, 131 Die Entwicklung möglichst sensitiver und spezifischer Nachweismethoden für den EAB ist daher relevant für die Prognose und das therapeutische Prozedere der SM. Auch bei anderen myeloischen Neoplasien konnten Unterschiede der Mutationslevel auf gDNA und cDNA-Ebene gefunden werden. Die Mutationslevel auf cDNA-Ebene waren hierbei signifikant höher als die auf gDNA-Ebene, was auf eine bessere Sensitivität dieser Assays hinweisen könnte und hervorhebt, dass es für Prognose und Phänotyp der Erkrankung einen Unterschied macht, ob auf gDNA- oder RNA/cDNA-Ebene getestet wird. 132-134 Ein Nachteil der Testung auf RNA/cDNA-Ebene besteht darin, dass formalinfixierte Biopsien nicht oder nur schlecht für die cDNA-Synthese genutzt werden können, dass das Ergebnis sehr stark von der Qualität der RNA abhängig ist und die cDNA-Synthese einen Schritt vor der eigentlichen PCR darstellt, welcher

fehlerbehaftet sein kann. <sup>135, 136</sup> RNA ist instabiler als DNA und ihre Lagerung und Aufarbeitung bedarf größter Sorgfalt und Genauigkeit. Aufgrund unterschiedlicher optimaler Reaktionsbedingungen sind one-step RT-qPCRs, bei denen die reverse Transkription und die real-time PCR in einem stattfinden, in der Regel weniger sensitiv. <sup>137</sup> Eine weitere Schwierigkeit bei Messungen auf RNA/cDNA-Ebene besteht darin, dass die Expression von Genen auf einem komplexen Zusammenspiel aus extrinsischen und intrinsischen Stimuli und darauffolgenden Signalkaskaden basiert. Sie ist somit kontextabhängig und kann selbst zwischen Zellen des gleichen Typs stark variieren.

## 1.4 Zielsetzungen der Arbeit

Die *KIT* D816V Mutation spielt eine wesentliche Rolle in der Pathophysiologie, Diagnostik, Prognose und Therapie der SM (siehe 1.2.3.1). Ob auf gDNA-oder cDNA-Ebene, der sensitive und spezifische Nachweis von *KIT* D816V ist für die Therapieplanung und das Therapiemonitoring von entscheidender Bedeutung. Gerade weil die Mutationslevel bei der SM oft gering sind, sind konventionelle Sequenzierungsmethoden, aufgrund ihrer geringen Sensitivität, nicht geeignet. <sup>138</sup> Daher wurden sensitivere, PCR-basierte, Methoden entwickelt. <sup>129, 139, 140</sup> Diese werden kontinuierlich weiterentwickelt, da sich sowohl die Technologie als auch das Wissen im Hinblick auf molekulargenetische Detektionsmethoden stetig verbessert. Es bedarf regelmäßiger Etablierung neuer PCR-Assays, welche dem aktuellen Stand der Technik und des Wissens über die PCR-Methode Rechnung tragen. gDNA-basierte quantitative Assays zum Nachweis der *KIT* D816V-Mutation sind aktuell weiter verbreitet als RNA/cDNA-basierte Assays. <sup>141</sup> Folglich existiert bisher eine unzureichende Datenbasis zur Korrelation zwischen gDNA- und RNA/cDNA-basierten quantitativen Auswertungsverfahren. <sup>40, 129, 142-144</sup>

Das erste Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung und Validierung einer auf der Taqman-Methode basierenden real-time PCR zur Detektion von *KIT* D816V auf cDNA-Ebene.

Das zweite Ziel dieser Arbeit war die Beantwortung der Fragen, (i) inwiefern die *KIT* D816V Allellast auf RNA/cDNA und gDNA-Ebene bei unterschiedlichen Subtypen der SM miteinander korrelieren und (ii) ob sich anhand der *KIT* D816V Allellast auf

## Einleitung

RNA/cDNA-Ebene prognostische Aussagen im Hinblick auf das Gesamtüberleben treffen lassen.

# 2 Material und Methoden

## 2.1 Material

# 2.1.1 Geräte

Geräte	Firma	Firmensitz
Centrifuge 5404 R	Eppendorf AG	Hamburg, D
Centrifuge 5804 R	Eppendorf AG	Hamburg, D
Digital Vortex Mixer	VWR International GmBH	Darmstadt, D
Thermocycler	Eppendorf AG	Hamburg, D
Mastercycler		
Heizblock	Eppendorf AG	Hamburg, D
(Thermomixer		
compact)		
Centrifuge 5417R	Eppendorf AG	Hamburg, D
Maxwell® 16LEV	Promega	Mannheim, D
Nanodrop® ND - 1000	NanoDrop	Wilmington, USA
Vi - Cell XR	Beckman Coulter GmbH	Krefeld, D
Falconröhrchen	VWR International GmBH	Darmstadt, D
Maxwell® 16LEV	TECAN Group	Männedorf, CH
LightCycler® und 1.5	Roche	Mannheim, D
LightCycler®	Roche	Mannheim, D
Carsousel Centrifuge		
ProFlex™ 2x96-well	Thermo Fisher Scientific, Inc.	Waltham, USA
PCR System		
QuantStudio™ 3D	Thermo Fisher Scientific, Inc.	Waltham, USA
Digital PCR System		
QIAcube	Qiagen	Hilden, D
QuantStudio™ 3D	Thermo Fisher Scientific, Inc.	Waltham, USA
Digital PCR Chip		
Loader		
sigma 1-14 centrifuge	SIGMA	Kawasaki, JPN
MicroAmp <sup>®</sup> Fast	Life Technologies GmbH	Darmstadt, D
optical 96-Well		

Reaction Platewith		
Barcode (0,1ml)		
Solution Baisins	Biologix	Lenexa, USA
microAmp <sup>™</sup> optical	Thermo Fisher Scientific, Inc.	Darmstadt, D
Adhesive Film		
750 Fast Real Time	Life Technologies GmbH	Darmstadt, D
PCR System		
Safe Lock	Eppendorf AG	Hamburg, D
Reaktionsgefäße 0,5		
ml		
Multipipette mit 1ml	Eppendorf AG	Hamburg, D
und 5ml Aufsatz		
3,5ml Transferpipette	Eppendorf AG	Hamburg, D
(Pasteurpipette)		
1,5ml	Eppendorf AG	Hamburg, D
Reaktionsgefäße		
(farblos) mit Deckel		
1,6ml	Eppendorf AG	Hamburg, D
Reaktionsgefäße		
(orange) mit Deckel		
2ml Reaktionsgefäße	Eppendorf AG	Hamburg, D
mit Deckel		
50ml Reaktionsgefäße	Eppendorf AG	Hamburg, D
20μΙ, 100μΙ, 200 μΙ,	Eppendorf AG	Hamburg, D
1000l und 5000µl		
Pipette		
Filter Tips 10µl, 20µl,	Eppendorf AG	Hamburg, D
100µl, 200µl,		
1000µl,5000µl		
(Pipettenspitzen)		
2ml Spitzen	Eppendorf AG	Hamburg, D
Eppendorf	Eppendorf AG	Hamburg, D
Varispensor (max		

2,5ml) mit brauner 0,5		
I Schottflasche		
1,5 ml Eppendorf	Eppendorf AG	Hamburg, D
Reaktionsgefäße		
Pipettierhilfe	Hirschmann-Laborgeräte	Eberstadt, D
(Pipetus®)		
Neubauer-	Brand GmbH	Wertheim, D
Zählkammer		
Laborfuge 400e	Heraeus	Hanau, D
Zentrifuge Mini star	VWR International GmbH	Darmstadt, D
Zentrifugeneinsätze	Heraeus	Hanau, D
Wasserbad (SW20C)	Julabo Labortechnik GmbH	Seelbach, D

# 2.1.2 Chemikalien

Chemikalien	Firma	Firmensitz	
TRIzol,	Thermo Fisher Scientific, Inc.	Darmstadt, D	
gebrauchsfertig			
RNAprotect Cell	Qiagen	Germantown, USA	
Reagent			
Chloroform (100 %)	Merck Chemicals GmbH	Darmstadt, D	
Ethanol absolut;	VWR International GmbH	Darmstadt, D	
vorgekühlt: 100 %, 75			
%			
RNAsin	Promega	Mannheim, D	
BSA, Molecular	New England Biolabs GmbH	Frankfurt am Main, D	
Biology Grade 20			
mg/ml			
Nuclease Free Water	New England Biolabs GmbH	Frankfurt am Main, D	
Tryptan Blue Solution	Thermo Fisher Scientific, Inc.	Darmstadt, D	
NEBuffer ™ Set	New England Biolabs GmbH	Frankfurt am Main, D	
CutSmart Buffer	New England Biolabs GmbH	Frankfurt am Main, D	
20 x TE Puffer	Thermo Fisher Scientific, Inc.	Darmstadt, D	

GIT (Guanidine	Merck	Taufkirchen, D
thiocyanate)		

# 2.1.3 Plasmide

Plasmid	Details	Firmensitz
KIT_D816V	Länge: 788bp; Cloning	Wilmington, USA
	Vector: pBluescript II SK8+);	
	Cloning Sites: XBAI-BAMHI,	
	Biomatik	
pCR <sup>®</sup> 2.1-TOPO <sup>®</sup>	Thermo Fisher Scientific, Inc.	Darmstadt, D

# 2.1.4 KIT-Systeme

KIT Systeme	Firma	Firmensitz
dNTP Mix	Thermo Fisher Scientific, Inc.	Darmstadt, D
Maxwell 16 LEV	Promega	Mannheim, D
simplyRNA BloodKit		
TaqMan® Fast	Thermo Fisher Scientific, Inc.	Darmstadt, D
Advanced Master Mix		
Quant -	Life Techologies GmbH	Darmstadt, D
iT™PiccoGreen® ds		
DNA Assay Kit		
LightCycler® Faststart	Roche	Mannheim, D
Plus KIT		
QuantStudio 3D	Thermo Fisher Scientific, Inc.	Darmstadt, D
Digital Master Mix v2		
QuantStudio 3D	Thermo Fisher Scientific, Inc.	Darmstadt, D
Digital PCR 20K Chip		
Kit v2		
QIAamp DNA Blood	Qiagen	Hilden, D
Mini Kit		
QIAamp DNA Mini Kit	Qiagen	Hilden, D

KIT_1314	Thermo Fisher Scientific, Inc.	Darmstadt, D
(Sonde/Primer Mix für		
dPCR)		

# 2.1.5 Primer/Synthetische Oligonukleotide

Primer	Firma	Firmensitz
CK16F4 Primer 5'TGGCTTTCCTCGCCTCCAAG3'	eurofins	Ebersberg, D
(20)	Genomics	
CK17FM Primer	eurofins	Ebersberg, D
5'TTGTGATTTTGGTCTAGCCAGGGT (24)	Genomics	
CK20R Primer 5'ATCTGCATCCCAGCAAGTCTTC	eurofins	Ebersberg, D
(22)	Genomics	
TaqCKProbe	eurofins	Ebersberg, D
5'ACTGTGTATACACGTTTGAAAGTGACGTCTGG3'	Genomics	
(32)		

## 2.1.6 PCR-Sonden

PCR - Sonden	Firma	Firmensitz
TaqCKProbe mit Sequenz 5'- 3':	Eurofins	LUX
ACTGTGTATACACGTTTGAAAGTGACGT CTGG	Scientific SE	
Modifikation: 5'FAM, 3'MGBEQ		
LightCycler® Sonden:	Eurofins	LUX
CK18FL:	Scientific SE	
AAGTGGATGGCACCTGAAAGCATTTTC-		
Fluorescein		
CK18LC LC-RED-640		

ACTGTGTATACACGTTTGAAAGTGAC	
GTCTGG-P	

# 2.1.7 Enzyme

Enzyme	Firma	Firmensitz
Reverse Transkriptase	Thermo Fisher Scientific, Inc.	Darmstadt, D
Taq DNA Polymerase	Thermo Fisher Scientific, Inc.	Darmstadt, D
(5U/μL)		
KpnI-HF <sup>®</sup>	New England Biolabs GmbH	Frankfurt am Main, D
(Restriktionsenzym;		
GGTACC)		

# 2.1.8 Puffer und Lösungen

Puffer	Zusammensetzung	
10 x Lysispuffer	82,91 g NH <sub>4</sub> CL [1,55]; 7,91 g NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub> [0,1M];	
	2mIEDTA pH8 [0,5M]	
cDNA Mix	5X First Strand Buffer [250 mM Tris-HCl (pH 8.3)],	
	375 mM KCl,	
	15 mM Magnesium Chlorid	
	100 mM DTT	
	200 U/μI M-MLV	
	200 μg/ml P(dN)6 Primer	
	1,9 mM dNTP-Mix	
	1,4 x 104 U/ml M-MLC Reverse Transkriptase	
	1400 U/ml Rnasin	
GIT -	1 Flasche GIT 4 M 13,2 ml Na-Citrat pH 7; 1 M [25	
Homogenisierungspuffer	nM], 5 ml EDTA pH 8; 0,5 M [5 nM], 25,6 ml N-	
	Lauroylsarkosine 10 %, 287,5 ml ddH2O	
PBS (Phosphatpuffer)	11,4 g Na2HPO4 x 2H2O	
	4,9 g KH2PO4	

## Material und Methoden

TER - Puffer	125 µl rRNA (16S and 23S von Roche Diagnostics
	GmbH) + 25ml 1x TE
1x TBE-Puffer	500 ml 10x TBE-Puffer 5 l ddH2O
10x TBE-Puffer (Trisborat-	216 g Trizma Base, 108 g Boriacid, 80 ml EDTA pH
EDTA)	8, 0,5 M, 2 I ddH2O
RPMI 1640 Medium (für	10% FKS, 2% Glutamin, 1% Pen/Strep
Zellkultur)	(Penicillin/Streptomycin)
GITC/β-Mercaptoethanol-	7,1μl β-Mercaptoethanol, 0,37g CsCl, 1ml GITC-
Puffer	Lösung

# 2.1.9 Software

Software	Firma	Firmensitz
Applied Biosystems®	Applied Biosystems	Massachusetts, USA
7500 Fast Real - Time		
PCR System		
LightCycler <sup>™</sup> Systems	Roche Diagnostics	Mannheim, D
QuantStudio 3D	Thermo Fisher Scientific, Inc.	Darmstadt, D
AnalysisSuite Cloud		
Software		
Microsoft® OfficeTM	Microsoft	Washington, USA
2010, 2016		
SPSS Statistics 23	IBM	Armonk, USA
GraphPad Prism 6	GraphPad Software, Inc.	La Jolla, USA
Ikaros MetaSystems	Isis MetaSystems	Altlussheim, D
Adobe® Photoshop®	Adobe Systems Inc.	Delaware, USA
7.0		
Software	BioRad Laboratories GmbH	München, D
ImageLabTM, 3.0.1		
Quant-iT™	Thermo Fisher Scientific, Inc.	Darmstadt, D
PicoGreen™		
simplyRNA Blood	TECAN Group	Männedorf, CH

## 2.1.10 Patient\*innenenproben für die Etablierung der TagMan-gPCR

Die Patient\*innenproben, welche für die Bestimmung der *KIT* D816V Allellast auf cDNA-Ebene mittels TaqMan-Technik verwendet wurden, wurden aus PB von 116 Patient\*innen mit gesicherter *KIT* D816V positiver SM gewonnen. Alle Patient\*innen erfüllten die molekulargenetischen sowie histologischen Diagnosekriterien der WHO (WHO 2016) für die SM. Das Patient\*innenkollektiv umfasste folgende Diagnosen: ASM (n=14), ISM (n=30), MCL (n=5), SM MDS/MPN-U (n=23), SM-CMML (n=14), SM-AML (n=1), SM-12 JAk2 pos. MPN und MGUS (n=1), SSM (n=9), SM-MDS (n=5), SM-HES/CEL (n=3), SM-MPN-U (n=2), SM-HES/CEL (n=2) und SM-undefined (n=2), SM-AHN not specified (n=5). Das Patient\*innenkollektiv bestand aus Patient\*innen der III. Medizinischen Klinik der Universitätsmedizin Mannheim und externen Einsendern. Nach umfangreicher Aufklärung gaben alle Patient\*innen im Rahmen des "Deutschen Registers für Erkrankungen der Eosinophilen und Mastzellen" (GREM) ihr schriftliches Einverständnis. Als Negativkontrollen dienten 74 Proben von gesichert *KIT* D816V negativen gesunden Spender\*innen (n=24) und von gesichert *KIT* D816V negativen Patient\*innen mit anderen hämatologischen Entitäten (n=50).

## 2.1.11 Patient\*innen für die Bestimmung des EAB/VAF Koeffizienten

Alle Patient\*innen wurden anhand der WHO-Klassifikation von 2016 diagnostiziert und eingeteilt sowie im GREM registriert. Die Datensammlung erfolgte im Einklang mit der Deklaration von Helsinki und wurde von einer Prüfungskommission der Medizinischen Fakultät Mannheim der Universität Heidelberg genehmigt.

## 2.2 Methoden

## 2.2.1 Leukozytenisolation aus PB mittels Erythrozytenlyse

Menschliches Vollblut enthält als zelluläre Bestandteile Erythrozyten, Thrombozyten und Leukozyten. Die in dieser Arbeit verwendete RNA bzw. DNA wurde ausschließlich aus den kernhaltigen Zellen, den Leukozyten, gewonnen. Um die reinen Leukozyten zu isolieren, mussten zunächst die Erythrozyten lysiert werden (Erythrozytenlyse). Hierfür macht man sich das Prinzip der Osmose zunutze. Ein stark hypoosmolarer Lysispuffer wird mit dem PB gemischt. Daraufhin kommt es zu einem Flüssigkeitsstrom entlang des osmotischen Gradienten hinein in die Erythrozyten. Dies führt zur Schwellung und zum letztendlichen Platzen der Erythrozyten. Da die Leukozyten ein stabileres Zytoskelett, sowie mehr transmembrane Proteine enthalten, bleiben sie in ihrer Form und Struktur erhalten.

In der vorliegenden Arbeit wurden 10 ml PB mit 1 x Lysispuffer auf 45 ml Gesamtvolumen aufgefüllt. Nach zehnminütiger Inkubation auf Eis wurde der Ansatz 10 min bei 1200 rpm und 4°C zentrifugiert. Durch Wiederholung dieses Vorgangs setzten sich die Leukozyten als weißes Pellet ab. Darüber bildeten die hämolysierten Erythrozyten einen durchsichtigen rötlichen Überstand, welcher abpipettiert werden konnte. Zuletzt wurde das Leukozytenpellet mit 25 ml 1 x PBS gewaschen und 5 min bei 1200 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet über Kopf getrocknet und auf Eis gestellt.

#### 2.2.2 DNA-Isolation mittels QIAcube

Nach der Leukozytenisolation wurden 1 x 10<sup>7</sup> Zellen mit 400 µl GIT/beta-Mercaptoethanol-Puffer gemischt und durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren mechanisch aufgeschlossen. Im Anschluss daran wurden alle für die Extraktion notwendigen Chemikalien aus dem "QIAamp DNA Blood Mini KIT" von Qiagen den Proben, entsprechend der Herstelleranweisungen, hinzugefügt und in den QIAcube gestellt. Im QIAcube laufen die Schritte zur DNA-Isolation automatisiert ab. Zunächst wurden die Zellen lysiert. Die frei gewordene DNA kann daraufhin an eine Aufreinigungsmatrix binden und mittels mehrerer Waschschritte aufgereinigt werden. Der letzte Schritt ist die Elution der DNA in Eppendorf Gefäße.

#### 2.2.3 RNA-Isolation

#### 2.2.3.1 RNA-Isolation mittels Maxwell

Bei der RNA-Isolation mittels Maxwell® handelt es sich um eine Methode, bei der die verschiedenen Schritte der RNA-Isolation automatisiert ablaufen. Zunächst werden die Zellen in einem chemischen Medium lysiert, in dem es schnell zur Denaturierung von RNAsen kommt. Anschließend kommt es zur Denaturierung von Nukleinsäure-komplexen und zur spezifischen Bindung von RNA mittels paramagnetischer Partikel. Im weiteren Verlauf wird eine mögliche Kontamination mit genomischer DNA entfernt. In der vorliegenden Arbeit wurden 2 x 10<sup>7</sup> Zellen mit 200 µl Homogenisierungslösung (verbrauchsfertig aus Maxwell® 16 LEV simplyRNA Blood KIT unter Zugabe von 600 µl 1-Thioglycerol) vermengt, 30 s gevortext und mechanisch aufgeschlossen. Im nächsten Schritt wurde zu jeder Probe 200 µl Lysispuffer und 25 µl Proteinkinase K hinzugefügt, gevortext, anzentrifugiert und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Daraufhin wurde das Gerät (Maxwell® 16LEV) gemäß der Beschreibung des

Herstellers beladen und das Programm "simplyRNA Blood" gestartet.

#### 2.2.3.2 RNA-Isolation mittels TRIzol®

RNA, DNA und Proteine zeigen in organischen und wässrigen Lösungen ein unterschiedliches Löslichkeitsverhalten. Dies macht man sich bei der RNA-Isolation mittels TRIzol®, welche auf dem Prinzip der sauren Phenol-Chloroform-Guanidinisothiocyanat-Extraktion von Chomoczynski und Sacchi beruht, zunutze <sup>145</sup>. Hierbei kommt es nach Zugabe von Phenol-Chloroform-Guanidinisothiocyanat-Lösung zu einer Phasentrennung. Das bedeutet, DNA, RNA und Proteine setzen sich jeweils, aufgrund ihrer unterschiedlichen Löslichkeit, in einer anderen Schicht ab. Das im TRIzol® vorhandene Guanidinisocyanat führt zur Zelllyse und Inaktivierung von RNAsen, das Phenol bringt Proteine in Lösung und durch Zugabe von Chloroform und anschließende Zentrifugation kommt es zur Phasentrennung. Bei der Zentrifugation setzen sich die Proteine in der unteren, organischen Phase ab. Die RNA bleibt in der oberen wässrigen Phase gelöst. In der Interphase dazwischen befindet sich die DNA.

In der vorliegenden Arbeit wurden 2 x 10<sup>7</sup> Zellen in 1ml TRIzol® aufgenommen und zunächst bei 1400 rpm für 10 min bei 37°C geschüttelt. Jeder Probe wurde 200 µl Chloroform hinzugefügt. Im Anschluss wurden die Proben 15 min gevortext bis es zu einer Trübung kam und danach bei 10600 rpm und 8°C für 10 min zentrifugiert. Die wässrige Phase, welche die RNA, enthält, wurde abgenommen und erneut mit 200 µl Chloroform versetzt, gevortext und zentrifugiert. Zur Fällung der RNA wurden 0,5 ml EtOH (100 %) hinzugegeben, gemischt, bei -20°C für 30 min inkubiert und im Anschluss zentrifugiert. Dabei setzte sich das RNA-Pellet am Boden ab und wurde mit 1 ml EtOH (75 %) gewaschen und getrocknet. Daraufhin wurde das Pellet in RNAse freiem Wasser gelöst und bei 4°C gelagert.

#### 2.2.4 Qualitätskontrolle der DNA und RNA

Licht, welches durch ein Medium scheint, wird je nach optischer Dichte des Mediums absorbiert. Diese Absorption kann mit einem Photospektrometer gemessen werden. Nukleinsäuren wie DNA und RNA besitzen ihr Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 260 nm. Somit lässt sich bei dieser Wellenlänge die Absorption messen und im nächsten Schritt die Konzentration der RNA oder DNA bestimmen. Um zusätzlich eine Aussage über die Reinheit der Probe machen zu können, muss die Absorption bei 280 nm, dem Absorptionsmaximum von Proteinen und Phenol, gemessen und ein Quotient aus den beiden Werten gebildet werden. Mithilfe eines Photospektrometers lässt sich so die Konzentration und Reinheit der isolierten RNA messen und eine mögliche Kontamination mit Proteinen ausschließen. Wenn zu 100 % RNA vorliegt, beträgt der Quotient aus optischer Dichte bei 260 nm zu optischer Dichte bei 280nm (OD260/OD280) 2,0. Bei Werten zwischen 1,8 und 2,2 geht man von ausreichender Reinheit aus, bei Werten <1,8 liegt eine Verunreinigung mit Phenol oder Proteinen vor.

In dieser Arbeit wurde als Photospektrometer der Nanodrop<sup>®</sup> ND-1000 zur Messung der Konzentration von RNA und DNA bei festgelegten Wellenlängen (260nm, 280nm) verwendet. Zunächst wurde ein Nullwert durch Messung von Wasser bestimmt. Danach wurde das Programm ND 1000 3.3 gestartet, die DNA- und RNA-Proben gemessen und der OD260/OD280-Quotient wie oben beschrieben bestimmt.

## 2.2.5 cDNA-Synthese

Die einzelsträngige RNA muss vor PCR-Analysen in doppelsträngige cDNA (komplementäre DNA) umgewandelt werden. Hierfür macht man sich das Prinzip der reversen Transkription zunutze. Hierbei stellt das Enzym Reverse Transkriptase (RNA-abhängige DNA-Polymerase) anhand der vorhandenen RNA zunächst einen komplementärer DNA-Strang her. Im Anschluss wird der ursprüngliche RNA-Strang bis auf ein als Primer dienendes Stück abgebaut und daran anknüpfend der zweite Strang der nun doppelsträngigen cDNA hergestellt.

Die RNA wurde zunächst 10 min bei 65 °C denaturiert und 3 min auf Eis gestellt. Zu jeder Probe wurden im Anschluss 21 µl cDNA-Mix hinzugegeben. Danach wurden die Proben für 2 h bei 37°C auf einem Heizblock inkubiert. Zur Beendigung der Reaktion wurden die Proben für 5 min auf einen 65°C heißen Heizblock gestellt. Im Anschluss wurden die Proben direkt weiterverarbeitet oder bei -20 °C gelagert.

## 2.2.6 Plasmid-Synthese

Für die absolute Quantifizierung bei einer quantitativen PCR können mehrere Methoden angewendet werden. In der vorliegenden Arbeit wurde die Quantifizierung mithilfe einer Standardkurve eines internen Standards vorgenommen. Hierfür wurden das *KIT D816V*- und das *KIT* Wildtyp-Gen in ein kommerziell erworbenes Plasmid kloniert und dieses in mehreren Stufen verdünnt. Für den Plasmidverdau wurden zunächst 1 μg DNA (entsprach 10 μl) mit 5 μg 1 x Cutsmart Puffer, 10 Einheiten Kpnl-HF (Restriktionsenzym) angesetzt, mit nukleasefreiem Wasser auf 50 μl aufgefüllt und 15 min bei 37 °C inkubiert. Der Ansatz wurde über Nacht bei -20 °C asserviert. Die Konzentration der Plasmid-DNA wurde mittels Quant-iT™ PiccoGreen™ gemessen. Sie betrug 6,069338956 ng/μl. Hieraus wurde die Anzahl an Transkripten pro Milliliter berechnet und daraus die Menge an Plasmidlösung, welche für eine Anzahl an 2 x 10<sup>7</sup> Transkripten benötigt wurde. Diese betrug 13,5 μl, so dass für die erste Verdünnungsstufe 13,5 μl des Plasmidverdaus mit 1 ml TER-Puffer gemischt wurden. Im Anschluss wurde daraus eine Verdünnungsreihe mit den Verdünnungsstufen 2 x 10<sup>6</sup>, 2 x 10<sup>5</sup>, 2 x 10<sup>4</sup>, 2 x 10<sup>3</sup>, 2 x 10<sup>2</sup>, und 2 x 10<sup>1</sup> hergestellt.

### 2.2.7 Quantitative Polymerase Kettenreaktion (qPCR)

Die Polymerase Kettenreaktion ist ein Verfahren zur exponentiellen Vervielfältigung von DNA-Abschnitten, welches *in vitro* und in Zyklen abläuft (siehe 1.3.2). In der vorliegenden Arbeit wurden (i) Messungen mittels der LC-Technik für den Vergleich zwischen *KIT* D816V EAB und VAF vorgenommen und (ii) die Messung der *KIT* D816V EAB mittels TaqMan-Technologie im Labor etabliert und validiert.

### 2.2.7.1 RNA-basierte Beurteilung von KIT D816V mittels LC-Technik

Eine quantitative Messung der *KIT* D816V EAB auf cDNA-Ebene wurde mittels allelspezifischer RT-qPCR durchgeführt. Zwei PCR Assays für i) die Amplifikation von allen *KIT*-Transkripten (Wildtyp und D816V) und ii) *KIT* D816V mutierten Transkripten, wurden verwendet. Der *KIT* D816V EAB wurde als Quotient zwischen mutierten *KIT* D816V-Transkripten und allen *KIT*-Transkripten berechnet. Für die PCR wurden der universal "Mastermix" (LightCycler Faststart plus set, Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) und spezifische Primer und Sonden (siehe Material 2.1.5 und 2.1.6) verwendet. In einem LightCycler 1.5 (Roche Diagnostics) mit einem Endvolumen von 20  $\mu$ L, mit 2  $\mu$ L cDNA oder Plasmidprodukt (500 nm Primer; 250 nm Sonde) wurde das folgende PCR- Programm verwendet: 95°C (10 min), 45 cycles: 95°C (1 s), 60°C (10 s), und 72°C (26 s) 129

### 2.2.7.2 RNA-basierte Beurteilung von KIT D816V mittels Tagman-Technik

Für die Etablierung der Messung der *KIT* D816V EAB wurden, wie bei der zuvor verwendeten LC-Technik, zwei PCR-Assays generiert, einer für die Amplifikation der Gesamt-*KIT*-Transkripte ("WT-Assay"), und einer für die Amplifikation der mutierten *KIT* D816V-Transkripte ("D816V Assay"). Das WT-Assay enthielt den TaqMan Universal Mastermix, nukleasefreies Wasser, den CK 16F4 Vorwärtsprimer, den CK20R Rückwärtsprimer und die TaqCKProbe (Sequenzen siehe Material 2.1.5). Das *KIT* D816V-Assay enthielt den CK 17FM Vorwärtsprimer, den CK20R Rückwärtsprimer und die TaqCKProbe (Sequenzen siehe Material 2.1.6). Vor Zugabe zum Reaktionsgemisch wurden Primer und Sonde 1:10 mit nukleasefreiem Wasser verdünnt. In einem 750 Fast Real Time PCR System mit einem Endvolumen von 18 µl

mit 2 µl cDNA, Plasmidprodukt oder nukleasefreiem Wasser als Negativkontrolle wurde das folgende PCR-Programm verwendet:  $50^{\circ}$ C (2 min)  $95^{\circ}$ C (10 min),  $45^{\circ}$ C cycles:  $95^{\circ}$ C (3 s),  $60^{\circ}$ C (45 s), und  $72^{\circ}$ C (26 s) (Abbildung 3). Das Fluoreszenzsignal bei 518nm wurde mittels eines Fluoreszenzmessgerätes (ABI Prism) gemessen. Eine Quantifizierung der DNA-Menge wurde anhand der Standardkurve der internen Kontrolle (siehe 2.2.6) vorgenommen. Die Effizienz der PCR wurde anhand der slope der Standardkurve durch die Formel E =  $10^{\circ}$  (-1/slope) (E, Effizienz) berechnet. Auch hier wurde der Quotient aus mutierten *KIT* D816V-Transkripten und allen *KIT*-Transkripten berechnet. Die Quotienten wurden mit den zuvor mittels LC-System ermittelten Quotienten verglichen.

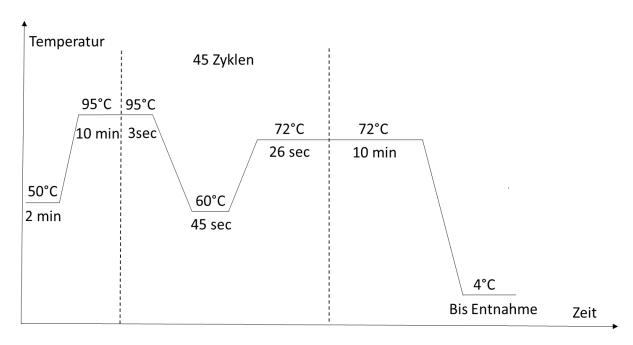


Abbildung 3: PCR-Programm der TaqMan qPCR

Auf der x-Achse ist die Zeit abgebildet, auf der y-Achse die Temperatur. Das Programm beginnt mit einer zweiminütigen Inkubation bei 50°C, darauf folgt die Denaturierung bei 95°C für 10 Minuten. Im Anschluss daran beginnen die PCR-Zyklen. Zunächst bleibt die Temperatur für 3 Sekunden bei 95°C. Es folgt die Annealingphase für 45 Sekunden bei 60°C und die Elongationsphase für 26 Sekunden bei 72°C. Diese 3 Schritte wiederholen sich 45 Mal. Am Ende des PCR-Laufes folgt einmalig eine Phase mit 72°C für 10 Minuten. Bis zur Entnahme werden die Proben bei 4°C gelagert.

## 2.2.8 DNA-basierte Beurteilung von KIT D816V

Für die quantitative Beurteilung der *KIT* D816V VAF auf DNA-Ebene wurde im Vorfeld ein PCR-Assay für die digitale PCR (dPCR) etabliert. Die Quantifizierung wurde mit dem QuantStudio 3D dPCR-System (ThermoFisher Scientific, Massachusetts, USA) durchgeführt. Bei einem Endvolumen von 15 μl pro Probe enthielt der Reaktionsansatz 7,1 μL von 10 ng/μL DNA, 7,5 μL des QuantStudio 3D Digital PCR Mastermix v2 (ThermoFisher Scientific) und 0,4 μL des für *KIT* D816V spezifischen Taqman Genexpressionsassay (ID: Hs000000039\_rm, ThermoFisher Scientific). Das "limit of detection" (LOD) wurde durch serielle Verdünnung einer Patientenprobe mit 50 % *KIT* D816V VAF und DNA von gesunden Spendern durchgeführt (0 % *KIT* D816V). Alle Proben wurden in zwei unabhängigen PCR-Läufen mit dem folgenden Programm analysiert: 96°C für 10 min, (56°C für 2 min, 98°C für 30 s [39 Zyklen]) und 56°C für 2 min.

## 2.2.9 Statistische Analyse

### 2.2.9.1 Statistische Analyse zum Vergleich von EAB und VAF

Für die Bestimmung des Gesamtüberlebens galt der Zeitraum zwischen Diagnose und Datum des Todes oder des letzten Kontaktes. Die Überlebenswahrscheinlichkeit wurde mit Kaplan-Meier-Kurven bestimmt. Eine Pearson Korrelationsanalyse wurde für die Korrelation zweier kontinuierlich fortlaufender Parameter verwendet. T-Tests wurden für den Vergleich kontinuierlicher Variablen und Verteilungsmediane verwendet. Für die Bestimmung der *hazard ratio* (HR) wurde ein Cox-Regressionsmodell verwendet. Mittels Grenzwertoptimierungskurve (ROC-Analyse) wurde der optimale Cut-off zur Dichotomisierung des EAB/VAF-Koeffizienten bestimmt. Alle Tests waren zweiseitig und p < 0,050 wurde als statistisch signifikant betrachtet.

GraphPad Prism Software (Version 6, GraphPad, La Jolla, CA, USA), Excel (Version 2019, Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA), SPSS (Version 21.0.0, IBM Cooperation, Armonk, NY, USA) und SAS Software, release 9.4 (SAS Institute, Cary, USA) wurden für die statistischen Analysen verwendet.

### 2.2.9.2 Statistische Analyse zur Validierung der TaqMan qPCR

Im ersten Schritt wurde die Robustheit der Standardreihe über 24 Läufe berechnet und mit der Robustheit der LC-PCR verglichen. Als nächstes wurde das *Limit of detection* (LOD) berechnet. <sup>144</sup> Hierfür wurden je nach Höhe der gemessenen Wildtyp-Transkripte Cut-off-Werte für "positiv" und "negativ" eingeführt. Im nächsten Schritt wurden die LODs der neuen TaqMan PCR mit den LODs der Lightcycler PCR verglichen. Anhand der gewählten Cut-Off-Werte wurden die klinische Sensitivität und diagnostische Spezifität der PCR berechnet. Um die Cut-off-Werte statistisch zu validieren wurde für jeden Cut-off-Wert eine ROC-Analyse durchgeführt. Die "accuracy" der TaqMan-PCR wurde anhand der Korrelation mit den Quotienten der LightCycler PCR als "Realität" berechnet. Für die Verlaufsmessungen wurden Proben mit hohen und niedrigen Quotienten ausgewählt und Messungen mittels LightCycler und TaqMan zu unterschiedlichen Zeitpunkten im Krankheitsverlauf von Patient\*innen durchgeführt. Die Präzision der PCR wurde durch Mehrfachbestimmung innerhalb eines Assays (2 Replikate pro Lauf) und zwischen mehreren Läufen als Intra- und Interassay-Variabilität berechnet.

GraphPad Prism Software (Version 6, GraphPad, La Jolla, CA, USA), Excel (Version 2019, Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA), SPSS (Version 21.0.0, IBM Cooperation, Armonk, NY, USA) und SAS Software, release 9.4 (SAS Institute, Cary, USA) wurden für die statistischen Analysen verwendet.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Etablierung der TaqMan-basierten qPCR

### 3.1.1 Aufbau des Plasmids

Abbildung 4 zeigt das kommerziell erworbene Plasmid pBluescript II SK, welches ein *KIT* D816V und ein *KIT* Wildtyp-Insert beinhaltet. Das Insert ist 788 Basenpaare lang.

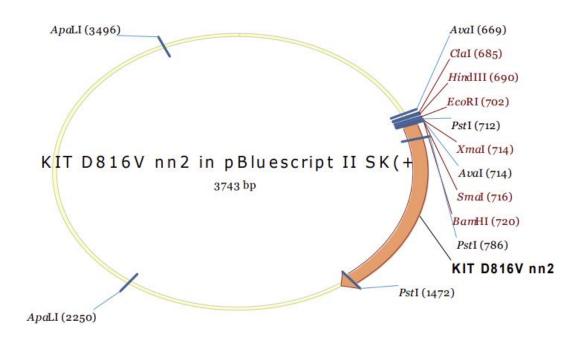


Abbildung 4: pBluescript II SK - Plasmid mit *KIT* D816V und WT-Insert eingesetzt an der Restriktionsstelle Pstl

## 3.1.2 Robustheit der PCR und Etablierung der Standardreihe

Aus 24 PCR-Läufen wurde für jede Verdünnungsstufe der Standardreihe die Mittelwerte der Ct-Werte, sowie deren Standardabweichung und Varianz berechnet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3 aufgeführt. Die Ct-Mittelwerte und Standardabweichungen der TaqMan-qPCR sind in grün dargestellt. Im Vergleich dazu sind die Standardabweichungen der LC-qPCR in rot und eingeklammert dargestellt. Verglichen mit den Werten der im selben Labor etablierten LC-qPCR sind Standardabweichung und Varianz bei der neu etablierten TaqMan-qPCR bis auf die Werte der kleinsten Verdünnungsstufe (2 x 10<sup>6</sup>) geringer. Zusätzlich in der Tabelle aufgeführt sind die

#### Ergebnisse

minimalen und maximalen Ct-Werte für jede Verdünnungsstufe, die durch Addition (obere Grenze) und Subtraktion (untere Grenze) der 2-fachen Standardabweichung vom Mittelwert berechnet wurden.

Tabelle 3: Mittelwerte der Ct-Werte der Verdünnungsreihe, sowie deren Standardabweichung und Varianz

### <u>Wildtyp</u>

	2x10 <sup>6</sup>	2x10 <sup>5</sup>	2x10 <sup>4</sup>	2x10 <sup>3</sup>	2x10 <sup>2</sup>	2x10 <sup>1</sup>
STAW	0,14	0,15	0,13	0,27	0,99	0,77
	(0,43)	(0,45)	(0,47)	(0,50)	(0,62)	(0,63)
STAW*2	0,28	0,30	0,26	0,53	1,99	1,53
Ct Mittelwert	15,10	18,60	22,08	25,44	28,78	32,04
Ct obere Grenze	15,38	19,89	22,33	25,97	30,77	33,75
Ct untere Grenze	14,82	18,30	21,82	24,91	26,79	30,50

### **D816V**

	2x10 <sup>6</sup>	2x10 <sup>5</sup>	2x10 <sup>4</sup>	2x10 <sup>3</sup>	2x10 <sup>2</sup>	2x10 <sup>1</sup>
STAW	0,48	0,11	0,11	0,12	0,13	0,75
	(0,22)	(0,25)	(0,21)	(0,14)	(0,22)	(0,39)
STAW*2	0,96	0,22	0,22	0,25	0,26	1,50
Ct Mittelwert	15,16	18,52	21,97	25,43	28,90	31,88
Ct obere Grenze	16,12	18,74	22,19	25,68	29,16	33,38
Ct untere Grenze	14,20	18,30	21,75	25,19	28,63	30,39

**Abkürzungen:** STAW, Standardabweichung (rot LightCycler, grün TaqMan); STAW\*2, Varianz; D816V, Assay für die Messung von D816V Transkripten; Wildtyp, Assay für die Messung von Wildtyp-Transkripten; Ct obere Grenze, maximal gemessener Ct-Wert für diese Verdünnungsstufe; Ct untere Grenze minimal gemessener Ct-Wert für diese Verdünnungsstufe.

### 3.1.3 Effizienz der PCR

Anhand der Steigung (*slope*) der Standardkurve und anhand des Korrelations-koeffizienten R<sup>2</sup> lässt sich die Effizienz der PCR berechnen. Die Steigung der Standardkurve betrug bei 17 PCR-Läufen für den WT-Assay -3,18 mit einer Standardabweichung von 0,08 und für den D816V-Assay -3,19 mit einer Standardabweichung von 0,08. Der Korrelationskoeffizient R<sup>2</sup> war für beide Assays im Durchschnitt > 0,99 Für die Berechnung der Effizienz wurde folgende Formel angewandt:

$$Effizienz = \left(10^{\left(-\frac{1}{slope}\right)} - 1\right) * 100$$

Die PCR-Effizienzen betrugen 105,6 % (KIT D816V-Assay) und 106,3 % (KIT WT-Assay). Abbildung 5 zeigt einen Amplifikationsplot der neu etablierten TaqMan qPCR.

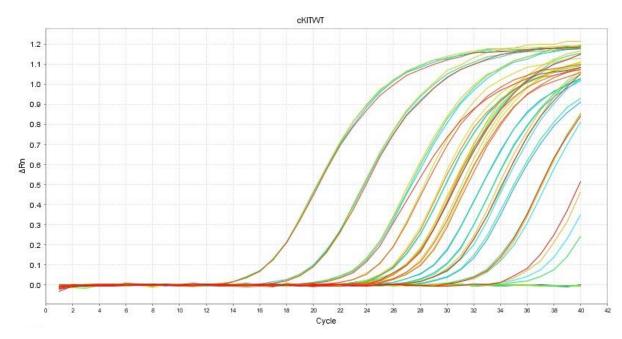


Abbildung 5: Darstellung eines Amplifikationsplots der neu etablierten TaqMan qPCR

Auf der x-Achse ist die Anzahl der PCR-Zyklen aufgetragen, auf der y-Achse die Veränderung des gemessenen Fluoreszenzsignals. Jede Linie stellt eine Probe dar. Je mehr DNA-Moleküle (in diesem Fall *cKIT* Wildtyp-Transkripte) in der Probe enthalten sind, desto früher steigt das Fluoreszenzsignal an und desto früher übersteigt das Fluoreszenzsignal einen gesetzten Schwellenwert. Die Anzahl der Zyklen zum Zeitpunkt der Überschreitung des Schwellenwertes bestimmt den Ct-Wert der Probe.

## 3.1.4 Festlegung der Auswertekriterien

Durch die Messung KIT D816V negativer, gesunder Spenderproben (n=24) sowie der Messung KIT D816V negativer Patient\*innenproben (andere hämatologische Entitäten, n=50) fiel die Zunahme falsch positiver Transkripte proportional zu einer steigenden Wildtyp-Transkriptzahl auf. Dementsprechend wurden wildtypabhängige Cut-off-Werte für die Unterscheidung zwischen KIT D816V positiv und negativ festgelegt (Tabelle 4). Bei ≤ 999 Wildtyp-Transkripten wurde ein Cut-off-Wert von ≥ 15 KIT D816V positiven Transkripten festgelegt, bei 1000 - 1999 Wildtyp-Transkripten ein Cut-off-Wert von ≥ 30 KIT D816V positiven Transkripten, bei 2000 - 2999 Wildtyp-Transkripten ein Cut-off-Wert von ≥ 50 KIT D816V positiven Transkripten, bei 3000 -9999 Wildtyp-Transkripten ein Cut-off-Wert von ≥ 120 KIT D816V positiven Transkripten, bei > 10.000 Wildtyp-Transkripten ein Cut-off-Wert von ≥ 300 KIT D816V positiven Transkripten. Für jeden Cut-Off-Wert wurde der LOD berechnet. In Tabelle 4 sind die Cut-Off-Werte mit den dazu berechneten LODs der TaqMan qPCR aufgeführt. Der LOD stellt den kleinsten Quotienten dar, der mit den gegebenen Grenzwerten nachgewiesen werden kann. Je kleiner der Wert des LOD, desto sensitiver ist die Methode. Bei der zuvor verwendeten LC-qPCR gab es keine wildtypabhängigen Cutoff-Werte. Hier konnten zwar niedrigere Quotienten gemessen werden, die LODs waren jedoch aufgrund des Fehlens der Wildtyp-abhängigen Cut-off-Werte (vor allem bei niedrigen Wildtyp-Transkripten) höher (Tabelle 5).

Tabelle 4: LODs und wildtypabhängige Cut-off-Werte der TaqMan qPCR für 116 Patient\*innenproben

Wildtyp- Transkripte	Anzahl	%	pos. Kriterium für <i>KIT</i> D816V	LOD (%)
≤ 999	24	21	≥ 15	1,5
1000-1999	23	20	≥ 30	1,5
2000-2999	21	18	≥ 50	1,7
3000-9999	27	23	≥ 120	1,2
>10000	21	18	≥ 300	0,03

Abkürzungen: LOD, Limit of detection; pos, positiv

Tabelle 5: LODs und wildtypunabhängige Cut-off-Werte der LC-qPCR für 116 Patient\*innenproben einer historischen Kohorte

Wildtyp- Transkripte	Anzahl	%	pos. Kriterium für <i>KIT</i> D816V	LOD (%)
≤ 999	3	3	≥ 100	10
1000-1999	2	2	≥ 100	5
2000-2999	4	3	≥ 100	3,3
3000-9999	19	16	≥ 100	1
>10000	88	76	≥ 100	0,03

Abkürzungen: LOD, Limit of detection; pos., positiv

# 3.1.5 Klinische Sensitivität, diagnostische Spezifität, positiv und negativ prädiktiver Wert und diagnostische Odds-Ratio

Anhand der Auswertekriterien mit wildtypabhängigen Cut-Off-Werten wurde unter Annahme der Quotienten der LC-qPCR als "Goldstandard" die klinische Sensitivität, die diagnostische Spezifität, der positiv prädiktive Wert (PPV), der negativ prädiktive Wert (NPV) und die diagnostische Odds-Ratio (DOR) berechnet (Tabelle 6).

Es ergab sich eine klinische Sensitivität von 99 %, eine diagnostische Spezifität von 100 %, ein positiv prädiktiver Wert von 1, ein negativ prädiktiver Wert von 0,97 und eine diagnostische Odds-Ratio von > 4.000.000.

Tabelle 6: Bestimmung von klinischer Sensitivität und diagnostischer Spezifität, positiv prädiktivem Wert, negativ prädiktivem Wert und diagnostischer Odds-Ratio

			LightCycler		
			positiv	negativ	
	positiv	Anzahl	114	0	
Taqman		%	99 %	0 %	
	negativ	Anzahl	2	74	
		%	1%	100 %	

Richtig-positiv-Rate = Sensitivität	99 %
Richtig-negativ-Rate = Spezifität	100 %
Falsch-positiv-Rate	0 %
Falsch-negativ-Rate	1 %

PPV	NPV	DOR
1	0,97	> 4.000.000

**Abkürzungen:** PPV, Positiv prädiktiver Wert; NPV, Negativ prädiktiver Wert; DOR, diagnostische Odds Ratio

# 3.1.6 ROC-Analyse zur Validierung der klinischen Sensitivität, diagnostischen Spezifität und der Cut-off-Werte

Um die klinische Sensitivität, die diagnostische Spezifität und die Cut-off-Werte statistisch zu validieren wurde eine ROC-Analyse durchgeführt. Hierbei wird die Sensitivität (richtig positive = Trefferquote) gegenüber der 1 – Spezifität (falsch positive = Falschpositivquote) aufgetragen. Eine ROC-Kurve nahe der Diagonalen deutet auf einen Zufallsprozess hin, da dies eine gleiche Trefferquote und Falschpositivquote bedeutet. Die ideale ROC-Kurve verläuft zunächst senkrecht (Trefferquote 100 %. Falschpositivquote 0 %) und erst später waagerecht. Für jede zuvor anhand der Höhe an Wildtyp-Transkripten eingeteilte Gruppe ergab die ROC-Analyse einen Bereich, in dem die Cut-off-Werte für positiv und negativ liegen sollten, einen Bereich also in dem die Trefferquote annähernd 100 % und die Falschpositivquote annähernd 0% beträgt. In Abbildung 6 sind die Ergebnisse der ROC-Analyse und die daraus errechneten Sensitivitäten und 1 - Spezifitäten für die einzelnen Cut-off-Werte aufgeführt. Für die erste Gruppe mit Wildtyp-Transkripten ≤ 999 (AG-01) lag der errechnete Bereich zwischen 14,6 und 17,1, der zuvor festgelegter Cut-off-Wert betrug 15. Für die zweite Gruppe mit Wildtyp-Transkripten 1000 - 1999 (AG-02) lag der errechnete Bereich zwischen 28,6 und 30,8, der zuvor festgelegter Cut-off-Wert betrug 30. Für die dritte Gruppe mit Wildtyp-Transkripten 2000 - 2999 (AG-03) lag der errechnete Bereich zwischen 47,8 und 55, der zuvor festgelegter Cut-off-Wert betrug 50. Für die vierte Gruppe mit Wildtyp-Transkripten 3000 - 9999 (AG-04) lag der errechnete Bereich zwischen 119,23 und 133,5, der zuvor festgelegter Cut-off-Wert betrug 120. Für die fünfte Gruppe mit Wildtyp-Transkripten ≥ 10.000 (AG-05) lag der errechnete Bereich zwischen 214 und 470, der zuvor festgelegter Cut-off-Wert betrug 300.

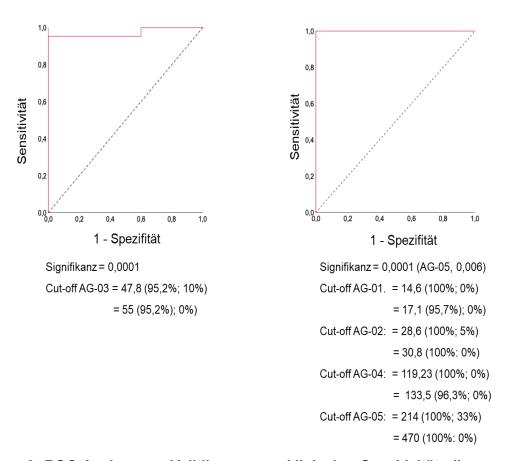


Abbildung 6: ROC-Analyse zur Validierung von klinischer Sensitivität, diagnostischer Spezifität und Cut-off-Werten

Bei beiden Diagrammen ist die Sensitivität gegenüber 1 – Spezifität aufgetragen. Eine Kurve nahe der diagonalen Würde einen Zufallsprozess anzeigen. Verläuft die Kurve zunächst senkrecht und nahe der 1,0 erst waagerecht zeigt dies eine hohe Sensitivität und eine niedrige 1 – Spezifität, d.h. eine hohe Trefferquote und eine niedrige Falschpositivquote an. Die ROC-Analyse zeigt hinter dem "=" - Zeichen für jede wildtypabhängige Gruppe zwei Werte an. Der erste Wert ist der niedrigste Wert eines Bereiches, in dem der optimale Cut-off-Wert liegen sollte und der zweite Wert ist der höchste Wert eines Bereiches, in dem der optimale Cut-off-Wert liegen sollte. In der Klammer sind die zu dem Cut-off-Wert gehörigen Sensitivitäten (vor dem Semikolon) und 1− Spezifität (hinter dem Semikolon) dargestellt.

Abkürzungen: AG-01, WT-Transkripte ≤ 999; AG-02, WT-Transkripte 1000 - 1999; AG-03, WT-Transkripte 2000 - 2999; AG-04, WT-Transkripte 3000 - 9999; AG-05, WT-Transkripte ≥ 10.000; die erste Zahl in der Klammer ist die Sensitivität, die zweite Zahl nach dem Semikolon die 1 – Spezifität für den vor der Klammer stehenden Cut-off-Wert

# 3.1.7 "Accuracy": Korrelation der TaqMan-KIT D816V EAB mit den LightCycler-KIT D816V EAB

Unter Annahme der LC-KIT D816V EAB als Realität wurde die "Accuracy", d.h. die Korrelation der TaqMan-KIT D816V EAB mit den LC-KIT D816V EAB, berechnet (Abbildung 7). Die Quotienten korrelierten mit r=0,95 und R²=0,9 stark miteinander. Trotz der höheren Quotienten im TaqMan waren auch Patient\*innen mit 0,1 – 1 % Allellast im LightCycler im TaqMan positiv.

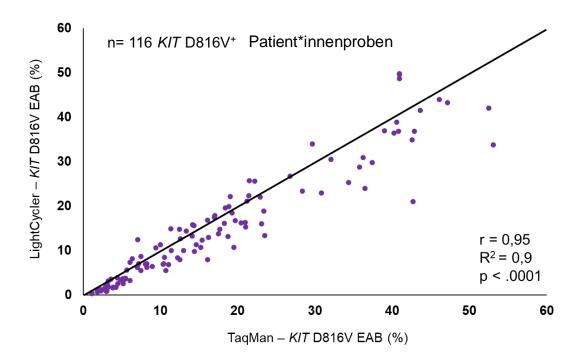


Abbildung 7: "Accuracy": Korrelation der TaqMan-KIT D816V EAB mit der LC-KIT D816V EAB bei 116 Patient\*innenproben

Auf der x-Achse ist der TaqMan-*KIT* D816V EAB aufgetragen, auf der y-Achse der LightCycler-*KIT* D816V EAB. Der TaqMan-*KIT* D816V EAB korrelierten stark mit den LightCycler-*KIT* D816V EAB (r=0,95 und R²=0,9). Es zeigte sich ein starker linearer Zusammenhang zwischen den TaqMan- und LightCycler-Quotienten.

Abkürzungen: EAB, Expressed Allele Burden

### 3.1.8 Verlaufsmessungen

Für die Verlaufsmessungen wurden Proben mit hohen und niedrigen Quotienten ausgewählt und Messungen mittels LC und TaqMan zu unterschiedlichen Zeitpunkten im Krankheitsverlauf von Patient\*innen durchgeführt. Die Auswahl der Verlaufsproben ist in Abbildung 8 dargestellt. Die Ergebnisse dieser Messungen sind in Abbildung 9 dargestellt. Wie zuvor beschrieben waren die Quotienten, welche mittels TaqMan gemessen wurden, höher als die LC-Quotienten. Dieser Unterschied zeigte sich stabil bei allen Proben und Zeitpunkten der Messungen.

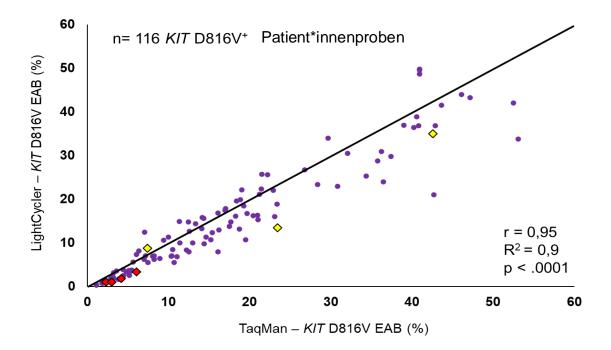


Abbildung 8: Auswahl der Verlaufsproben

Rote Raute, Proben mit niedrigen Quotienten; gelbe Raute, Proben mit hohen Quotienten **Abkürzungen:** EAB, Expressed Allele Burden

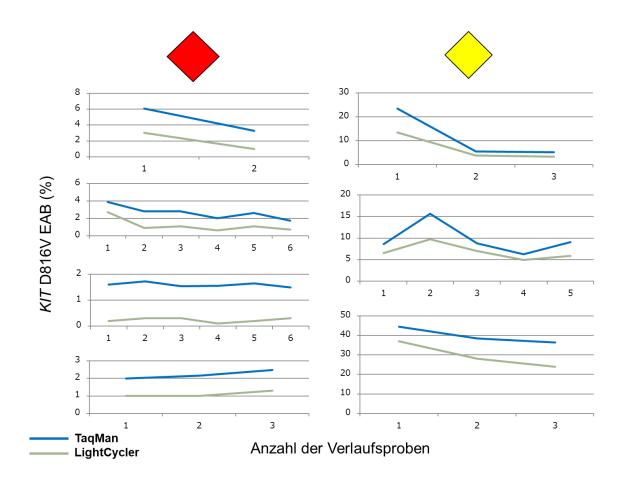
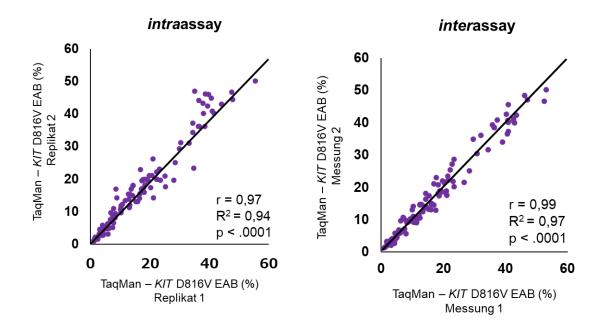


Abbildung 9: Verlaufsmessungen zu unterschiedlichen Zeitpunkten im Krankheitsverlauf

Blaue Linie, TaqMan-Quotienten; graue Linie, LC-Quotienten. Die TaqMan-Quotienten waren grundsätzlich höher als die LC-Quotienten. Dieser Unterscheid zeigte sich stabil, so dass mit beiden Methoden der Verlauf der Allellast annähernd identisch war. **Abkürzungen:** EAB, Expressed Allele Burden

# 3.1.9 Präzision: Intra- und Interassayvariabilität (Repeatability und Reproducibility)

Für die Intraassayvariabilität, d.h. die Korrelation zwischen den Quotienten zweier Replikate innerhalb eines Laufes, wurde mit r=0,97 und R²=0,94 eine sehr starke positive Korrelation errechnet (Abbildung 10). Auch die Interassayvariabilität, d.h. die Korrelation der Quotienten bei Mehrfachbestimmung in mehreren PCR-Läufen an verschiedenen Tagen, zeigte eine sehr starke positive Korrelation mit r=0,99 und R²=0,97.



#### Abbildung 10: Intra-und Interassayvariabilität

Die Korrelation der Messwerte zweier Replikate innerhalb eines PCR-Laufs zeigte einen starken linearen Zusammenhang (links). Die Korrelation der Messwerte der gleichen Replikate in zwei unterschiedlichen PCR-Läufen zeigte ebenfalls einen starken linearen Zusammenhang (rechts).

Abkürzungen: EAB, Expressed Allele Burden

# 3.2 Vergleich zwischen DNA- und RNA-basierter Messung von *KIT* D816V

### 3.2.1 Patient\*innencharakteristika

Für den Vergleich zwischen DNA- und RNA-basierter Messung von *KIT* D816V wurden Proben von 161 Patent\*innen untersucht. Darunter waren Patient\*innen mit AdvSM (n=121) und ISM (n=40). Tabelle 7 zeigt klinische, laborchemische und therapeutische

Charakteristika, sowie Outcome der Patient\*innen. Unter den 121 Patient\*innen mit AdvSM waren Patient\*innen mit ASM (n=18), MCL (n=2) und SM/MCL-AMN (n=101). 18 der Patient\*innen mit AdvSM hatten eine Progression zu sekundärer AML (11/18) oder sekundärer MCL (7/18). 53 Patient\*innen mit AdvSM wurden mit dem KIT-inhibitor Midostaurin behandelt.

Tabelle 7: Klinische, laborchemische und therapeutische Charakteristika, sowie Outcome von Patient\*innen mit ISM und AdvSM

Variablen	ISM	AdvSM	P-Wert
	40	121	-
	54 (29-83)	76 (30-90)	<0,0001
Männlich, n (%)	17 (43)	81 (67)	0,006
Hämoglobin, g/dL; Mittelwert (Spannbreite)	13.9 (11,7-16,8)	10.8 (5,8-15,8)	<0,0001
Thrombozyten, x10 <sup>9</sup> /L; Mittelwert (Spannbreite)	283 (87-461)	114 (12-958)	0,0002
MZ-infiltration in KM, Histologie, %	n.z.	30 (0-100)	-
Serumtryptase, µg/L; Mittelwert (Spannbreite)	46 (8-166)	180 (11-1382)	<0,0001
Alkalische Phosphatase, U/L; Mittelwert (Spannbreite)	76 (15-166)	200 (33-1279)	<0,0001
Diagnose			
ASM, n (%)	-	18 (15)	-
MCL, n (%)	-	2 (2)	-
SM/MCL-AMN, n (%)	-	101 (83)	1
Progression in			
Sekundäre AML, n (%)	-	11 (61)	-
Sekundäre MCL, n (%)	-	7 (39)	-
Outcome			
Follow-up, Jahre, Mittelwert (Spannbreite)	5 (0-21)	3 (0-25)	n.s.
Tod, n (%)	0 (100)	60 (50)	<0,0001
Gesamtüberleben, Mittelwert, Jahre	n.e.	4.8	<0,0001
Therapie			
Midostaurin, n (%)	1 (3)	57 (47)	<0,0001

**Abkürzungen:** AMN, Assoziierte myeloische Neoplasie; AML, Akute myeloische Leukämie; ASM, Aggressive systemische Mastozytose; KM, Knochenmark; MCL, Mastzellleukämie; n, Anzahl; n.e., nicht erreicht; n.s., nicht significant; n.z., nicht zutreffend.

### 3.2.2 Vergleich zwischen EAB und VAF

Im PB von Patient\*innen mit ISM (n=40), korrelierten EAB und VAF mit r=0,91 (R²=0,84). Bei Patient\*innen mit AdvSM waren r und R² signifikant geringer (n=121, r=0,71, R²=0,5). Die ROC-Analyse ergab für Patient\*innen mit AdvSM einen optimalen Schwellenwert für eine EAB/VAF Ratio von 2 für die Einteilung in unterschiedliche Kohorten. Patient\*innen mit einer EAB/VAF Ratio  $\leq$  2 wurden als Kohorte A (77/121, 64%) und Patient\*innen mit einer EAB/VAF Ratio > 2 als Kohorte B (44/121, 36%) definiert (Abbildung 11). Um den signifikanten Unterschied zwischen EAB und VAF in individuellen Patient\*innen der Kohorte B zu bestätigen, wurden gleichzeitig gewonnene KM- und PB-Proben von 12 Patient\*innen untersucht. Bei der Mehrzahl der Patient\*innenproben aus KM (9/12, 75%) konnte der EAB/VAF Koeffizient von > 2 bestätigt werden.

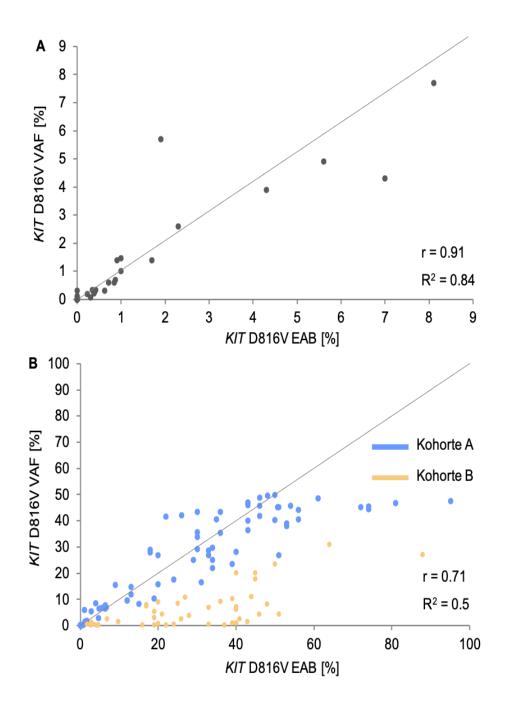


Abbildung 11: Vergleich des expressed allele burden (EAB, cDNA) und der variant allele frequency (VAF, DNA) bei indolenter Mastozytose (ISM, n=40) und fortgeschrittener Mastozytose (AdvSM, n=121)

Die Korrelation zwischen EAB und VAF zeigt einen starken linearen Zusammengang bei Patient\*innen mit ISM (A). Dieser Zusammenhang ist bei Patient\*innen mit AdvSM schwächer ausgeprägt (B). Während Kohorte A Patient\*innen mit einem EAB/VAF Koeffizienten ≤ 2 (blau) zeigt, repräsentiert Kohorte B Patient\*innen mit einem EAB/VAF Koeffizienten > 2. <sup>146</sup> **Abkürzungen:** EAB, Expressed Allele Burden; VAF, Variant Allele Frequency

### 3.2.3 Krankheitscharakteristika in Kohorte A und B

Tabelle 8 zeigt klinische, laborchemische und therapeutische Charakteristika, sowie Outcome von Patient\*innen in Kohorte A und B. Signifikante Unterschiede zwischen Kohorte A und B waren höhere Hämoglobinwerte (p=0,006), ein geringerer Anteil an Patient\*innen mit Hämoglobinwerten < 10mg/dl (p=0,010), eine niedrigere mittlere Monozytenzahl (p=0,010), ein geringerer Anteil an Patient\*innen mit Werten für die Alkalische Phosphatase > 150 U/L (p=0,010), eine geringer Anzahl an Patient\*innen mit einem molekularen Hochrisikoprofil (mindestens eine Mutation im *SRSF2*, *ASXL1*, *RUNX1* Genpanel, p=0,020) und niedriger mittlere Vitamin B12-Spiegel (p=0,020) in Kohorte A.

Tabelle 8: Klinische, laborchemische, molekulare Charakteristika, sowie Outcome von 121 Patient\*innen mit AdvSM eingeteilt nach EAB/VAF Koeffizient ≤ 2 (Kohorte A) und > 2 (Kohorte B)

Variablen	KIT D816V EAB/VAF Koeffizient ≤ 2 (Kohorte A)	KIT D816V EAB/VAF Koeffizient > 2 (Kohorte B)	P-Wert
Anzahl von Patient*innen (n)	77	44	-
Alter in Jahren, Mittelwert (Spannbreite)	71 (30-90)	77 (52-88)	-
Männlich, n (%)	49 (63)	32 (73)	-
Diagnose			
ASM, n (%)	14 (18)	4 (11)	-
MCL, n (%)	2 (3)	-	-
SM/MCL-AMN, n (%)	61 (79)	40 (90)	-
AMN-Subtypen			
MDS/MPN-u, n (%)	18 (30)	13 (33)	-
CMML, n (%)	27 (44)	17 (43)	-
MDS, n (%)	5 (8)	6 (15)	-
MPN-eo, <i>n</i> (%)	1 (2)	-	
AML, n (%)	1 (2)	1 (2)	-
CEL, n (%)	7 (11)	1 (2)	-
PMF, n (%)	2 (3)	2 (5)	-

Progression zu			
AML, n (%)	8 (10)	3 (7)	-
MCL, n (%)	6 (8)	2 (5)	-
C-findings			
Hämoglobin, g/dL; Mittelwert (Spannbreite)	11,4 (5,8-15,8)	9.8 (7,5-14,5)	0,006
< 10 g/dL; <i>n</i> (%)	20 (29)	21 (53)	0,010
Thrombozyten, x10 <sup>9</sup> /L; Mittelwert (Spannbreite)	133 (12-618)	106 (28-958)	n.s.
< 100 x 10 <sup>9</sup> /L, n (%)	31 (44)	19 (48)	n.s.
Alkalische Phosphatase, U/L; Mittelwert (Spannbreite)	188 (33-1206)	303 (53-1279)	n.s.
> 150 U/L, n (%)	39 (57)	31 (79)	0,010
Albumin, g/L; Mittelwert (Spannbreite)	38 (16-48)	36 (22-48)	n.s.
< 34 g/L, n (%)	23 (34)	14 (40)	n.s.
Aszites, n (%)	39 (53)	25 (61)	n.s.
B-findings			
MZ-Infiltration in KM Histologie, %; Mittelwert (Spannbreite)	35 (3-95)	30 (0-100)	n.s.
Serumtryptase, µg/L; Mittelwert (Spannbreite)	170 (11-1382)	211 (18-875)	n.s.
> 100 µg/L, n (%)	51 (73)	28 (74)	n.s.
Splenomegalie, n (%)	60 (87)	37 (90)	n.s.
Hepatomegalie, n (%)	33 (52)	28 (72)	0.05
Zusätzliche SM und/oder AMN relevante Parameter			
Leukozyten, x10 <sup>9</sup> /L; Mittelwert (Spannbreite)	10,6 (5,8-79,3)	7,6 (1,0-89,4)	n.s.
Monozyten, %; Mittelwert (Spannbreite)	7 (1-46)	11 (1-31)	0.01
Eosinophile, %, Mittelwert (Spannbreite)	3 (0-81)	6 (0-66)	n.s.
Vitamin B12 <sup>a</sup> , ng/L; Mittelwert (Spannbreite)	1188 (114-6000)	2842 (489-6000)	0.02
> 180 ng/L, n (%)	50 (96)	32 (100)	n.s.
KIT D816V EAB in PB, %, Mittelwert (Spannbreite)	30 (0-95)	28 (2-88)	n.s.
KIT D816V VAF in PB, %, Mittelwert (Spannbreite)	27,0 (0,0-49,8)	4,0 (0,1-30,8)	< 0,001
GI-Infiltration, n (%)	30 (41)	19 (43)	n.s.
S/A/R Mutation(s)b, n (%)	38 (51)	31 (74)	0,02

#### Ergebnisse

Outcome			
Follow-up, Jahre, Mittelwert (Spannbreite)	3,5 (0,0-24,6)	2,2 (0,0-11,9)	ı
Tod, <i>n</i> (%)	33 (43)	27 (61)	-

**Abkürzungen:** AMN, Assoziierte myeloische Neoplasie; AML, Akute myelosche Leukämie; ASM, Aggressive systemische Mastozytose; KM, Knochenmark; CEL, Chronische Eosinophilenleukämie; CMML, chronische Myelomonozytäre Leukämie; EAB, expressed allele burden; GI, gastrointestinal; MCL, Mastzelllukämie; MDS, Myelodysplastische Syndrome; MPN, Myeloproliferative Neoplasien; -u, nicht klassifiziert; -eo, Eosinophil; n, Anzahl; PB, Peripheres Blut; PMF, primäre Myelofibrose; S/A/R, mindestens eine Mutation im *SRSF2*, *ASXL1*, *RUNX1* Genpanel; SM, Systemische Mastozytose; VAF, variant allele frequency.

## 3.2.4 Prognostischer Wert von EAB, VAF und dem EAB/VAF Koeffizienten

In Bezug auf das Gesamtüberleben war die Cox-Regressionsanalyse nur für den EAB/VAF Koeffizienten von > 2 signifikant (p=0.006), nicht jedoch für VAF (p=0.657) oder (EAB=0.658) allein.

## 3.2.5 Überlebensanalysen

Mittels Kaplan-Meier Kurven wurden die Überlebenswahrscheinlichkeiten von Patient\*innen mit einem EAB/VAF Koeffizienten ≤ 2 (Kohorte A, n=77) und von Patient\*innen mit einem EAB/VAF Koeffizienten > 2 (Kohorte B, n=44) verglichen (Tabelle 12). Bei Patient\*innen aus Kohorte B war die Überlebenswahrscheinlichkeit signifikant geringer als bei Patienten aus Kohorte A (p=0,005).

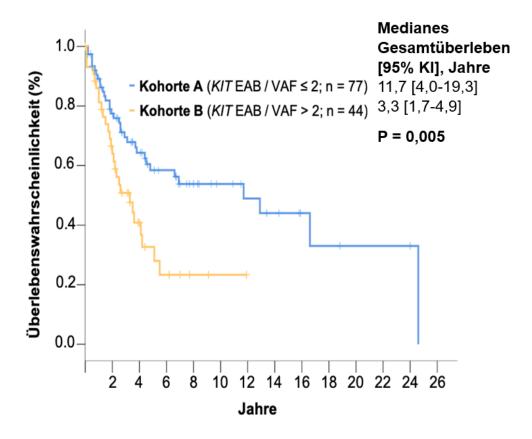


Abbildung 12: Medianes Gesamtüberleben von Kohorte A und B im Vergleich

Während Kohorte A Patient\*innen mit einem EAB/VAF Koeffizienten  $\leq$  2 (blau) repräsentiert, repräsentiert Kohorte B Patient\*innen mit einem EAB/VAF Koeffizienten > 2. Das mediane Gesamtüberleben von Kohorte B war signifikant geringer als das mediane Gesamtüberleben der Kohorte A (p=0,005) <sup>146</sup>.

### 4 Diskussion

Molekulargenetische Detektionsmethoden und Genexpressionsanalysen spielen in der Medizin eine entscheidende Rolle bei der Diagnostik, Therapieplanung, Verlaufsbeobachtung und Prognose von Erkrankungen. Weil die Erkenntnisse aus dem molekularen Monitoring einen großen Einfluss auf das weitere Vorgehen, die Therapieentscheidungen und die Prognose haben, ist die Entwicklung, Etablierung, Evaluation und kontinuierliche Überarbeitung sensitiver und molekulargenetischer Detektionsmethoden von hoher Bedeutung. Seit den 1970er Jahren kann man spezifische DNA-Abschnitte nachweisen. Diese Methoden wurden in den letzten 50 Jahren stetig weiterentwickelt und in Bezug auf ihre Sensitivität und Spezifität verbessert. Auch die Geschwindigkeit, mit der die Nachweise erfolgen, sowie das Spektrum der Gene, welche nachgewiesen werden können, konnte Stück für Stück erhöht bzw. erweitert werden. Maßgeblich zu diesem Fortschritt beigetragen hat die Entwicklung und Weiterentwicklung der PCR-Methode, welche heute, in verschiedener Ausführung, als digitale PCR, qPCR oder RT-qPCR, eine der wichtigsten molekulargenetischen Detektionsmethoden darstellt. Sowohl in der klinischen Diagnostik als auch in der Forschung kommt die PCR-Methode aufgrund ihrer Geschwindigkeit, Präzision und Flexibilität zum Einsatz.

Die KIT D816V Mutation ist bei über 90 % der Patient\*innen mit SM nachweisbar. Sie ist ein diagnostisches Kriterium der SM und ihr Vorhandensein und die Allellast hat Auswirkungen auf die Therapie und Prognose der Erkrankung. Die Mutation kann mittels allelspezifischer qPCR nachgewiesen werden. Ein Ziel dieser Arbeit war die Etablierung einer auf der TaqMan-Methode basierten RT-qPCR zum Nachweis von KIT D816V auf cDNA-Ebene.

Im wissenschaftlichen Labor der III. Medizinischen Klinik fand der Nachweis von *KIT* D816V zur Routinediagnostik bis dato mittels LC-RT-qPCR statt. Allelspezifische Primer für den Nachweis von D816V waren bereits etabliert. Diese konnten für die TaqMan-PCR verwendet werden. Zur Erzeugung des Fluoreszenzsignals im LC wurden zwei Sonden benötigt, eine Akzeptor- und eine Donorsonde. Für den TaqMan benötigt man nur eine Sonde mit Fluoreszenzmarkierung am 3' und 5'-Ende. Da sich die Basensequenz der Sonden im LC schon bewährt hatten, wurde die Sequenz einer

der LC-Sonden als Basis für die TagMan-Sonde verwendet. Die Fluoreszenzmarkierung wurde dahingehend verändert, dass die Sonde am 5´-Ende einen Reporterfarbstoff und am 3'-Ende einen Quencherfarbstoff enthielt und so für die TagMan-Methode verwendbar wurde. Auch das PCR-Programm der LC-qPCR konnte aufgrund der unveränderten Bestandteile des PCR-Assays größtenteils übernommen werden. Die Temperaturen für Denaturierung (95°C), Annealing (60°C) und Elongation (72°C) blieben unverändert. Lediglich bei der Länge der einzelnen Schritte wurden Änderungen vorgenommen. Grund dafür war die Funktionsweise des TaqMan-qPCR-Gerätes, welches Erhitzung und Abkühlung, wie in der Einleitung dargelegt, auf eine andere Art und Weise durchführt als das LC-Gerät.

die Quantifizierung mithilfe der TaqMan-Methode benötigt man eine Standardreihe. Für die Standardreihe wurden Transkripte mit KIT D816V Mutation KIT Wildtyp-Transkripte in ein Plasmid kloniert und jeweils Verdünnungsreihe hergestellt. Dies ist eine bewährte Methode zur Herstellung einer Standardreihe für die gPCR. Eine weitere Möglichkeit wäre die Verwendung von houskeeping Genen gewesen. Für deren Amplifikation wird jedoch ein weiteres Primer- und Sondenpaar benötigt. Die Effizienz der Amplifikation der Standardreihe mit housekeeping Genen kann aufgrund der unterschiedlichen Primer stark von der Effizienz der Amplifikation des eigentlichen targets abweichen und zu verfälschten Ergebnissen führen. 147 Daher wurde die Entscheidung zugunsten der Herstellung einer Plasmidstandardreihe, welche mit denselben Primern amplifiziert werden kann wie das target, getroffen. Die hergestellten Standards können bei 4°C für eine Woche gelagert oder bei -20° C eingefroren und mehrmals aufgetaut werden. Die Plasmide gelten als stabil, trotzdem kann es durch Lagerung und den Prozess des Einfrierens und Auftauens zu Informationsverlust durch Degradation kommen. Dies ist jedoch ein generelles Problem bei der Verwendung interner Standards für die qPCR und kann nur durch die Anwendung anderer PCR-Methoden, wie der digitalen PCR, umgangen werden, da die Quantifizierung hierbei ohne Standards erfolgt. Insgesamt ist es daher wichtig, dass die Verdünnungsreihe, gemäß der Vorgaben gelagert und verarbeitet wird. Bei der qPCR hängt die Genauigkeit der Messungen grundsätzlich, neben der Qualität der Primer und Sonden und der Reaktionsbedingungen, von der Qualität der Standardreihe ab. Die Qualität der Standardreihe lässt sich durch deren Robustheit abbilden. Diese beschreibt, wie stark die Ct-Werte der einzelnen Verdünnungsstufen zwischen den PCR-Läufen schwanken. Um die Robustheit der Standardreihe statistisch verifizieren, wurden die Mittelwerte der Ct-Werte aller zu Verdünnungsstufen, deren Standardabweichung und Varianz berechnet. Es zeigten sich hier insgesamt geringe Standardabweichungen. Im Vergleich dazu waren die Standardabweichungen der Ct-Werte im LC insgesamt höher, das heißt, sie zeigten mehr Streuung. Lediglich bei der kleinsten Verdünnungsstufe waren die Standardabweichungen der TagMan-PCR für den D816V-Assay höher als die der LCqPCR. Dies könnte bedeuten, dass der neue TagMan-Assay bei den kleinsten Verdünnungsstufen und damit bei sehr geringen Mutationsleveln nicht gleichermaßen präzise Ergebnisse liefert wie die LC-qPCR. Da der neue TaqMan-Assay über alle anderen Verdünnungsstufen hinweg jedoch sehr geringe Standardabweichungen der Ct-Werte aufweist, kann die Robustheit der Standardreihe insgesamt als ausreichend betrachtet werden. Die Robustheit der Standardreihe ist die Grundlage für präzise Messergebnisse der gPCR. Ist die Standardreihe nicht robust oder weist sie grundlegende Fehler auf, so sind die Ergebnisse der gPCR nicht zu verwerten. Dies ist ein generelles Charakteristikum der qPCR. Universell einsetzbare Referenzmaterialien für RT-qPCR-Experimente, welche dann kommerziell erhältlich sind und zu einer besseren Standardisierung der qPCR Ergebnisse beitragen könnten. werden entwickelt. 148 Hier entsteht allerdings wieder das Problem, dass unterschiedliche Primerpaare, welche zu unterschiedlich effizienter Amplifikation von target und Referenzmaterial führen können, zur Anwendung kommen. Wie in der Einleitung dargelegt, verzichtet die Methode der digitalen PCR auf interne Standards. Hier wird eine absolute Quantifizierung möglich, welche unabhängig von der Effizienz der PCR und von internen Standards erfolgt. Dies macht die digitale PCR zu einer attraktiven Methode, da gleich zwei mögliche Fehlerquellen, welche großen Einfluss auf die Ergebnisse der PCR haben, wegfallen. Es ist anzunehmen, dass die digitale PCR zukünftig eine wichtige Rolle im Bereich molekulargenetischer Detektionsmethoden einnehmen wird.

Grundsätzlich kann mit der PCR-Methode bei einer Effizienz von 100% mit jedem PCR-Zyklus eine Verdopplung der eingesetzten DNA stattfinden. Anhand der Steigung der Standardkurve, auch *slope* genannt, und des Korrelationskoeffizienten R² kann die Effizienz der PCR bestimmt werden. Mit einer durchschnittlichen *slope* der Standardkurve von -3,18 für den D816V Assay und -3,19 für den Wildtyp-Assay war die Effizienz über 17 PCR-Läufe bei 105,6% (*KIT* D816V) und 106,3% (*KIT* Wildtyp %). Aufgrund der Art der Berechnung der Effizienz kann rein rechnerisch eine Effizienz

von über 100% erreicht werden. Ein Korrelationskoeffizient R² von 1 würde bedeuten, dass der Ct-Werte einer Verdünnungsstufe der Standardreihe in jedem Fall anhand des Ct-Wertes einer anderen Verdünnungsstufe vorhergesagt werden kann. Ein R² von 0 würde bedeuten, dass es keinen Zusammenhang zwischen diesen Werten gibt. Mit einem durchschnittlichen Korrelationskoeffizienten R² von > 0,99 für die vorliegenden Assays konnte die exzellente Effizienz der TaqMan-qPCR bestätigt werden. Dabei existieren viele Faktoren, welche die Effizienz eines PCR-Assays beeinflussen können. Unter anderem spielen hierbei die Anzahl an Replikaten in den Proben für die Plasmid-Standards, die Spannweite der einzelnen Verdünnungsstufen und PCR-Inhibitoren eine Rolle. Aus den Ergebnissen lässt sich folgern, dass im Hinblick auf diese Faktoren keine Veränderungen angezeigt sind.

Das Ziel der PCR-Messungen war es (i) eine Aussage treffen zu können, ob die Probe KIT D816V positiv oder negativ ist und (ii) festzustellen wie hoch die Allellast ist, so dass anhand dieser Auswertung eine Verlaufsbeurteilung, z.B. unter Therapie, möglich ist. Da es grundsätzlich zu falsch positiven und falsch negativen Messungen durch Mismatch der Primer oder andere Störfaktoren kommen kann <sup>149-151</sup>, ist für erstere Fragestellung die Festlegung von Kriterien zur Definierung von positiv und negativ notwendig. Bei der zuvor verwendeten LC-PCR war der Cut-Off-Wert für als KIT D816V positiv eingestufte Proben der Nachweis von 100 mutierten Transkripten. ≥ galt als positiv, < als negativ. Bei den Messungen mit der TagMan-Methode fiel auf, dass ein Zusammenhang zwischen der Menge an detektierten Wildtyp-Transkripten und mutierten Transkripten bestand. Je höher die Zahl der Wildtyp-Transkripte, desto höher war auch die Zahl der (falsch)-positiven KIT D816V-Transkripten. Die Gründe hierfür können vielfältig sein. Zum einen ist es möglich, dass die TagMan-PCR sensitiver ist, das heißt mehr Transkripte detektiert als die LC-PCR. Ein anderer Grund könnte sein, dass die TagMan-PCR weniger spezifisch misst als die LC-PCR und es zu mehr unspezifischen Bindungen der Primer und mehr falsch positiven Messungen kommt. Die Frage kann letztendlich nicht sicher beantwortet werden, da keine Referenzmethode verwendet werden konnte, sondern von der LC-PCR als Realität ausgegangen wurde. Aufgrund des Zusammenhangs zwischen der Höhe an Wildtyp-Transkripten und mutierten Transkripten wurde entschieden, wildtypabhängige Cut-Off-Werte für die Unterscheidung zwischen positiv und negativ einzuführen. Die Proben wurden nach Höhe der Wildtyp-Transkripte in fünf Gruppen eingeteilt und anhand der festgelegten Cut-off-Werte die LODs berechnet. Durch die Einführung der

wildtypabhängigen Cut-off-Werte konnten sehr niedrige LODs und damit eine hohe klinische Sensitivität und diagnostische Spezifität erreicht werden. Wichtig ist, zwischen analytischer und klinischer Sensitivität bzw. analytischer und diagnostischer Spezifität zu unterscheiden. 147 Analytische Sensitivität bezeichnet die minimal mögliche Menge an D816V positiven Transkripten, die mit der PCR noch detektiert werden kann. Die klinische Sensitivität zeigt an, wie viele Individuen korrekt als positiv für die KIT D816V-Mutation erkannt werden. 147 Analog dazu zeigt die analytische Spezifität, wie viele Moleküle richtig als Wildtyp-Transkripte erkannt werden und die diagnostische Spezifität zeigt an, wie viele Individuen richtigerweise als D816V negativ erkannt werden. Während analytische Sensitivität und Spezifität vor allem für Forschungszwecke eine Rolle spielen, sind klinische Sensitivität und diagnostische Spezifität bei klinischen Fragestellungen wichtige Parameter. Da die TaqMan-qPCR in klinischen Diagnostik zur Anwendung kommen soll, war in diesem Forschungsvorhaben die klinische Sensitivität und die diagnostische Spezifität von großer Relevanz. Durch die wildtypabhängigen Cut-off-Werte konnten sowohl sehr gute klinische Sensitivitäten als auch diagnostische Spezifitäten erreicht werden. Vor allem die gute klinische Sensitivität war von großer Bedeutung, da der Assay unter anderem zur Erstdiagnose der SM eingesetzt werden soll und vermieden werden muss, dass keine D816V positiven Patient\*innen ein negatives Testergebnis erhalten. Ein falsch negatives Ergebnis kann die Diagnosestellung und Therapieplanung erschweren und herauszögern oder verhindern. Auch die diagnostische Spezifität ist wichtig, da ein falsch positives Ergebnis dazu führen kann, dass bei einem\*r Patient\*in, der\*die weitere Kriterien erfüllt, fälschlicherweise die Diagnose einer SM gestellt wird. Da die KIT D816V-Mutation nicht nur bei der SM, sondern auch bei Patient\*innen mit akuter myeloischer Leukämie auftreten kann <sup>152</sup>, ist das Testergebnis der gPCR zwar spezifisch für KIT D816V, aber nicht spezifisch für die SM und sollte daher im Kontext weiterer klinischer, molekulargenetischer und laborchemischer Faktoren betrachtet werden.

Zur Validierung der Cut-off-Werte wurde eine ROC-Analyse durchgeführt, welche für jede, anhand der Wildtyp-Transkripte eingeteilte Gruppe an Proben die idealen Cut-off-Werte für positiv und negativ ermittelte. Für jede Gruppe lagen die zuvor festgelegten Cut-off-Werte im von der ROC-Analyse errechneten Bereich. Für die erste Gruppe mit Wildtyp-Transkripten ≤ 999 lag der errechnete Bereich zwischen 14,6 und 17,1, der zuvor festgelegte Cut-off-Wert betrug 15. Für die zweite Gruppe mit

Wildtyp-Transkripten 1000 - 1999 lag der errechnete Bereich zwischen 28,6 und 30,8, der zuvor festgelegte Cut-off-Wert betrug 30. Für die dritte Gruppe mit Wildtyp-Transkripten 2000 - 2999 lag der errechnete Bereich zwischen 47,8 und 55, der zuvor festgelegte Cut-off-Wert betrug 50. Für die vierte Gruppe mit Wildtyp-Transkripten 3000 - 9999 lag der errechnete Bereich zwischen 119,23 und 133,5, der zuvor festgelegte Cut-off-Wert betrug 120. Für die fünfte Gruppe mit Wildtyp-Transkripten > 10.000 lag der errechnete Bereich zwischen 214 und 470, der zuvor festgelegte Cut-off-Wert betrug 300. Bei allen Gruppen lagen die zuvor festgelegten Cut-off-Werte in dem von der ROC-Analyse berechneten Bereich. Die Sensitivität innerhalb des von der ROC-Analyse berechneten Bereichs lag bei allen Gruppen zwischen 95,2 und 100%. Die 1 – Spezifität lag bei allen Gruppen, außer Gruppe fünf, bei 0 – 10%. Bei der fünften Gruppe war die 1 – Spezifität am unteren Ende des von der ROC-Analyse berechneten Bereichs, d.h. bei 214, bei 33 % und am oberen Ende des Bereichs, d.h. bei 470, bei 0 Prozent. Der von uns gewählte Cut-off-Wert bei 300 verhinderte bei 100% der gemessenen Proben ein falsch-negatives Ergebnis.

Kristensen et al. 153 berechneten, anders als wir, die klinische Sensitivität und diagnostische Spezifität ihres Assays anhand der Ct-Werte der Proben und legten anschließend Cut-off-Werte für positiv und negativ fest. Der Ct-Wert beschreibt, wie viele PCR-Zyklen es dauert, bis eine bestimmte Schwelle an Fluoreszenzsignal überschritten wird. Grundsätzlich gilt also, dass der Ct-Wert höher ist, je weniger eingesetzte DNA vorhanden ist. Es gibt jedoch neben der Menge an eingesetzter DNA Faktoren, welche den Ct-Wert beeinflussen können. weitere Wie viel Fluoreszenzsignal durch ein DNA-Molekül erzeugt wird, hängt unter anderem vom pH-Wert und damit von der Zusammensetzung des Master-Mixes ab. 154 Die Auswertung anhand der tatsächlichen Anzahl an Transkripten und des Quotienten zwischen D816V und Wildtyp-Transkripten erlaubt es, eine genaue Aussage über die Allellast zu treffen. Außerdem ist die Auswertung unabhängig von zuvor beschriebenen Einflussfaktoren auf die Ct-Werte. Daher war die Auswertung anhand von Ct-Werten bei Kristensen et al. nicht zielführend.

Eine Möglichkeit zur Berechnung der analytischen Sensitivität der Detektion von *KIT* D816V mittels qPCR ist die Herstellung einer Verdünnungsreihe mit HMC-1-Zellen (Human Mast Cell-1) und NB-4-Zellen. HMC-1-Zellen sind Zellen, welche ursprünglich von einem Patienten mit Mastzellleukämie stammen, die *KIT* D816V und V560G-

Mutation, sowie einen veränderten Karyotyp aufweisen und für Studien dieser Mutationen und der Mastzellfunktion eingesetzt werden. <sup>155</sup> NB-4-Zellen sind Zellen, welche ursprünglich von einem Patienten mit akuter Promyelozytenleukämie stammen und die typische zytogenetische Veränderung dieser Erkrankung, jedoch keine KIT D816V und V560G-Mutation, aufweisen. 156 Durch Verdünnung der HMC-1-Zellen in NB-4-Zellen konnten bei drei Arbeitsgruppen mittels gPCR Sensitivitäten von 0,1% <sup>140,</sup> <sup>157</sup> und 0,01% Allellast <sup>34</sup> errechnet werden. Auch für die Validierung unserer TagMan-PCR wurden Versuche mit HMC-1-Zellen gestartet. Diese führten jedoch nicht zu zufriedenstellenden Ergebnissen. Dies war vor allem zurückzuführen auf den sehr veränderten und schwer für Experimente nutzbaren, komplex aberranten Karyotyp der HMC-1-Zellen und wahrscheinlich auch der NB-4-Zellen. Die drei oben genannten Studien führten die Messungen auf DNA-Ebene durch, während bei uns die Messungen auf RNA/cDNA-Ebene erfolgten. Die reverse Transkription der RNA der HMC-1-Zellen führte wahrscheinlich aufgrund oben beschriebener Veränderungen der Zellen zu unverwendbaren Ergebnissen. Zudem wurde die Verdünnungsreihe anhand von Zählungen und Hochrechnungen vorgenommen, was zu ungenauen Ergebnissen geführt haben könnte. In meinen Versuchen wurden bei den Zelllinien nicht vergleichbare Transkriptzahlen gemessen, sodass die Ergebnisse verworfen wurden.

Die Ergebnisse in Bezug auf die Accuracy zeigten, dass die Quotienten der TaqMan-PCR einen starken linearen Zusammenhang mit denen der LC-PCR haben. Sowohl bei Proben mit einer niedrigen als auch mit einer hohen Allellast ließ sich diese positive Korrelation zeigen. Trotz der höheren Quotienten im TaqMan, waren auch Patient\*innen mit 0,1 – 1 % Allellast im LC im TaqMan positiv.

Neben dem Einsatz zur Erstdiagnostik soll der neue Assay auch Verlaufsbeurteilungen der Allellast zum Einsatz kommen. Vor allem beim Monitoring der Resterkrankung nach Stammzelltransplantation erwies sich die qPCR-Methode als hilfreich. 40, 129 Es konnte demonstriert werden, dass es mit dem neuen TagMan-Assay - genau wie mit der LC-PCR zuvor - möglich ist, den Verlauf der Allellast anhand verschiedenen verschiedener Proben zu Zeitpunkten während des Krankheitsverlaufes zu monitoren. Zur Beurteilung des Krankheitsverlaufes spielen die höheren Quotienten, welche mit der TaqMan-PCR gemessen werden, keine Rolle. Genau wie die LC-PCR zuvor können Veränderungen in der Allellast sicher detektiert werden. In einer Übergangsphase sollten Proben mittels TagMan-PCR und LC-PCR gemessen werden. Es sollten die Ergebnisse beider Systeme ausgewiesen werden und bei diskrepanten Ergebnissen diese mit der/den zuständigen Behandler\*in engmaschig diskutiert werden.

In jedem PCR-Lauf werden zwei Replikate pro Probe gemessen. Die Korrelation zwischen diesen beiden Replikaten nennt man Intraassayvariabilität oder Repeatability. Die Korrelation zwischen den gleichen Replikaten in unterschiedlichen PCR-Läufen bezeichnet man als Interassayvariabilität oder Reproducibility. Für beides konnten starke positive Korrelationen berechnet werden (Intraassayvariabilität, r=0,97; Interassayvariabilität, r=0,99). Dies bedeutet, dass die PCR zuverlässig zu gleichbleibenden Ergebnissen kommt. Die Robustheit der Standardreihe spiegelt sich auch in den Ergebnissen der Proben wider. Ausschlaggebend für eine gute Intra- und Interassayvariabilität ist neben der Qualität des PCR-Assays auch die Arbeitsweise der die Messungen durchführenden Person. Präzise und reproduzierbare Ergebnisse können nur durch konstant sauberes Arbeiten erreicht werden. Die gPCR wurden nur im wissenschaftlichem Labor der III. Medizinischen Klinik durchgeführt wurde. Da die Ergebnisse von qPCR-Experimenten, trotz eines hohen Maßes an Standardisierung, von Labor zu Labor unterschiedlich sein können <sup>158</sup>, war der Vergleich anderen Laboren angedacht. Diese externe Qualitätskontrolle konnte jedoch bisher nicht erfolgen, da weltweit sehr wenige Labore KIT D816V auf RNA/cDNA-Ebene messen. Für die Anwendung als diagnostisches Instrument ist die alleinige Validierung in dem gewählten Labor jedoch ausreichend.

Ein grundlegendes Problem bei Messungen auf RNA/cDNA-Ebene ist, dass die meisten menschlichen Gene nach der Transkription von DNA zu RNA noch durch alternatives Splicing verändert werden. <sup>159</sup> Die Splicevarianten werden in verschiedenen Geweben unterschiedlich exprimiert und es entstehen unterschiedliche Isoformen von Proteinen. Es kann auch passieren, dass aus einer mRNA kein Protein translatiert wird. Das alleinige Vorhandensein von mRNA hat also nicht zwangsläufig zur Folge, dass ein funktionsfähiges Protein entsteht. <sup>160</sup> In diesem Zusammenhang ist es für das Verständnis der Genexpression auch wichtig, Informationen über das Vorhandensein und die Funktion von micro-RNAs zu haben, da diese die Translation von mRNA in Proteine regulieren. <sup>161</sup> Allgemein müssen Primer für Messungen auf RNA/cDNA-Ebene exonbasiert sein. Bei der Auswahl der Primer ist darauf zu achten, dass möglichst viele von den bekannten Splicevarianten detektiert werden können.

Dies lässt sich anhand von Datenbanken zu Splicevarianten nachprüfen. Welche Splicevarianten von *KIT* D816V bei der SM von Relevanz sind, könnte Gegenstand weiterer Forschung sein, um die Auswirkungen der Allellast und Genexpression besser zu verstehen und einzuordnen.

Ein weiteres Charakteristikum von RNA ist, dass sie instabiler ist als DNA. Dies hat zur Folge, dass die RNA-Level leichter durch Lagerung und Verarbeitung verändert werden können. Es konnte zwar gezeigt werden, dass die Qualität und Konzentration der RNA durch Einfrieren bei -120°C nicht verändert wird <sup>162</sup>, jedoch ist anzunehmen, dass dies nicht für jede RNA und jedes Gewebe gilt. In jedem Fall ist die Art der Lagerung und die sorgfältige Verarbeitung der RNA von großer Relevanz für die Ergebnisse der qPCR.

Die Reinheit der RNA wurde mittels Nanodrop-Messungen überprüft. Um Degradierung oder Verunreinigungen zu vermeiden wurde direkt im Anschluss die cDNA-Synthese durchgeführt. Nach der cDNA-Synthese wurden die Proben bei -20 °C gelagert und kurz vor der Durchführung der qPCR aufgetaut. Dies ist eine sichere Art der Lagerung, es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass sie einen Einfluss auf die Ergebnisse der qPCR hat. Studien zur Evaluation des Einflusses der RNA-Reinheit und Integrität auf die Performance und Effizienz der qPCR finden derzeit statt. Erste Ergebnisse weisen darauf hin, dass eine leichtgradige Degradierung der RNA nur einen geringen Einfluss auf die Ergebnisse der qPCR hat und, dass der Effekt von der Art des ursprünglich eingesetzten Gewebes abhängt. <sup>163</sup> Aufgrund der steigenden Relevanz von Genexpressionsanalysen ist Forschung auf diesem Gebiet von großer Wichtigkeit.

Unter 1.3.8 bin ich bereits auf die Unterschiede sowie die Vor- und Nachteile der Detektion auf RNA/cDNA-Ebene bzw. auf Ebene von gDNA eingegangen. Zusammenfassend lässt sich konstatieren, dass bei der Verarbeitung und Messung von RNA/cDNA auf Fehlerquellen wie z.B. die Instabilität der RNA, das Splicing oder den zusätzlichen Schritt der reversen Transkription geachtet werden muss. Sofern diese in der Beurteilung der Ergebnisse mit einbezogen werden, bietet die Messung auf RNA/cDNA-Ebene die einzigartige Möglichkeit, Aussagen über die tatsächliche Expression von Genen treffen zu können, was einen wichtigen Fortschritt im Hinblick

auf molekulargenetische Detektionsmethoden für Diagnostik und Therapieplanung in der Medizin darstellt.

Aufgrund der Weiterentwicklung und steigenden prognostischen und diagnostischen Relevanz quantitativer PCR-Assays für *KIT* D816V wurde für den zweiten Teil dieser Arbeit die Vergleichbarkeit DNA-basierter dPCR (VAF) mit RNA/cDNA-basierter (EAB) qPCR für den Nachweis von *KIT* D816V untersucht. Obwohl Sensitivität und Spezifität vergleichbar sind, existieren nur wenige Daten über die Vergleichbarkeit zwischen *KIT* D816V EAB und VAF. 40, 141, 164

Es wurde eine große Kohorte von 40 Patient\*innen mit ISM und 121 Patient\*innen mit AdvSM untersucht. Während EAB und VAF bei Patient\*innen mit ISM korrelierten, war die Korrelation bei Patient\*innen mit AdvSM vergleichsweise schwächer. Bei einem Drittel der Patient\*innen mit AdvSM war der EAB zwei Mal so hoch wie die VAF, was auf eine erhöhte Transkriptionsaktivität von *KIT* D816V in diesen Patient\*innen hindeutet. Die auslösenden Faktoren für die erhöhte Transkriptionsaktivität sind bisher ungeklärt und bedürfen weiterer Untersuchung. Als Maß für die Transkriptionsaktivität führten wir die EAB/VAF Ratio oder den EAB/VAF Koeffizienten ein. Je höher die Ratio, desto höher ist die Transkriptionsaktivität. Allgemein war die EAB/VAF Ratio bei Patient\*innen mit AdvSM höher als bei Patient\*innen mit ISM. Jedoch gab es auch innerhalb der AdvSM-Gruppe starke Unterschiede. Per ROC-Analyse ermittelten wir einen Cut-off-Wert für die EAB/VAF Ratio von 2 für die Unterteilung der Patient\*innen mit AdvSM in Kohorte A und B.

Im nächsten Schritt stellte sich die Frage, ob eine höhere Transkriptionsaktivität für *KIT* D816V bei der AdvSM von prognostischer Relevanz ist. Daher wurde die Bedeutung der EAB/VAF Ratio in Bezug auf das Gesamtüberleben (overall survival, OS) mittels Cox-Regressionsanalyse untersucht. Diese zeigte ausschließlich für den EAB/VAF Koeffizienten > 2 signifikante Werte (p=0,006) nicht jedoch für den VAF (p=0,657) oder EAB (p=0,658) allein. Bei Patient\*innen mit einem EAB/VAF Koeffizienten > 2 war das OS signifikant geringer (p=0,005). Dies deutet darauf hin, dass ein EAB/VAF Koeffizient > 2 einen negativen prognostischen Marker für das OS bei der AdvSM darstellt. Interessant ist hierbei, dass die EAB alleine nicht prognostisch relevant zu sein scheint. Dies verdeutlicht, dass bei diesem Patient\*innenkollektiv die Transkriptionsaktivität ausschlaggebend ist, und nicht die Allellast auf gDNA-Ebene.

Patient\*innen mit einem EAB/VAF Koeffizienten von > 2 zeigten zudem einen aggressiveren Phänotyp als diejenigen mit einem EAB/VAF Koeffizienten ≤ 2. Sie zeigten niedrigere Hämoglobinwerte, höhere Monozyten-Level, höhere Werte für die alkalische Phosphatase und mehr High-Risk Mutationen (Mutationen im *SRSF2*, *ASXL1*, *RUNX1* Genpanel). Es ist anzumerken, dass Patient\*innen mit einem EAB/VAF Koeffizienten von > 2 durchschnittlich 6 Jahre älter waren, als diejenigen mit einem EAB/VAF Koeffizienten ≤ 2, was einen Einfluss auf das Gesamtüberleben haben kann und einen Hinweis darauf liefern könnte, dass die Transkriptionsaktivität mit der Zeit über den Krankheitsverlauf hinweg zunimmt. Zusammenfassend zeigten die Ergebnisse, dass eine erhöhte *KIT* D816V Transkriptionsaktivität, definiert durch einen EAB/VAF Koeffizienten von > 2, mit einem aggressiven Phänotyp und schlechterem Gesamtüberleben assoziiert ist.

Auch bei anderen myeloischen Neoplasien spielt die molekulargenetische Analyse verschiedener Gene eine Rolle in der Diagnostik und Verlaufsbeurteilung der Erkrankungen. Bis heute gibt es jedoch nur wenige Berichte, die Mutationsanalysen auf DNA und RNA/cDNA-Ebene in hämatologischen Neoplasien vergleichen. 132, 165 Bei myeloproliferativen Neoplasien wurden mittlerweile mehrere somatische Mutationen, welche pathophysiologisch relevant sind, beschrieben. 166 Relevant ist hierbei die JAK2 V617F Mutation, welche bei 95 % der Patient\*innen mit Polycythämia vera (PV) und bei ca. 50 % der Patient\*innen mit Essenzieller Thrombozythämie (ET) und Primärer Myelofibrose (MF), vorhanden ist. Wie KIT D816V ist auch JAK2 V617F eine Punktmutation in einer Rezeptortyrosinkinase und führt über ähnliche Mechanismen wie KIT D816V zu einer unkontrollierten Zellproliferation. Bei Patient\*innen mit ET und PV konnten Diskrepanzen zwischen der JAK2 V617F Allellast auf DNA und RNA/cDNA-Ebene gefunden werden. Auch bei Patient\*innen mit akuter myeloischer Leukämie konnten diese Diskrepanzen im Hinblick auf die EAB und VAF der Typ A NPM1 Mutation nachgewiesen werden. 132, 133, 165 Diese Untersuchungen zeigten signifikant höhere Mutationslevel auf RNA/cDNA Ebene. Dies deutet auf eine höhere Sensitivität der RNA-basierten Assays hin. Im Hinblick auf die Spezifität zeigten die Untersuchungen keine signifikanten Unterschiede zwischen den gDNA und RNA/cDNA-basierten Assays. Im Gegensatz zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit konnte kein Zusammenhang zwischen einer erhöhten Allellast auf RNA/cDNA-Ebene bei JAK2 V617F und einem schlechteren klinischen Outcome

### Diskussion

hergestellt werden. Dies lag vermutlich vor allem an der geringen Anzahl an untersuchten Patient\*innen, so dass weitere Untersuchungen im Hinblick auf die klinische Relevanz der erhöhten Allellast auf RNA/cDNA-Ebene anzustreben sind, um den möglichen Einfluss auf den Phänotyp und die Prognose der Erkrankungen zu evaluieren. Ob RNA/cDNA-basierte Assays zur Diagnostik bei der SM und bei myeloproliferativen Neoplasien DNA-basierten Assays vorgezogen werden sollten, hängt unter anderem von den Ergebnissen dieser Untersuchungen ab. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit legen diese Empfehlung im Hinblick auf *KIT* D816V bei der SM nahe.

## 5 Zusammenfassung

Die systemische Mastozytose ist eine seltene und heterogene Stammzellerkrankung, die durch eine pathologische Proliferation und Akkumulation von Mastzellen in verschiedenen Organsystemen gekennzeichnet ist. Die *KIT* D816V Mutation ist bei >90 % der Patient\*innen detektierbar. Diese aktivierende Punktmutation bestimmt den Phänotyp der systemischen Mastozytose und spielt eine wesentliche Rolle in der Pathophysiologie. Die Detektion von *KIT* D816V ist sowohl initial als Diagnosekriterium, als auch im Verlauf als Parameter für das Therapieansprechen und die Prognose von großer Relevanz. Da die Mutationslast, vor allem im peripheren Blut, sehr gering sein kann (<1 %), sind konventionelle Sequenzierungsmethoden, aufgrund ihrer geringen Sensitivität (>1 %), nicht für den Nachweis von *KIT* D816V geeignet.

Das erste Ziel dieser Arbeit war daher die Entwicklung und Validierung einer auf der TagMan-Methode basierenden gPCR zur Detektion von KIT D816V auf cDNA-Ebene, die im Vergleich zu konventionellen Sequenzierungsmethoden eine Sensitivität von <0,1 % erreicht. Dafür wurden Primer und eine Sonde eines bereits *inhouse* etablierten LightCycler-Assays auf die neue TagMan-Methode angepasst und eine Plasmid-Standardreihe etabliert. Für die Etablierung wurden 116 KIT D816V positive Patient\*innenproben, sowie 74 gesunde Blutproben (Negativkontrollen) verwendet. Anhand der Anzahl gemessener KIT D816V und Wildtyp-Transkripte konnte der Anteil von KIT D816V am Gesamt-KIT prozentual berechnet werden. Zusätzlich wurden wildtypabhängige Cut-off-Werte für D816V eingeführt und die klinische Sensitivität und diagnostische Spezifität bestimmt. Die im TaqMan berechneten Quotienten wurden anhand der im LightCycler gemessenen Quotienten, validiert. Zur Bestimmung der Intra- und Interassayvariabilität wurde die Korrelation zwischen den Replikaten innerhalb eines PCR-Laufes und zwischen mehreren PCR-Läufen berechnet. Die Robustheit der Plasmid-Standardreihe wurde anhand der Standardabweichungen der Ct-Werte berechnet. Die Plasmid-Standardreihe war robust, die Effizienz der qPCR durchgehend bei mindestens 100%, die Genauigkeit war hoch und die Intra- und Interassayvariabilität gering. Durch die Einführung der wildtypabhängigen Cut-off-Werte waren die klinische Sensitivität und diagnostische Spezifität hoch, sodass die TagMan-PCR als Assay für die klinische Diagnostik zukünftig eingesetzt werden kann.

Das zweite Ziel dieser Arbeit war die Beantwortung der Fragen (i) inwiefern die *KIT* D816V Allellast auf RNA/cDNA und gDNA-Ebene bei unterschiedlichen Subtypen der

systemischen Mastozytose miteinander korrelieren und (ii) ob sich anhand der *KIT* D816V Allellast auf RNA vs. DNA-Ebene prognostische Aussagen im Hinblick auf das Gesamtüberleben treffen lassen.

Ist die Allellast auf RNA-Ebene höher als auf DNA-Ebene, spricht das für eine erhöhte transkriptionelle Aktivität und damit für eine stärkere Expression des Gens. Anhand historischer Kohorten wurde gezeigt, dass die *KIT* D816V Allellast bei Patient\*innen mit indolenter systemischer Mastozytose auf RNA und DNA-Ebene vergleichbar ist. Jedoch gibt es nur wenig Daten zur Korrelation zwischen RNA/cDNA und gDNA-basierten quantitativen Auswerteverfahren bei Patient\*innen mit fortgeschrittener systemischer Mastozytose.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden 40 Patient\*innen mit indolenter systemischer Mastozytose und 121 Patient\*innen mit fortgeschrittener systemischer Mastozytose untersucht. Während die Allellast auf RNA und gDNA-Ebene bei indolenter systemischer Mastozytose korrelierte, war die Korrelation bei Patient\*innen mit fortgeschrittener systemischer Mastozytose schwächer. Bei einem Drittel der Patient\*innen mit fortgeschrittener systemischer Mastozytose war die Allellast auf RNA-Ebene mindestens zwei Mal so hoch wie die Allellast auf gDNA-Ebene, was auf eine erhöhte Transkriptionsaktivität von *KIT* D816V bei diesen Patienten\*innen hindeutet. Außerdem konnte gezeigt werden, dass das Gesamtüberleben von Patient\*innen, bei denen die RNA/gDNA Ratio > 2 war, signifikant geringer ist, als bei Patient\*innen, mit einer RNA/gDNA Ratio von ≤ 2.

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation ist die Entwicklung und Validierung einer auf der TaqMan-Methode basierenden qPCR zur Detektion von *KIT* D816V auf cDNA-Ebene gelungen.

Die Ergebnisse im zweiten Teil dieser Arbeit zeigen, dass eine erhöhte *KIT* D816V Transkriptionsaktivität, definiert durch einen RNA/DNA Koeffizienten von > 2, mit einem aggressiven Phänotyp und schlechterem Gesamtüberleben assoziiert ist.

Für Patient\*innen mit systemischer Mastozytose kann zukünftig eine verbesserte/sensitivere Diagnostik angeboten werden. Außerdem kann die parallele Messung von *KIT* D816V auf RNA und DNA-Ebene bei Patient\*innen mit fortgeschrittener systemischer Mastozytose als zusätzlicher prognostischer Marker dienen.

### 6 Literaturverzeichnis

- 1. Ehrlich, P: Beiträge zur Theorie und Praxis der histologischen Färbung, Leipzig 1879.
- 2. Jorpes, JE: Heparin, its chemistry, pharmacology and clinical use. *Am J Med*, 33: 692-702, 1962. https://doi.org/10.1016/0002-9343(62)90247-4
- Riley, JF: Histamine in tissue mast cells. Science, 118: 332, 1953. https://doi.org/10.1126/science.118.3064.332
- Rumsaeng, V, Cruikshank, WW, Foster, B, Prussin, C, Kirshenbaum, AS, Davis, TA, Kornfeld, H, Center, DM, Metcalfe, DD: Human mast cells produce the CD4+ T lymphocyte chemoattractant factor, IL-16. *J Immunol*, 159: 2904-2910, 1997.
- 5. Nilsson, G, Forsberg-Nilsson, K, Xiang, Z, Hallböök, F, Nilsson, K, Metcalfe, DD: Human mast cells express functional TrkA and are a source of nerve growth factor. *Eur J Immunol*, 27: 2295-2301, 1997. https://doi.org/10.1002/eji.1830270925
- 6. Okayama, Y, Hagaman, DD, Metcalfe, DD: A comparison of mediators released or generated by IFN-gamma-treated human mast cells following aggregation of Fc gamma RI or Fc epsilon RI. *J Immunol*, 166: 4705-4712, 2001. https://doi.org/10.4049/jimmunol.166.7.4705
- 7. Hagaman, DD, Okayama, Y, D'Ambrosio, C, Prussin, C, Gilfillan, AM, Metcalfe, DD: Secretion of interleukin-1 receptor antagonist from human mast cells after immunoglobulin E-mediated activation and after segmental antigen challenge. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 25: 685-691, 2001. https://doi.org/10.1165/ajrcmb.25.6.4541
- 8. Plaut, M, Pierce, JH, Watson, CJ, Hanley-Hyde, J, Nordan, RP, Paul, WE: Mast cell lines produce lymphokines in response to cross-linkage of Fc epsilon RI or to calcium ionophores. *Nature*, 339: 64-67, 1989. https://doi.org/10.1038/339064a0
- 9. Kitamura, Y, Shimada, M, Hatanaka, K, Miyano, Y: Development of mast cells from grafted bone marrow cells in irradiated mice. *Nature*, 268: 442-443, 1977. https://doi.org/10.1038/268442a0
- 10. Kirshenbaum, AS, Goff, JP, Semere, T, Foster, B, Scott, LM, Metcalfe, DD: Demonstration that human mast cells arise from a progenitor cell population that is CD34(+), c-kit(+), and expresses aminopeptidase N (CD13). *Blood*, 94: 2333-2342, 1999.
- 11. Kirshenbaum, AS, Kessler, SW, Goff, JP, Metcalfe, DD: Demonstration of the origin of human mast cells from CD34+ bone marrow progenitor cells. *J Immunol*, 146: 1410-1415, 1991.
- 12. Grabbe, J, Welker, P, Dippel, E, Czarnetzki, BM: Stem cell factor, a novel cutaneous growth factor for mast cells and melanocytes. *Arch Dermatol Res*, 287: 78-84, 1994. https://doi.org/10.1007/bf00370723
- 13. Beil, WJ, Schulz, M, Wefelmeyer, U: Mast cell granule composition and tissue location--a close correlation. *Histol Histopathol*, 15: 937-946, 2000. https://doi.org/10.14670/hh-15.937
- 14. Nettleship, E: Rare Forms of Urticaria. British Medical Journal: 323-324, 1869.
- 15. Ellis, JM: Urticaria pigmentosa; a report of a case with autopsy. *Arch Pathol (Chic)*, 48: 426-435, 1949.
- 16. Horny, HP, Parwaresch, MR, Lennert, K: Bone marrow findings in systemic mastocytosis. *Hum Pathol*, 16: 808-814, 1985. https://doi.org/10.1016/s0046-8177(85)80252-5
- 17. Sperr, WR, Valent, P: Diagnosis, progression patterns and prognostication in mastocytosis. *Expert Rev Hematol*, 5: 261-274, 2012. https://doi.org/10.1586/ehm.12.12
- 18. Arber, DA, Orazi, A, Hasserjian, R, Thiele, J, Borowitz, MJ, Le Beau, MM, Bloomfield, CD, Cazzola, M, Vardiman, JW: *The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia*, 2016.
- 19. Lennert, K, Parwaresch, MR: Mast cells and mast cell neoplasia: a review. *Histopathology*, 3: 349-365, 1979. https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.1979.tb03017.x
- 20. Arber, DA, Orazi, A, Hasserjian, RP, Borowitz, MJ, Calvo, KR, Kvasnicka, HM, Wang, SA, Bagg, A, Barbui, T, Branford, S, Bueso-Ramos, CE, Cortes, JE, Dal Cin, P, DiNardo, CD, Dombret, H, Duncavage, EJ, Ebert, BL, Estey, EH, Facchetti, F, Foucar, K, Gangat, N, Gianelli, U, Godley, LA, Gökbuget, N, Gotlib, J, Hellström-Lindberg, E,

- Hobbs, GS, Hoffman, R, Jabbour, EJ, Kiladjian, JJ, Larson, RA, Le Beau, MM, Loh, ML, Löwenberg, B, Macintyre, E, Malcovati, L, Mullighan, CG, Niemeyer, C, Odenike, OM, Ogawa, S, Orfao, A, Papaemmanuil, E, Passamonti, F, Porkka, K, Pui, CH, Radich, JP, Reiter, A, Rozman, M, Rudelius, M, Savona, MR, Schiffer, CA, Schmitt-Graeff, A, Shimamura, A, Sierra, J, Stock, WA, Stone, RM, Tallman, MS, Thiele, J, Tien, HF, Tzankov, A, Vannucchi, AM, Vyas, P, Wei, AH, Weinberg, OK, Wierzbowska, A, Cazzola, M, Döhner, H, Tefferi, A: International Consensus Classification of Myeloid Neoplasms and Acute Leukemias: integrating morphologic, clinical, and genomic data. *Blood*, 140: 1200-1228, 2022. https://doi.org/10.1182/blood.2022015850
- 21. Schwaab, J, Cabral do, OHN, Naumann, N, Jawhar, M, Weiß, C, Metzgeroth, G, Schmid, A, Lübke, J, Reiter, L, Fabarius, A, Cross, NCP, Sotlar, K, Valent, P, Kluin-Nelemans, HC, Hofmann, WK, Horny, HP, Panse, J, Reiter, A: Importance of Adequate Diagnostic Workup for Correct Diagnosis of Advanced Systemic Mastocytosis. *J Allergy Clin Immunol Pract*, 8: 3121-3127.e3121, 2020. https://doi.org/10.1016/j.jaip.2020.05.005
- 22. Chang, A, Tung, RC, Schlesinger, T, Bergfeld, WF, Dijkstra, J, Kahn, TA: Familial cutaneous mastocytosis. *Pediatr Dermatol*, 18: 271-276, 2001. https://doi.org/10.1046/j.1525-1470.2001.01939.x
- 23. Briley, LD, Phillips, CM: Cutaneous mastocytosis: a review focusing on the pediatric population. *Clin Pediatr (Phila)*, 47: 757-761, 2008. https://doi.org/10.1177/0009922808318344
- 24. Hartmann, K, Escribano, L, Grattan, C, Brockow, K, Carter, MC, Alvarez-Twose, I, Matito, A, Broesby-Olsen, S, Siebenhaar, F, Lange, M, Niedoszytko, M, Castells, M, Oude Elberink, JNG, Bonadonna, P, Zanotti, R, Hornick, JL, Torrelo, A, Grabbe, J, Rabenhorst, A, Nedoszytko, B, Butterfield, JH, Gotlib, J, Reiter, A, Radia, D, Hermine, O, Sotlar, K, George, TI, Kristensen, TK, Kluin-Nelemans, HC, Yavuz, S, Hägglund, H, Sperr, WR, Schwartz, LB, Triggiani, M, Maurer, M, Nilsson, G, Horny, HP, Arock, M, Orfao, A, Metcalfe, DD, Akin, C, Valent, P: Cutaneous manifestations in patients with mastocytosis: Consensus report of the European Competence Network on Mastocytosis; the American Academy of Allergy, Asthma & Immunology; and the European Academy of Allergology and Clinical Immunology. *J Allergy Clin Immunol*, 137: 35-45, 2016. https://doi.org/10.1016/j.jaci.2015.08.034
- 25. Horny, HP, Sotlar, K, Valent, P: Mastocytosis: State of the art. 2007 S. 121-132.
- 26. Escribano, L, Orfao, A, Díaz-Agustin, B, Villarrubia, J, Cerveró, C, López, A, Marcos, MA, Bellas, C, Fernández-Cañadas, S, Cuevas, M, Sánchez, A, Velasco, JL, Navarro, JL, Miguel, JF: Indolent systemic mast cell disease in adults: immunophenotypic characterization of bone marrow mast cells and its diagnostic implications. *Blood*, 91: 2731-2736, 1998.
- 27. Valent, P, Horny, HP, Escribano, L, Longley, BJ, Li, CY, Schwartz, LB, Marone, G, Nuñez, R, Akin, C, Sotlar, K, Sperr, WR, Wolff, K, Brunning, RD, Parwaresch, RM, Austen, KF, Lennert, K, Metcalfe, DD, Vardiman, JW, Bennett, JM: Diagnostic criteria and classification of mastocytosis: A consensus proposal. Elsevier Ltd, 2001 S. 603-625.
- 28. Wang, SA, Hutchinson, L, Tang, G, Chen, SS, Miron, PM, Huh, YO, Jones, DM, Bueso-Ramos, C, Verstovsek, S, Medeiros, LJ, Miranda, RN: Systemic mastocytosis with associated clonal hematological non-mast cell lineage disease: Clinical significance and comparison of chomosomal abnormalities in SM and AHNMD components. *American Journal of Hematology,* 88: 219-224, 2013. https://doi.org/10.1002/ajh.23380
- 29. Damaj, G, Joris, M, Chandesris, O, Hanssens, K, Soucie, E, Canioni, D, Kolb, B, Durieu, I, Gyan, E, Livideanu, C, Chèze, S, Diouf, M, Garidi, R, Georgin-Lavialle, S, Asnafi, V, Lhermitte, L, Lavigne, C, Launay, D, Arock, M, Lortholary, O, Dubreuil, P, Hermine, O: ASXL1 but not TET2 mutations adversely impact overall survival of patients suffering systemic mastocytosis with associated clonal hematologic non-mast-cell diseases. *PLoS One*, 9: e85362, 2014. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0085362
- 30. Pardanani, A: Systemic mastocytosis in adults: 2017 update on diagnosis, risk stratification and management. *Am J Hematol*, 91: 1146-1159, 2016. https://doi.org/10.1002/ajh.24553

- 31. Valent, P: Diagnosis and management of mastocytosis: An emerging challenge in applied hematology. *Hematology*, 2015: 98-105, 2015. https://doi.org/10.1182/asheducation-2015.1.98
- 32. Valent, P, Sotlar, K, Sperr, WR, Escribano, L, Yavuz, S, Reiter, A, George, TI, Kluin-Nelemans, HC, Hermine, O, Butterfield, JH, Hägglund, H, Ustun, C, Hornick, JL, Triggiani, M, Radia, D, Akin, C, Hartmann, K, Gotlib, J, Schwartz, LB, Verstovsek, S, Orfao, A, Metcalfe, DD, Arock, M, Horny, HP: Refined diagnostic criteria and classification of mast cell leukemia (MCL) and myelomastocytic leukemia (MML): a consensus proposal. *Ann Oncol*, 25: 1691-1700, 2014. https://doi.org/10.1093/annonc/mdu047
- Pardanani, A, Lim, KH, Lasho, TL, Finke, C, McClure, RF, Li, CY, Tefferi, A: Prognostically relevant breakdown of 123 patients with systemic mastocytosis associated with other myeloid malignancies. *Blood*, 114: 3769-3772, 2009. https://doi.org/10.1182/blood-2009-05-220145
- 34. Lim, KH, Tefferi, A, Lasho, TL, Finke, C, Patnaik, M, Butterfield, JH, McClure, RF, Li, CY, Pardanani, A: Systemic mastocytosis in 342 consecutive adults: survival studies and prognostic factors. *Blood*, 113: 5727-5736, 2009. https://doi.org/10.1182/blood-2009-02-205237
- 35. Pardanani, A: Systemic mastocytosis in adults: 2015 update on diagnosis, risk stratification, and management. *Am J Hematol*, 90: 250-262, 2015. https://doi.org/10.1002/ajh.23931
- 36. Valent, P, Akin, C, Escribano, L, Födinger, M, Hartmann, K, Brockow, K, Castells, M, Sperr, WR, Kluin-Nelemans, HC, Hamdy, NAT, Lortholary, O, Robyn, J, Van Doormaal, J, Sotlar, K, Hauswirth, AW, Arock, M, Hermine, O, Hellmann, A, Triggiani, M, Niedoszytko, M, Schwartz, LB, Orfao, A, Horny, HP, Metcalfe, DD: Standards and standardization in mastocytosis: Consensus statements on diagnostics, treatment recommendations and response criteria. *European Journal of Clinical Investigation*, 37: 435-453, 2007. https://doi.org/10.1111/j.1365-2362.2007.01807.x
- 37. Jawhar, M, Schwaab, J, Hausmann, D, Clemens, J, Clemens, N, Henzler, T, Horny, HP, Sotlar, K, Schoenberg, SO, Cross, NCP, Fabarius, A, Hofmann, WK, Valent, P, Metzgeroth, G, Reiter, A: Splenomegaly, elevated alkaline phosphatase and mutations in the SRSF2/ASXL1/RUNX1 gene panel are strong adverse prognostic markers in patients with systemic mastocytosis. *Leukemia*, 30: 2342-2350, 2016. https://doi.org/10.1038/leu.2016.190
- 38. Jawhar, M, Schwaab, J, Schnittger, S, Meggendorfer, M, Pfirrmann, M, Sotlar, K, Horny, HP, Metzgeroth, G, Kluger, S, Naumann, N, Haferlach, C, Haferlach, T, Valent, P, Hofmann, WK, Fabarius, A, Cross, NC, Reiter, A: Additional mutations in SRSF2, ASXL1 and/or RUNX1 identify a high-risk group of patients with KIT D816V(+) advanced systemic mastocytosis. *Leukemia*, 30: 136-143, 2016. https://doi.org/10.1038/leu.2015.284
- 39. Naumann, N, Jawhar, M, Schwaab, J, Kluger, S, Lübke, J, Metzgeroth, G, Popp, HD, Khaled, N, Horny, HP, Sotlar, K, Valent, P, Haferlach, C, Göhring, G, Schlegelberger, B, Meggendorfer, M, Hofmann, WK, Cross, NCP, Reiter, A, Fabarius, A: Incidence and prognostic impact of cytogenetic aberrations in patients with systemic mastocytosis. *Genes Chromosomes Cancer*, 57: 252-259, 2018. https://doi.org/10.1002/gcc.22526
- 40. Hoermann, G, Gleixner, KV, Dinu, GE, Kundi, M, Greiner, G, Wimazal, F, Hadzijusufovic, E, Mitterbauer, G, Mannhalter, C, Valent, P, Sperr, WR: The KIT D816V allele burden predicts survival in patients with mastocytosis and correlates with the WHO type of the disease. *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 69: 810-813, 2014. https://doi.org/10.1111/all.12409
- 41. Lübke, J, Schwaab, J, Naumann, N, Horny, HP, Weiß, C, Metzgeroth, G, Kreil, S, Cross, NCP, Sotlar, K, Fabarius, A, Hofmann, WK, Valent, P, Gotlib, J, Jawhar, M, Reiter, A: Superior Efficacy of Midostaurin Over Cladribine in Advanced Systemic Mastocytosis: A Registry-Based Analysis. *J Clin Oncol*, 40: 1783-1794, 2022. https://doi.org/10.1200/jco.21.01849

- 42. Miettinen, M, Lasota, J: KIT (CD117): a review on expression in normal and neoplastic tissues, and mutations and their clinicopathologic correlation. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, 13: 205-220, 2005. https://doi.org/10.1097/01.pai.0000173054.83414.22
- 43. Krishnaswamy, G, Ajitawi, O, Chi, DS: The human mast cell: an overview. *Methods Mol Biol.* 315: 13-34, 2006. https://doi.org/10.1385/1-59259-967-2:013
- 44. Besmer, P, Murphy, JE, George, PC, Qiu, F, Bergold, PJ, Ledermasn, L, Snyder, HW, Brodeur, D, Zuckerman, EE, Hardy, WD: A new acute transforming feline retrovirus and relationship of its oncogene v-kit with the protein kinase gene family. *Nature*, 320: 415-421, 1986. https://doi.org/10.1038/320415a0
- 45. Yarden, Y, Kuang, WJ, Yang-Feng, T, Coussens, L, Munemitsu, S, Dull, TJ, Chen, E, Schlessinger, J, Francke, U, Ullrich, A: Human proto-oncogene c-kit: a new cell surface receptor tyrosine kinase for an unidentified ligand. *The EMBO journal*, 6: 3341-3351, 1987. https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1987.tb02655.x
- 46. Williams, DE, Eisenman, J, Baird, A, Rauch, C, Van Ness, K, March, CJ, Park, LS, Martin, U, Mochizuki, DY, Boswell, HS, et al.: Identification of a ligand for the c-kit proto-oncogene. *Cell*, 63: 167-174, 1990. https://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90297-r
- 47. Arakawa, T, Yphantis, DA, Lary, JW, Narhi, LO, Lu, HS, Prestrelski, SJ, Clogston, CL, Zsebo, KM, Mendiaz, EA, Wypych, J, et al.: Glycosylated and unglycosylated recombinant-derived human stem cell factors are dimeric and have extensive regular secondary structure. *J Biol Chem*, 266: 18942-18948, 1991.
- 48. Longley, BJ, Tyrrell, L, Ma, Y, Williams, DA, Halaban, R, Langley, K, Lu, HS, Schechter, NM: Chymase cleavage of stem cell factor yields a bioactive, soluble product. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94: 9017-9021, 1997. https://doi.org/10.1073/pnas.94.17.9017
- 49. Metcalfe, DD: Regulation of normal and neoplastic human mast cell development in mastocytosis. *Trans Am Clin Climatol Assoc.* 116: 185-203; discussion 203-184, 2005.
- 50. Ashman, LK, Ferrao, P, Cole, SR, Cambareri, AC: Effects of mutant c-Kit in early myeloid cells. *Leuk Lymphoma*, 34: 451-461, 1999. https://doi.org/10.3109/10428199909058472
- 51. Nocka, K, Majumder, S, Chabot, B, Ray, P, Cervone, M, Bernstein, A, Besmer, P: Expression of c-kit gene products in known cellular targets of W mutations in normal and W mutant mice--evidence for an impaired c-kit kinase in mutant mice. *Genes Dev,* 3: 816-826, 1989. https://doi.org/10.1101/gad.3.6.816
- 52. Heinrich, MC, Blanke, CD, Druker, BJ, Corless, CL: Inhibition of KIT tyrosine kinase activity: a novel molecular approach to the treatment of KIT-positive malignancies. *J Clin Oncol*, 20: 1692-1703, 2002. https://doi.org/10.1200/jco.2002.20.6.1692
- 53. Giebel, LB, Strunk, KM, Holmes, SA, Spritz, RA: Organization and nucleotide sequence of the human KIT (mast/stem cell growth factor receptor) proto-oncogene. *Oncogene*, 7: 2207-2217, 1992.
- 54. Chabot, B, Stephenson, DA, Chapman, VM, Besmer, P, Bernstein, A: The proto-oncogene c-kit encoding a transmembrane tyrosine kinase receptor maps to the mouse W locus. *Nature*, 335: 88-89, 1988. https://doi.org/10.1038/335088a0
- 55. Lev, S, Blechman, J, Nishikawa, S, Givol, D, Yarden, Y: Interspecies molecular chimeras of kit help define the binding site of the stem cell factor. *Molecular and Cellular Biology*, 13: 2224-2234, 1993. https://doi.org/10.1128/mcb.13.4.2224
- 56. Papayannopoulou, T, Brice, M, Broudy, VC, Zsebo, KM: Isolation of c-kit receptor-expressing cells from bone marrow, peripheral blood, and fetal liver: functional properties and composite antigenic profile. *Blood*, 78: 1403-1412, 1991.
- 57. Omura, T, Heldin, CH, Ostman, A: Immunoglobulin-like domain 4-mediated receptor-receptor interactions contribute to platelet-derived growth factor-induced receptor dimerization. *J Biol Chem*, 272: 12676-12682, 1997. https://doi.org/10.1074/jbc.272.19.12676
- 58. Zhang, Z, Zhang, R, Joachimiak, A, Schlessinger, J, Kong, XP: Crystal structure of human stem cell factor: implication for stem cell factor receptor dimerization and activation. *Proc Natl Acad Sci U S A,* 97: 7732-7737, 2000. https://doi.org/10.1073/pnas.97.14.7732

- 59. Blechman, JM, Lev, S, Barg, J, Eisenstein, M, Vaks, B, Vogel, Z, Givol, D, Yarden, Y: The fourth immunoglobulin domain of the stem cell factor receptor couples ligand binding to signal transduction. *Cell*, 80: 103-113, 1995. https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90455-7
- 60. Blume-Jensen, P, Claesson-Welsh, L, Siegbahn, A, Zsebo, KM, Westermark, B, Heldin, CH: Activation of the human c-kit product by ligand-induced dimerization mediates circular actin reorganization and chemotaxis. *Embo j,* 10: 4121-4128, 1991. https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1991.tb04989.x
- 61. Lemmon, MA, Pinchasi, D, Zhou, M, Lax, I, Schlessinger, J: Kit receptor dimerization is driven by bivalent binding of stem cell factor. *J Biol Chem*, 272: 6311-6317, 1997. https://doi.org/10.1074/jbc.272.10.6311
- 62. Broudy, VC, Lin, NL, Sabath, DF: The fifth immunoglobulin-like domain of the Kit receptor is required for proteolytic cleavage from the cell surface. *Cytokine*, 15: 188-195, 2001. https://doi.org/10.1006/cyto.2001.0907
- 63. Lev, S, Blechman, J, Nishikawa, S, Givol, D, Yarden, Y: Interspecies molecular chimeras of kit help define the binding site of the stem cell factor. *Mol Cell Biol*, 13: 2224-2234, 1993. https://doi.org/10.1128/mcb.13.4.2224-2234.1993
- 64. Hubbard, SR: Juxtamembrane autoinhibition in receptor tyrosine kinases. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 5: 464-470, 2004. https://doi.org/10.1038/nrm1399
- 65. Mol, CD, Dougan, DR, Schneider, TR, Skene, RJ, Kraus, ML, Scheibe, DN, Snell, GP, Zou, H, Sang, BC, Wilson, KP: Structural basis for the autoinhibition and STI-571 inhibition of c-Kit tyrosine kinase. *J Biol Chem*, 279: 31655-31663, 2004. https://doi.org/10.1074/jbc.M403319200
- 66. Ma, Y, Cunningham, ME, Wang, X, Ghosh, I, Regan, L, Longley, BJ: Inhibition of spontaneous receptor phosphorylation by residues in a putative alpha-helix in the KIT intracellular juxtamembrane region. *J Biol Chem*, 274: 13399-13402, 1999. https://doi.org/10.1074/jbc.274.19.13399
- 67. Thömmes, K, Lennartsson, J, Carlberg, M, Rönnstrand, L: Identification of Tyr-703 and Tyr-936 as the primary association sites for Grb2 and Grb7 in the c-Kit/stem cell factor receptor. *Biochem J*, 341 ( Pt 1): 211-216, 1999.
- 68. DiNitto, JP, Deshmukh, GD, Zhang, Y, Jacques, SL, Coli, R, Worrall, JW, Diehl, W, English, JM, Wu, JC: Function of activation loop tyrosine phosphorylation in the mechanism of c-Kit auto-activation and its implication in sunitinib resistance. *J Biochem,* 147: 601-609, 2010. https://doi.org/10.1093/jb/mvq015
- 69. Kazlauskas, A, Durden, DL, Cooper, JA: Functions of the major tyrosine phosphorylation site of the PDGF receptor beta subunit. *Cell Regul*, 2: 413-425, 1991. https://doi.org/10.1091/mbc.2.6.413
- 70. Lev, S, Yarden, Y, Givol, D: Dimerization and activation of the kit receptor by monovalent and bivalent binding of the stem cell factor. *J Biol Chem*, 267: 15970-15977, 1992.
- 71. Roskoski, R, Jr.: Signaling by Kit protein-tyrosine kinase--the stem cell factor receptor. *Biochem Biophys Res Commun*, 337: 1-13, 2005. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.08.055
- 72. Piao, X, Bernstein, A: A point mutation in the catalytic domain of c-kit induces growth factor independence, tumorigenicity, and differentiation of mast cells. *Blood*, 87: 3117-3123, 1996.
- 73. Furitsu, T, et al.: Identification of mutations in the coding sequence of the proto-oncogene c-kit in a human mast cell leukemia cell line causing ligand-independent activation of c-kit product. *J Clin Invest*, 92: 1736-1744, 1993. https://doi.org/10.1172/jci116761
- 74. Hashimoto, K, Tsujimura, T, Moriyama, Y, Yamatodani, A, Kimura, M, Tohya, K, Morimoto, M, Kitayama, H, Kanakura, Y, Kitamura, Y: Transforming and differentiation-inducing potential of constitutively activated c-kit mutant genes in the IC-2 murine interleukin-3-dependent mast cell line. *Am J Pathol*, 148: 189-200, 1996.
- 75. Tsujimura, T, Hashimoto, K, Kitayama, H, Ikeda, H, Sugahara, H, Matsumura, I, Kaisho, T, Terada, N, Kitamura, Y, Kanakura, Y: Activating mutation in the catalytic domain of c-kit elicits hematopoietic transformation by receptor self-association not at the ligand-induced dimerization site. *Blood*, 93: 1319-1329, 1999.

- 76. Kitayama, H, Kanakura, Y, Furitsu, T, Tsujimura, T, Oritani, K, Ikeda, H, Sugahara, H, Mitsui, H, Kanayama, Y, Kitamura, Y, et al.: Constitutively activating mutations of c-kit receptor tyrosine kinase confer factor-independent growth and tumorigenicity of factor-dependent hematopoietic cell lines. *Blood*, 85: 790-798, 1995.
- 77. Kitamura, Y, Tsujimura, T, Jippo, T, Kasugai, T, Kanakura, Y: Regulation of development, survival and neoplastic growth of mast cells through the c-kit receptor. *Int Arch Allergy Immunol*, 107: 54-56, 1995. https://doi.org/10.1159/000236929
- 78. Longley, BJ, Reguera, MJ, Ma, Y: Classes of c-KIT activating mutations: proposed mechanisms of action and implications for disease classification and therapy. *Leuk Res*, 25: 571-576, 2001. https://doi.org/10.1016/s0145-2126(01)00028-5
- 79. Lux, ML, Rubin, BP, Biase, TL, Chen, CJ, Maclure, T, Demetri, G, Xiao, S, Singer, S, Fletcher, CD, Fletcher, JA: KIT extracellular and kinase domain mutations in gastrointestinal stromal tumors. *Am J Pathol*, 156: 791-795, 2000. https://doi.org/10.1016/s0002-9440(10)64946-2
- 80. Ma, Y, Longley, BJ, Wang, X, Blount, JL, Langley, K, Caughey, GH: Clustering of activating mutations in c-KIT's juxtamembrane coding region in canine mast cell neoplasms. *J Invest Dermatol*, 112: 165-170, 1999. https://doi.org/10.1046/j.1523-1747.1999.00488.x
- 81. Furitsu, T, Tsujimura, T, Tono, T, Ikeda, H, Kitayama, H, Koshimizu, U, Sugahara, H, Butterfield, JH, Ashman, LK, Kanayama, Y, Matsuzawa, Y, Kitamura, Y, Kanakura, Y: Identification of mutations in the coding sequence of the proto-oncogene c-kit in a human mast cell leukemia cell line causing ligand-independent activation of c-kit product. *Journal of Clinical Investigation*, 92: 1736-1744, 1993. https://doi.org/10.1172/JCI116761
- 82. Garcia-Montero, AC, Jara-Acevedo, M, Teodosio, C, Sanchez, ML, Nunez, R, Prados, A, Aldanondo, I, Sanchez, L, Dominguez, M, Botana, LM, Sanchez-Jimenez, F, Sotlar, K, Almeida, J, Escribano, L, Orfao, A: KIT mutation in mast cells and other bone marrow hematopoietic cell lineages in systemic mast cell disorders: a prospective study of the Spanish Network on Mastocytosis (REMA) in a series of 113 patients. *Blood*, 108: 2366-2372, 2006. https://doi.org/10.1182/blood-2006-04-015545
- 83. Taylor, ML, Dastych, J, Sehgal, D, Sundstrom, M, Nilsson, G, Akin, C, Mage, RG, Metcalfe, DD: The Kit-activating mutation D816V enhances stem cell factor--dependent chemotaxis. *Blood*, 98: 1195-1199, 2001. https://doi.org/10.1182/blood.v98.4.1195
- 84. Barnstein, BO, Li, G, Wang, Z, Kennedy, S, Chalfant, C, Nakajima, H, Bunting, KD, Ryan, JJ: Stat5 expression is required for IgE-mediated mast cell function. *J Immunol*, 177: 3421-3426, 2006. https://doi.org/10.4049/jimmunol.177.5.3421
- 85. Akin, C, Fumo, G, Yavuz, AS, Lipsky, PE, Neckers, L, Metcalfe, DD: A novel form of mastocytosis associated with a transmembrane c-kit mutation and response to imatinib. *Blood*, 103: 3222-3225, 2004. https://doi.org/10.1182/blood-2003-11-3816
- 86. Southern, EM: Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol*, 98: 503-517, 1975. https://doi.org/10.1016/s0022-2836(75)80083-0
- 87. Thomas, PS: Hybridization of denatured RNA and small DNA fragments transferred to nitrocellulose. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 77: 5201-5205, 1980. https://doi.org/10.1073/pnas.77.9.5201
- 88. Gibbs, RA: DNA amplification by the polymerase chain reaction. *Anal Chem*, 62: 1202-1214, 1990. https://doi.org/10.1021/ac00212a004
- 89. Mullis, K, Faloona, F, Scharf, S, Saiki, R, Horn, G, Erlich, H: Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 51 Pt 1: 263-273, 1986. https://doi.org/10.1101/sqb.1986.051.01.032
- 90. Erlich, HA, Arnheim, N: Genetic analysis using the polymerase chain reaction. *Annual Review of Genetics*, 26: 479-506, 1992. https://doi.org/10.1146/annurev.ge.26.120192.002403
- 91. Saiki, RK, Gelfand, DH, Stoffel, S, Scharf, SJ, Higuchi, R, Horn, GT, Mullis, KB, Erlich, HA: Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239: 487-491, 1988. https://doi.org/10.1126/science.2448875

- 92. Li, HH, Gyllensten, UB, Cui, XF, Saiki, RK, Erlich, HA, Arnheim, N: Amplification and analysis of DNA sequences in single human sperm and diploid cells. *Nature*, 335: 414-417, 1988. https://doi.org/10.1038/335414a0
- 93. Chien, A, Edgar, DB, Trela, JM: Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile Thermus aquaticus. *J Bacteriol*, 127: 1550-1557, 1976. https://doi.org/10.1128/jb.127.3.1550-1557.1976
- 94. Kogan, SC, Doherty, M, Gitschier, J: An improved method for prenatal diagnosis of genetic diseases by analysis of amplified DNA sequences. Application to hemophilia A. *N Engl J Med*, 317: 985-990, 1987. https://doi.org/10.1056/nejm198710153171603
- 95. Caruthers, MH, Barone, AD, Beaucage, SL, Dodds, DR, Fisher, EF, McBride, LJ, Matteucci, M, Stabinsky, Z, Tang, JY: Chemical synthesis of deoxyoligonucleotides by the phosphoramidite method. *Methods Enzymol*, 154: 287-313, 1987. https://doi.org/10.1016/0076-6879(87)54081-2
- 96. Siebert, PD, Larrick, JW: Competitive PCR. *Nature*, 359: 557-558, 1992. https://doi.org/10.1038/359557a0
- 97. Wang, AM, Doyle, MV, Mark, DF: Quantitation of mRNA by the polymerase chain reaction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86: 9717-9721, 1989. https://doi.org/10.1073/pnas.86.24.9717
- 98. Ferre, F: Quantitative or semi-quantitative PCR: reality versus myth. *PCR Methods Appl*, 2: 1-9, 1992. https://doi.org/10.1101/gr.2.1.1
- 99. Raeymaekers, L: A commentary on the practical applications of competitive PCR. *Genome Research*, 5: 91-94, 1995. https://doi.org/10.1101/gr.5.1.91
- 100. McCulloch, RK, Choong, CS, Hurley, DM: An evaluation of competitor type and size for use in the determination of mRNA by competitive PCR. *PCR Methods Appl*, 4: 219-226, 1995. https://doi.org/10.1101/gr.4.4.219
- 101. Piatak, M, Jr., Luk, KC, Williams, B, Lifson, JD: Quantitative competitive polymerase chain reaction for accurate quantitation of HIV DNA and RNA species. *Biotechniques*, 14: 70-81, 1993.
- 102. Becker-André, M, Hahlbrock, K: Absolute mRNA quantification using the polymerase chain reaction (PCR). A novel approach by a PCR aided transcipt titration assay (PATTY). Nucleic Acids Research, 17: 9437-9446, 1989. https://doi.org/10.1093/nar/17.22.9437
- 103. Volkenandt, M, Dicker, AP, Banerjee, D, Fanin, R, Schweitzer, B, Horikoshi, T, Danenberg, K, Danenberg, P, Bertino, JR: Quantitation of gene copy number and mRNA using the polymerase chain reaction. *Proc Soc Exp Biol Med*, 200: 1-6, 1992. https://doi.org/10.3181/00379727-200-43387
- 104. Sugimoto, T, Fujita, M, Taguchi, T, Morita, T: Quantitative detection of DNA by coamplification polymerase chain reaction: a wide detectable range controlled by the thermodynamic stability of primer template duplexes. *Anal Biochem*, 211: 170-172, 1993. https://doi.org/10.1006/abio.1993.1249
- 105. Becker-André, M, Hahlbrock, K: Absolute mRNA quantification using the polymerase chain reaction (PCR). A novel approach by a PCR aided transcript titration assay (PATTY). *Nucleic Acids Res*, 17: 9437-9446, 1989. https://doi.org/10.1093/nar/17.22.9437
- 106. Gilliland, G, Perrin, S, Blanchard, K, Bunn, HF: Analysis of cytokine mRNA and DNA: detection and quantitation by competitive polymerase chain reaction. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87: 2725-2729, 1990. https://doi.org/10.1073/pnas.87.7.2725
- 107. Wang, AM, Doyle, MV, Mark, DF: Quantitation of mRNA by the polymerase chain reaction. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86: 9717-9721, 1989. https://doi.org/10.1073/pnas.86.24.9717
- 108. Schmidt, EE, Merrill, GF: Changes in dihydrofolate reductase (DHFR) mRNA levels can account fully for changes in DHFR synthesis rates during terminal differentiation in a highly amplified myogenic cell line. *Mol Cell Biol*, 11: 3726-3734, 1991. https://doi.org/10.1128/mcb.11.7.3726-3734.1991

- 109. Siebert, PD, Fukuda, M: Induction of cytoskeletal vimentin and actin gene expression by a tumor-promoting phorbol ester in the human leukemic cell line K562. *J Biol Chem*, 260: 3868-3874, 1985.
- 110. Fasco, MJ, Treanor, CP, Spivack, S, Figge, HL, Kaminsky, LS: Quantitative RNA-polymerase chain reaction-DNA analysis by capillary electrophoresis and laser-induced fluorescence. *Anal Biochem*, 224: 140-147, 1995. https://doi.org/10.1006/abio.1995.1019
- 111. Mulder, J, McKinney, N, Christopherson, C, Sninsky, J, Greenfield, L, Kwok, S: Rapid and simple PCR assay for quantitation of human immunodeficiency virus type 1 RNA in plasma: application to acute retroviral infection. *J Clin Microbiol*, 32: 292-300, 1994. https://doi.org/10.1128/jcm.32.2.292-300.1994
- 112. Chehab, FF, Doherty, M, Cai, SP, Kan, YW, Cooper, S, Rubin, EM: Detection of sickle cell anaemia and thalassaemias. *Nature*, 329: 293-294, 1987. https://doi.org/10.1038/329293b0
- 113. Higuchi, R, Dollinger, G, Walsh, PS, Griffith, R: Simultanious amplification and detection of specific Dna Sequences. 10: 413-417, 1992.
- 114. Gibson, UE, Heid, CA, Williams, PM: A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Res*, 6: 995-1001, 1996. https://doi.org/10.1101/gr.6.10.995
- 115. Heid, CA, Stevens, J, Livak, KJ, Williams, PM: Real time quantitative PCR. *Genome Res*, 6: 986-994, 1996. https://doi.org/10.1101/gr.6.10.986
- 116. Wittwer, CT, Herrmann, MG, Moss, AA, Rasmussen, RP: Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *Biotechniques*, 22: 130-131, 134-138, 1997. https://doi.org/10.2144/97221bi01
- 117. Livak, KJ, Flood, SJA, Marmaro, J, Giusti, W, Deetz, K: Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *Genome Research*, 4: 357-362, 1995. https://doi.org/10.1101/gr.4.6.357
- 118. Wittwer, CT, Ririe, KM, Andrew, RV, David, DA, Gundry, RA, Balis, UJ: The LightCycler: a microvolume multisample fluorimeter with rapid temperature control. *Biotechniques*, 22: 176-181, 1997. https://doi.org/10.2144/97221pf02
- 119. Kreuzer, KA, Lass, U, Bohn, A, Landt, O, Schmidt, CA: Lightcycler technology for the quantitation of bcr/abl fusion transcripts. *Cancer Research*, 59: 3171-3174, 1999.
- 120. Hindson, BJ, Ness, KD, Masquelier, DA, Belgrader, P, Heredia, NJ, Makarewicz, AJ, Bright, IJ, Lucero, MY, Hiddessen, AL, Legler, TC, Kitano, TK, Hodel, MR, Petersen, JF, Wyatt, PW, Steenblock, ER, Shah, PH, Bousse, LJ, Troup, CB, Mellen, JC, Wittmann, DK, Erndt, NG, Cauley, TH, Koehler, RT, So, AP, Dube, S, Rose, KA, Montesclaros, L, Wang, S, Stumbo, DP, Hodges, SP, Romine, S, Milanovich, FP, White, HE, Regan, JF, Karlin-Neumann, GA, Hindson, CM, Saxonov, S, Colston, BW: High-throughput droplet digital PCR system for absolute quantitation of DNA copy number. Anal Chem, 83: 8604-8610, 2011. https://doi.org/10.1021/ac202028g
- 121. Vogelstein, B, Kinzler, KW: Digital PCR. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96: 9236-9241, 1999. https://doi.org/10.1073/pnas.96.16.9236
- 122. Gibbs, RA, Nguyen, PN, McBride, LJ, Koepf, SM, Caskey, CT: Identification of mutations leading to the Lesch-Nyhan syndrome by automated direct DNA sequencing of in vitro amplified cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A,* 86: 1919-1923, 1989. https://doi.org/10.1073/pnas.86.6.1919
- 123. Madewell, BR, Gumerlock, PH, Saunders, KA, Meyers, FJ, Kraegel, SA, Kawasaki, ES: Canine and bovine ras family expression detected and discriminated by use of polymerase chain reaction. *Anticancer Res*, 9: 1743-1749, 1989.
- 124. Veres, G, Gibbs, RA, Scherer, SE, Caskey, CT: The molecular basis of the sparse fur mouse mutation. *Science*, 237: 415-417, 1987. https://doi.org/10.1126/science.3603027
- 125. Tan, X, Sun, X, Gonzalez-Crussi, FX, Gonzalez-Crussi, F, Hsueh, W: PAF and TNF increase the precursor of NF-kappa B p50 mRNA in mouse intestine: quantitative analysis by competitive PCR. *Biochim Biophys Acta*, 1215: 157-162, 1994. https://doi.org/10.1016/0005-2760(94)90105-8

- 126. Huang, SK, Yi, M, Palmer, E, Marsh, DG: A dominant T cell receptor beta-chain in response to a short ragweed allergen, Amb a 5. *J Immunol*, 154: 6157-6162, 1995.
- 127. Gorello, P, Cazzaniga, G, Alberti, F, Dell'Oro, MG, Gottardi, E, Specchia, G, Roti, G, Rosati, R, Martelli, MF, Diverio, D, Lo Coco, F, Biondi, A, Saglio, G, Mecucci, C, Falini, B: Quantitative assessment of minimal residual disease in acute myeloid leukemia carrying nucleophosmin (NPM1) gene mutations. *Leukemia*, 20: 1103-1108, 2006. https://doi.org/10.1038/sj.leu.2404149
- 128. Hoermann, G, Gleixner, KV, Dinu, GE, Kundi, M, Greiner, G, Wimazal, F, Hadzijusufovic, E, Mitterbauer, G, Mannhalter, C, Valent, P, Sperr, WR: The KIT D816V allele burden predicts survival in patients with mastocytosis and correlates with the WHO type of the disease. *Allergy*, 69: 810-813, 2014. https://doi.org/10.1111/all.12409
- 129. Erben, P, Schwaab, J, Metzgeroth, G, Horny, HP, Jawhar, M, Sotlar, K, Fabarius, A, Teichmann, M, Schneider, S, Ernst, T, Müller, MC, Giehl, M, Marx, A, Hartmann, K, Hochhaus, A, Hofmann, WK, Cross, NCP, Reiter, A: The KIT D816V expressed allele burden for diagnosis and disease monitoring of systemic mastocytosis. *Annals of Hematology*, 93: 81-88, 2014. https://doi.org/10.1007/s00277-013-1964-1
- 130. Jawhar, M, Schwaab, J, Naumann, N, Horny, HP, Sotlar, K, Haferlach, T, Metzgeroth, G, Fabarius, A, Valent, P, Hofmann, WK, Cross, NCP, Meggendorfer, M, Reiter, A: Response and progression on midostaurin in advanced systemic mastocytosis: KIT D816V and other molecular markers. *Blood*, 130: 137-145, 2017. https://doi.org/10.1182/blood-2017-01-764423
- 131. Lübke, J, Naumann, N, Kluger, S, Schwaab, J, Metzgeroth, G, Evans, E, Gardino, AK, Lengauer, C, Hofmann, WK, Fabarius, A, Cross, NCP, Reiter, A, Jawhar, M: Inhibitory effects of midostaurin and avapritinib on myeloid progenitors derived from patients with KIT D816V positive advanced systemic mastocytosis. *Leukemia*, 33: 1195-1205, 2019. https://doi.org/10.1038/s41375-019-0450-8
- 132. Fantasia, F, Di Capua, EN, Cenfra, N, Pessina, G, Mecarocci, S, Rago, A, Cotroneo, E, Busanello, A, Equitani, F, Lo-Coco, F, Nervi, C, Cimino, G: A highly specific q-RT-PCR assay to address the relevance of the JAK2WT and JAK2V617F expression levels and control genes in Ph-negative myeloproliferative neoplasms. *Ann Hematol*, 93: 609-616, 2014. https://doi.org/10.1007/s00277-013-1920-0
- 133. Kim, HR, Choi, HJ, Kim, YK, Kim, HJ, Shin, JH, Suh, SP, Ryang, DW, Shin, MG: Allelic expression imbalance of JAK2 V617F mutation in BCR-ABL negative PLoS myeloproliferative neoplasms. One, 8: e52518, 2013. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0052518
- 134. Racchumi, J, Tam, W, Kluk, MJ: Clinical Laboratory Validation and Implementation of Quantitative, Real-Time PCR-based Detection of NPM1 Type A Mutation. *Clin Lab*, 66, 2020. https://doi.org/10.7754/Clin.Lab.2020.200104
- 135. Ståhlberg, A, Håkansson, J, Xian, X, Semb, H, Kubista, M: Properties of the reverse transcription reaction in mRNA quantification. *Clin Chem*, 50: 509-515, 2004. https://doi.org/10.1373/clinchem.2003.026161
- 136. Bustin, SA, Nolan, T: Pitfalls of quantitative real-time reverse-transcription polymerase chain reaction. *J Biomol Tech*, 15: 155-166, 2004.
- 137. Bustin, SA: Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *J Mol Endocrinol*, 29: 23-39, 2002. https://doi.org/10.1677/jme.0.0290023
- 138. Corless, CL, Harrell, P, Lacouture, M, Bainbridge, T, Le, C, Gatter, K, White, C, Jr., Granter, S, Heinrich, MC: Allele-specific polymerase chain reaction for the imatinibresistant KIT D816V and D816F mutations in mastocytosis and acute myelogenous leukemia. *J Mol Diagn*, 8: 604-612, 2006. https://doi.org/10.2353/jmoldx.2006.060089
- 139. Kristensen, T, Vestergaard, H, Møller, MB: Improved detection of the KIT D816V mutation in patients with systemic mastocytosis using a quantitative and highly sensitive real-time qPCR assay. *J Mol Diagn*, 13: 180-188, 2011. https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2010.10.004

- 140. Tan, A, Westerman, D, McArthur, GA, Lynch, K, Waring, P, Dobrovic, A: Sensitive detection of KIT D816V in patients with mastocytosis. *Clinical Chemistry*, 52: 2250-2257, 2006. https://doi.org/10.1373/clinchem.2006.068205
- 141. Greiner, G, Gurbisz, M, Ratzinger, F, Witzeneder, N, Simonitsch-Klupp, I, Mitterbauer-Hohendanner, G, Mayerhofer, M, Müllauer, L, Sperr, WR, Valent, P, Hoermann, G: Digital PCR: A sensitive and precise method for KIT D816V quantification in mastocytosis. *Clinical Chemistry*, 64: 547-555, 2018. https://doi.org/10.1373/clinchem.2017.277897
- 142. De Matteis, G, Zanotti, R, Colarossi, S, De Benedittis, C, Garcia-Montero, A, Bonifacio, M, Sartori, M, Aprili, F, Caruso, B, Paviati, E, Carli, G, Perbellini, O, Zamò, A, Bonadonna, P, Pizzolo, G, Guidi, G, Martinelli, G, Soverini, S: The impact of sensitive KIT D816V detection on recognition of Indolent Systemic Mastocytosis. *Leukemia Research*, 39: 273-278, 2015. https://doi.org/10.1016/j.leukres.2014.11.029
- 143. Kristensen, T, Vestergaard, H, Bindslev-Jensen, C, Møller, MB, Broesby-Olsen, S: Sensitive KIT D816V mutation analysis of blood as a diagnostic test in mastocytosis. American Journal of Hematology, 89: 493-498, 2014. https://doi.org/10.1002/ajh.23672
- 144. Armbruster, DA, Pry, T: Limit of blank, limit of detection and limit of quantitation. *The Clinical biochemist Reviews*, 29 Suppl 1: S49-52, 2008.
- 145. Chomczynski, P, Sacchi, N: Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, 162: 156-159, 1987. https://doi.org/10.1006/abio.1987.9999
- 146. Naumann, N, Lübke, J, Baumann, S, Schwaab, J, Hoffmann, O, Kreil, S, Dangelo, V, Reiter, L, Bugert, P, Kristensen, T, Sotlar, K, Haselmann, V, Schneider, S, Metzgeroth, G, Weiss, C, Popp, HD, Fabarius, A, Hofmann, WK, Cross, NCP, Reiter, A, Jawhar, M: Adverse Prognostic Impact of the KIT D816V Transcriptional Activity in Advanced Systemic Mastocytosis. *Int J Mol Sci*, 22, 2021. https://doi.org/10.3390/ijms22052562
- 147. Bustin, SA, Benes, V, Garson, JA, Hellemans, J, Huggett, J, Kubista, M, Mueller, R, Nolan, T, Pfaffl, MW, Shipley, GL, Vandesompele, J, Wittwer, CT: The MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical Chemistry*, 55: 611-622, 2009. https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797
- 148. Cronin, M, Ghosh, K, Sistare, F, Quackenbush, J, Vilker, V, O'Connell, C: Universal RNA reference materials for gene expression. *Clin Chem*, 50: 1464-1471, 2004. https://doi.org/10.1373/clinchem.2004.035675
- 149. Sipos, R, Székely, AJ, Palatinszky, M, Révész, S, Márialigeti, K, Nikolausz, M: Effect of primer mismatch, annealing temperature and PCR cycle number on 16S rRNA genetargetting bacterial community analysis. *FEMS Microbiol Ecol*, 60: 341-350, 2007. https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2007.00283.x
- 150. Whiley, DM, Sloots, TP: Sequence variation in primer targets affects the accuracy of viral quantitative PCR. *J Clin Virol*, 34: 104-107, 2005. https://doi.org/10.1016/j.jcv.2005.02.010
- 151. Waterfall, CM, Eisenthal, R, Cobb, BD: Kinetic characterisation of primer mismatches in allele-specific PCR: a quantitative assessment. *Biochem Biophys Res Commun*, 299: 715-722, 2002. https://doi.org/10.1016/s0006-291x(02)02750-x
- 152. Kristensen, T, Preiss, B, Broesby-Olsen, S, Vestergaard, H, Friis, L, Møller, MB: Systemic mastocytosis is uncommon in KIT D816V mutation positive core-binding factor acute myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma*, 53: 1338-1344, 2012. https://doi.org/10.3109/10428194.2011.647314
- 153. Kristensen, T, Vestergaard, H, Møller, MB: Improved detection of the KIT D816V mutation in patients with systemic mastocytosis using a quantitative and highly sensitive real-time qPCR assay. *Journal of Molecular Diagnostics*, 13: 180-188, 2011. https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2010.10.004
- 154. Sidstedt, M, Rådström, P, Hedman, J: PCR inhibition in qPCR, dPCR and MPS-mechanisms and solutions. *Anal Bioanal Chem*, 412: 2009-2023, 2020. https://doi.org/10.1007/s00216-020-02490-2

- 155. Nilsson, G, Blom, T, Kusche-Gullberg, M, Kjellén, L, Butterfield, JH, Sundström, C, Nilsson, K, Hellman, L: Phenotypic characterization of the human mast-cell line HMC-1. *Scand J Immunol*, 39: 489-498, 1994. https://doi.org/10.1111/j.1365-3083.1994.tb03404.x
- 156. Lanotte, M, Martin-Thouvenin, V, Najman, S, Balerini, P, Valensi, F, Berger, R: NB4, a maturation inducible cell line with t(15;17) marker isolated from a human acute promyelocytic leukemia (M3). *Blood*, 77: 1080-1086, 1991.
- 157. Corless, CL, Harrell, P, Lacouture, M, Bainbridge, T, Le, C, Gatter, K, White, C, Granter, S, Heinrich, MC: Allele-specific polymerase chain reaction for the imatinib-resistant KIT D816V and D816F mutations in mastocytosis and acute myelogenous leukemia. *Journal of Molecular Diagnostics*, 8: 604-612, 2006. https://doi.org/10.2353/jmoldx.2006.060089
- 158. Ramsden, SC, Daly, S, Geilenkeuser, WJ, Duncan, G, Hermitte, F, Marubini, E, Neumaier, M, Orlando, C, Palicka, V, Paradiso, A, Pazzagli, M, Pizzamiglio, S, Verderio, P: EQUAL-quant: an international external quality assessment scheme for real-time PCR. *Clin Chem*, 52: 1584-1591, 2006. https://doi.org/10.1373/clinchem.2005.066019
- 159. Ben-Dov, C, Hartmann, B, Lundgren, J, Valcárcel, J: Genome-wide analysis of alternative pre-mRNA splicing. *J Biol Chem*, 283: 1229-1233, 2008. https://doi.org/10.1074/jbc.R700033200
- 160. Gygi, SP, Rochon, Y, Franza, BR, Aebersold, R: Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. *Mol Cell Biol*, 19: 1720-1730, 1999. https://doi.org/10.1128/mcb.19.3.1720
- 161. Landi, D, Gemignani, F, Naccarati, A, Pardini, B, Vodicka, P, Vodickova, L, Novotny, J, Försti, A, Hemminki, K, Canzian, F, Landi, S: Polymorphisms within micro-RNA-binding sites and risk of sporadic colorectal cancer. *Carcinogenesis*, 29: 579-584, 2008. https://doi.org/10.1093/carcin/bgm304
- 162. Micke, P, Ohshima, M, Tahmasebpoor, S, Ren, ZP, Ostman, A, Pontén, F, Botling, J: Biobanking of fresh frozen tissue: RNA is stable in nonfixed surgical specimens. *Lab Invest*, 86: 202-211, 2006. https://doi.org/10.1038/labinvest.3700372
- 163. Fleige, S, Pfaffl, MW: RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance. *Mol Aspects Med,* 27: 126-139, 2006. https://doi.org/10.1016/j.mam.2005.12.003
- 164. Kristensen, T, Vestergaard, H, Bindslev-Jensen, C, Mortz, CG, Kjaer, HF, Ollert, M, Møller, MB, Broesby-Olsen, S: Prospective evaluation of the diagnostic value of sensitive KIT D816V mutation analysis of blood in adults with suspected systemic mastocytosis. *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 72: 1737-1743, 2017. https://doi.org/10.1111/all.13187
- 165. Racchumi, J, Tam, W, Kluk, MJ: Clinical laboratory validation and implementation of quantitative, real-time PCR-based monitoring of NPM1 Type A mutation. *medRxiv*, 2019. https://doi.org/10.1101/19010124
- 166. Abdel-Wahab, O: Genetics of the myeloproliferative neoplasms. *Curr Opin Hematol*, 18: 117-123, 2011. https://doi.org/10.1097/MOH.0b013e328343998e

#### Teilergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden veröffentlicht in:

Naumann, N., Lübke, J., **Baumann, S.,** Schwaab, J., Hoffmann, O., Kreil, S., Dangelo, V., Reiter, L., Bugert, P., Kristensen, T., Sotlar, K., Haselmann, V., Schneider, S., Metzgeroth, G., Weiss, C., Popp, H. D., Fabarius, A., Hofmann, W. K., Cross, N. C. P., Reiter, A., Jawhar, M. (2021). Adverse prognostic impact of the kit d816v transcriptional activity in advanced systemic mastocytosis. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(5), 1-12.

### **Eigene Publikationen:**

Naumann, N., Lübke, J., **Baumann, S.,** Schwaab, J., Hoffmann, O., Kreil, S., Dangelo, V., Reiter, L., Bugert, P., Kristensen, T., Sotlar, K., Haselmann, V., Schneider, S., Metzgeroth, G., Weiss, C., Popp, H. D., Fabarius, A., Hofmann, W. K., Cross, N. C. P., Reiter, A., Jawhar, M. (2021). Adverse prognostic impact of the kit d816v transcriptional activity in advanced systemic mastocytosis. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(5), 1-12

# 7 Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1</b> : Schematische Darstellung des KII-Rezeptors und seiner
Funktionsweise9
Abbildung 2: Historie molekulargenetischer Detektionsmethoden
Abbildung 3: PCR-Programm der TaqMan qPCR
Abbildung 4: pBluescript II SK - Plasmid mit KIT D816V und WT-Insert eingesetzt an
der Restriktionsstelle Pstl
Abbildung 5: Darstellung eines Amplifikationsplots der neu etablierten TaqMan qPCR
39
Abbildung 6: ROC-Analyse zur Validierung von klinischer Sensitivität, diagnostischer
Spezifität und Cut-off-Werten44
Abbildung 7: "Accuracy": Korrelation der TaqMan-KIT D816V EAB mit der LC-KIT
D816V EAB bei 116 Patient*innenproben
Abbildung 8: Auswahl der Verlaufsproben
Abbildung 9: Verlaufsmessungen zu unterschiedlichen Zeitpunkten im
Krankheitsverlauf47
Abbildung 10: Intra-und Interassayvariabilität
Abbildung 11: Vergleich des expressed allele burden (EAB, cDNA) und der variant
allele frequency (VAF, DNA) bei indolenter Mastozytose (ISM, n=40) und
fortgeschrittener Mastozytose (AdvSM, n=121)51
Abbildung 12: Medianes Gesamtüberleben von Kohorte A und B im Vergleich 55

## 8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:    WHO-Klassifikation der Mastozytose      2
Tabelle 2: Diagnosekriterien der systemischen Mastozytose         4
Tabelle 3: Mittelwerte der Ct-Werte der Verdünnungsreihe, sowie deren
Standardabweichung und Varianz38
Tabelle 4: LODs und wildtypabhängige Cut-off-Werte der TaqMan qPCR für 116
Patient*innenproben40
Tabelle 5: LODs und wildtypunabhängige Cut-off-Werte der LC-qPCR für 116
Patient*innenproben einer historischen Kohorte41
Tabelle 6: Bestimmung von klinischer Sensitivität und diagnostischer Spezifität, positiv
prädiktivem Wert, negativ prädiktivem Wert und diagnostischer Odds-Ratio 42
Tabelle 7: Klinische, laborchemische und therapeutische Charakteristika, sowie
Outcome von Patient*innen mit ISM und AdvSM49
Tabelle 8: Klinische, laborchemische, molekulare Charakteristika, sowie Outcome von
121 Patient*innen mit AdvSM eingeteilt nach EAB/VAF Koeffizient ≤ 2 (Kohorte A) und
> 2 (Kohorte B)

### 9 Lebenslauf

### **PERSONALIEN**

Name und Vorname: Sofie Baumann

Geburtsdatum: 15.11.1995

Geburtsort: Fürth/Bayern

Familienstand: ledig

### SCHULISCHER WERDEGANG

2006 - 2014 Albert-Schweitzer-Gymnasium Gernsbach

12.06.2014 Abitur

### UNIVERSITÄRER WERDEGANG

WS2015/16	Beginn des Studiums (Medizin) an der Medizinischen
	Fakultät Mannheim der Universität Heidelberg
18.09.2017	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (M1)
07.10.2021	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (M2)
06.12.2022	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (M3)

### 10 Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Andreas Reiter für das mir entgegengebrachte Vertrauen bei der Überlassung des Dissertationsthemas und für die exzellente Einbindung in seine Forschungsgruppe bedanken.

Herrn Prof. Dr. med. Wolf-Karsten Hofmann, Direktor der III. Medizinischen Klinik der Universitätsmedizin Mannheim, danke ich für die Möglichkeit der Promotion im Wissenschaftlichen Labor.

Meiner Betreuerin Frau Dr. sc. hum. Nicole Naumann danke ich für die außergewöhnlich große fachliche und persönliche Unterstützung, für die Einarbeitung im Labor, für die vielen Ratschläge und Hilfestellungen, die endlose Geduld und Freundlichkeit sowie die stets motivierenden Worte in jedem Abschnitt meiner Promotion zu allen Tages- und Nachtzeiten trotz ihrer hohen Anforderungen und Verpflichtungen im Wissenschaftlichem Labor und in der Forschung. Ich hätte mir keine bessere Betreuung vorstellen können.

Bei Frau Prof. Dr. rer. nat. Alice Fabarius möchte ich mich für die wertvolle Unterstützung im Laboralltag und die große Fachkunde bedanken, mit welcher sie mir auf den letzten Metern dieser Arbeit zur Seite stand.

Gleichsam bedanken möchte ich mich auch bei all den weiteren Mitarbeiter\*innen des hämatologischen Forschungslabors für die angenehme Zusammenarbeit. Mein besonderer Dank gilt hierbei Irina für die Einarbeitung am TaqMan-Gerät und die freundliche und immer hilfreiche Unterstützung.

Den größten Dank für ihren bedingungslosen Rückhalt, das fortwährende Vertrauen und die Wegbegleitung bis zum heutigen Tag gebührt meinen Eltern Johannes Baumann und Christine Glöckel-Baumann und meinem Bruder Valentin Baumann, die auf ihre Weise zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Zu guter Letzt möchte ich meinen Freunden, welche mich durch den gesamten Schreibprozess unterstützt und mich immer wieder auf andere Gedanken gebracht haben, danken. Ein großer Dank gilt vor allem Marieke für ihre Unterstützung.