



**Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg**  
**Medizinische Fakultät Mannheim**  
**Dissertations-Kurzfassung**

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

Autor: Sofie Baumann  
Institut / Klinik: III. Medizinische Klinik  
Doktormutter: Prof. Dr. A. Fabarius

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 TaqMan-Methode basierenden qPCR 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 TaqMan-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 TaqMan-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  $\leq 2$ .

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 dient.