

Evaluation von qBiomarker Somatic Mutation PCR Assay von Qiagen zum Nachweis der Mutation KIT D816V

Adriana Schulz, BMA 20-23

Bildungsgang Biomedizinische Analytik HF

Kantonsspital Aarau, Institut für Labormedizin, medizinische Genetik

1. Zusammenfassung

Die Mutation KIT D816V beschreibt einen Aminosäureaustausch im Codon 816 des c-Kit-Gens. Dieser führt zur Veränderung im aktiven Zentrum der Thyrosinkinase KIT, welche die Möglichkeit zur Autophosphorylierung erhält. Durch diese Aktivierung kommt es zur unkontrollierten Proliferation von Zellen. Bei Systemischer Mastozytose (SM) werden > 90% der Fälle von D816V in Progenitorzellen der Hämatopoese mit verursacht. Die Krankheit ist gekennzeichnet durch dichte Mastzellinfiltrate in verschiedenen extrakutanen Organen. Bei medizinischen Fragestellungen nach SM ist der Nachweis der Mutation diagnostisch und prognostisch relevant. Durch Quantifizierung der Variantenfrequenz (VAF) wird die Prognose besser beurteilbar.

Diese Arbeit untersucht, ob der qBiomarker Somatic Mutation PCR Assay von Qiagen die Variante D816V mittels Real-Time-PCR nachweisen kann und ob sich die Mutation bei VAF von 0,05% wiederholt nachweisen lässt.

2. Einleitung

KIT D816V beschreibt eine somatische Mutation im Protoonkogen c-KIT, welches für eine Rezeptortyrosinkinase codiert. In Chromosom 16 wird ein Adenin mit Thymin ersetzt. Im Exon 17 des Codon 816 des Kit- Genes entsteht daher Valin (V) anstelle der geplanten Asparaginsäure (D). [1],[2]

Die Mutation führt zu Veränderungen im aktiven Zentrum der Kinase, welche eine rezeptorunabhängige Aktivierung ermöglichen. (Abb. 1) [3],[4]

Besonders bedeutend ist diese Mutation bei der systemischen Mastozytose. Diese wird in >90% der Fälle durch KIT D816V in pluripotenten Progenitorzellen der Hämatopoese mitverursacht. Durch die unkontrollierte Proliferation kommt es zu multifokalen Mastzellinfiltraten. [3],[5]

Die Rezeptortyrosinkinase KIT ist eine somatische Mutation, da sie nur in wenigen, mutierten Körperzellen vorkommt, ist eine Mengenbestimmung der Mutation prognostisch wertvoll. Man bestimmt daher die Variantenfrequenz VAF.

VAF: Anzahl detektierter Kopien der Mutation, geteilt durch die Anzahl total gemessener Kopien des betroffenen Gens in Prozent [6]

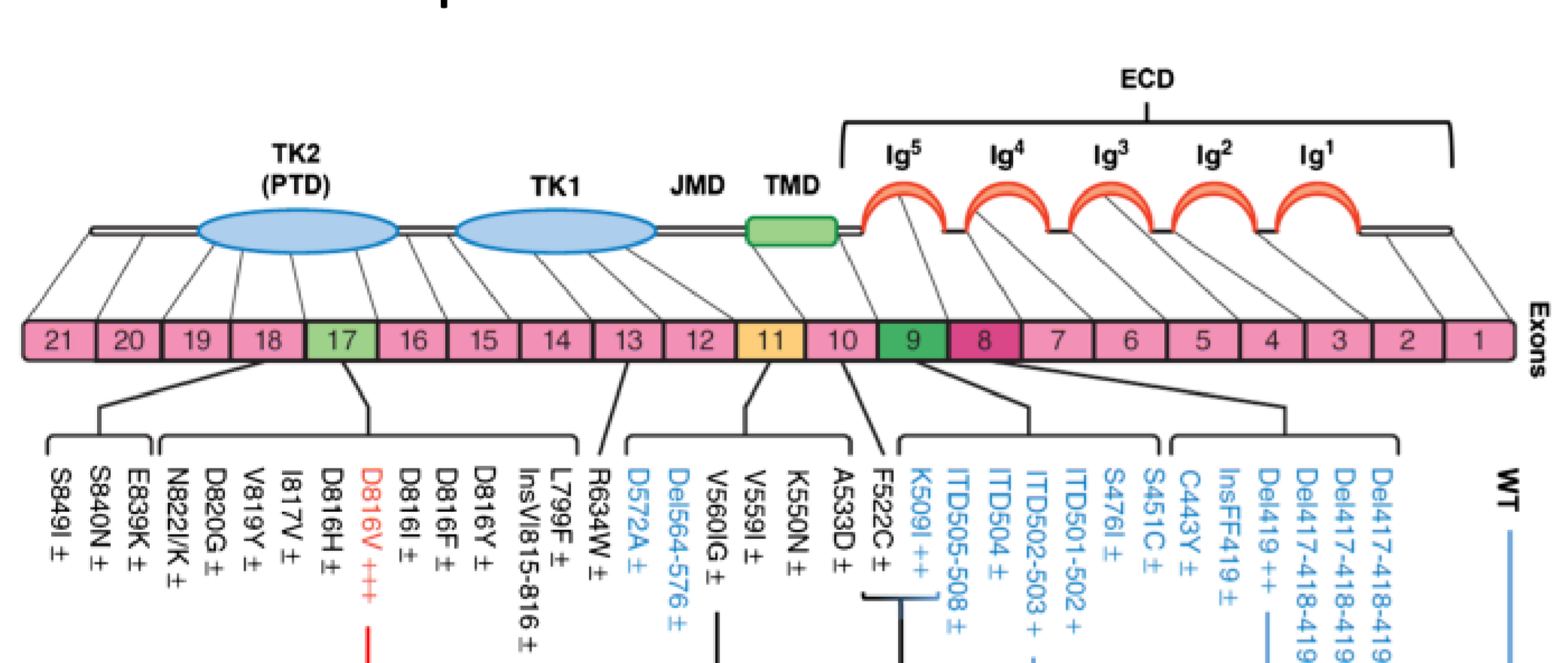


Abb. 1: Lokalisation von D816V und Codon 17 im Kit-Gen in Relation zur fertigen Tyrosinkinase KIT

3. Ziele und Fragestellungen

Das Ziel dieser Arbeit ist es, zu prüfen, ob das Kit qBiomarker Somatic Mutation PCR Assay von Qiagen zum Nachweis der Variante KIT D816V bei Patienten mit Verdacht auf Mastozytose in die Routine aufgenommen werden kann. Beurteilt werden Spezifität und Sensitivitätsgrenze.

Um das gestellte Ziel der Überprüfung zu erreichen, sollen folgende Fragen beantwortet werden:

1. Kann die Mutation D816V mittels des Assay nachgewiesen werden?
2. Wie spezifisch weist qBiomarker Somatic Mutation PCR Assay die Mutation D816V nach? Wie nahe kommt die Spezifität an 100%?
3. Wo liegt die Sensitivitätsgrenze des qBiomarker Somatic Mutation PCR Assay? Angestrebt wird eine VAF von 0,05%. Lassen sich die Resultate im Bereich der Sensitivitätsgrenze in mindestens fünf unabhängigen Messungen bestätigen?

4. Material, Methodik, Vorgehen

Zur Evaluation lagen 17 positive Proben human DNA aus Knochenmark und peripherem Blut vor. Als Wildtypen waren 22 Proben vorhanden, die zuvor negativ auf Kit D816V getestet wurden. Zusätzlich wurde aus verschiedenen Materialien eines Patienten mit hohen VAF-Werten eine Positivkontrolle zusammengemischt.

In den ersten Durchgängen wurden verschiedene DNA-Mengen [ng] und VAF-Werte [%] getestet. Dazu wurden die DNA's mit Tris-Buffer zu verschiedenen Konzentrationen verdünnt.

Für weiterführende Tests wurden die positiven Proben mit Wildtyp-DNA auf eine VAF von 0,05% verdünnt und in verschiedenen Mengen [ng] gemessen. Als Zusatz wurde eine Quantifizierung mittels Standardkurven aus Verdünnungsreihen getestet.

Q Biomarker Somatic Mutation PCR Assay nutzt ARMS- PCR-Technologie zur selektiven Amplifikation von Kit-D816V. Die enthaltenen Primer enthalten einen 3`- Mismatch, welcher die Elongation durch die Taq- Polymerase beim Wildtyp unterbindet. Bei Vorliegen der Mutation kann die Taq-Polymerase die Primer als Ausgangspunkt der Elongation nutzen. (Abb. 2)

Die Detektion erfolgt mittels Fluoreszenzmarkierung der DNA-Sonden.

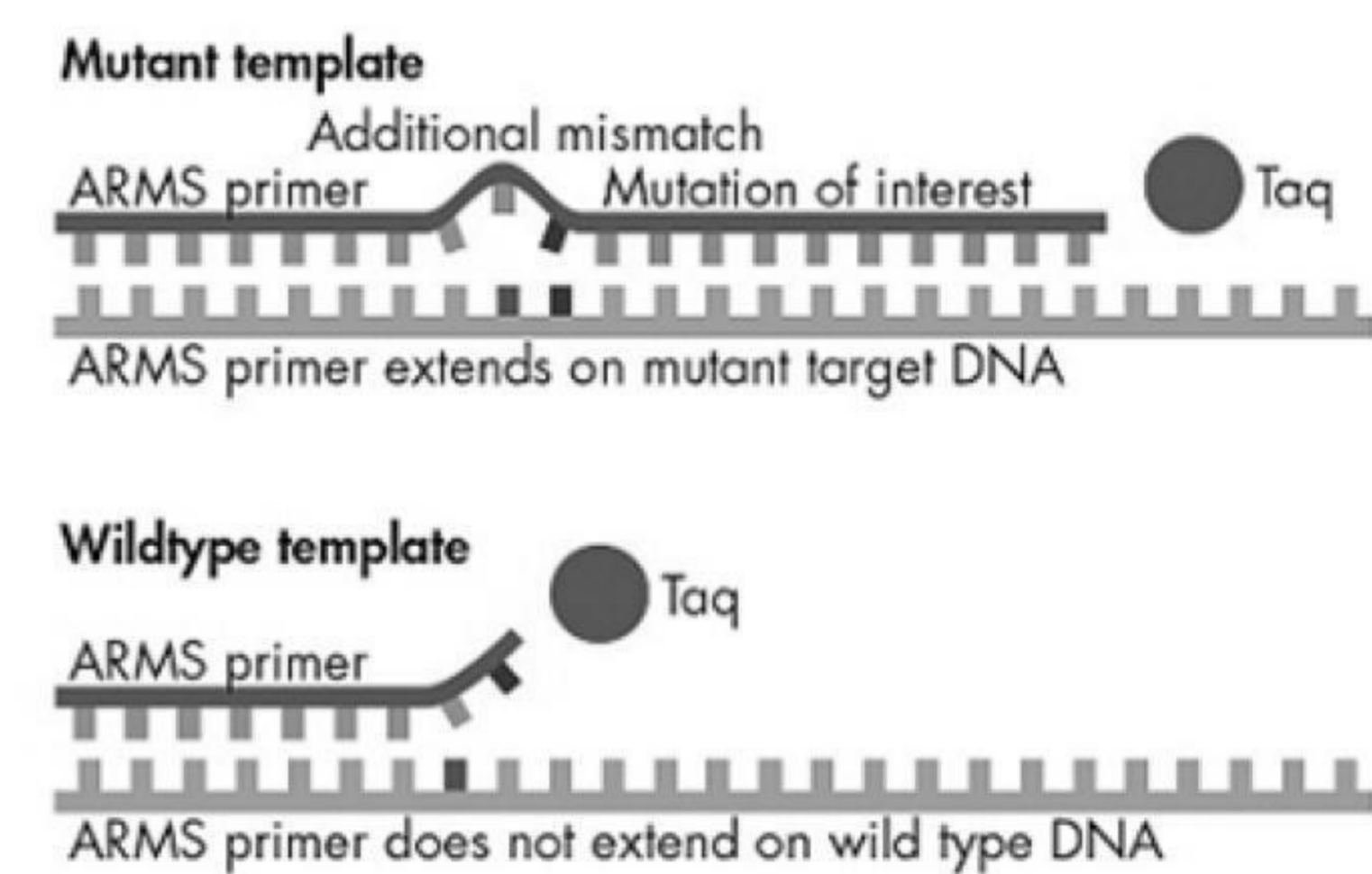


Abb. 2: ARMS: Amplification Refractory Mutation System

5. Ergebnisse/ Resultate

In den ersten beiden Testläufen zeigten die Proben mit positiven Vorwerten einen positiven Kurvenanstieg, die Negativkontrollen blieben negativ. Bei den Testläufen mit manuell hergestellter VAF 0,05% zeigten sich verschiedene Resultate abhängig von der eingesetzten DNA.- Menge. Keine falsch- negativen Resultate gab es bei 30 ng DNA. Aus allen Resultaten VAF ≥ 0,05% ergibt sich eine Spezifität von 95,6% Und Sensitivität 100%.

Anhand der ermittelten Standardkurven ergaben sich bei Quantitätsmessungen leicht tiefer VAF- Werte als in den Vorwerten.

6. Diskussion

Anhand der gemachten Messungen kann man sagen, dass der q Biomarker Somatic mutation PCR Assay die Mutation D816V nachweist.

Die Spezifität aller Testreihen liegt bei 100%

Eine realistische Sensitivitätsgrenze liegt bei 0,05%, wenn dabei 30 ng DNA eingesetzt wurden. Gemeinsam mit den Messungen der Standardkurven konnten diese Messungen insgesamt 5x reproduziert werden.

Referenzen

- [1] G. S. Krasnova, L. G. Ghukasyana, I. S. Abramova, and T. V. Nasedkina, *(2021); Determination of the Subclonal Tumor Structure in Childhood Acute Myeloid Leukemia and Acral Melanoma by Next-Generation Sequencing; *Molecular Biology*, 2021, Vol. 55, (5); (727–741)
- [2] Arock M, Sotlar K, Akin C, Broesby-Olsen S, Hoermann G, Scribano L, et al. (2015) KIT mutation analysis in mast cell neoplasms: recommendations of the European Competence Network on Mastocytosis. *Leukemia*. 2015;29:1223–32
- Zitiert durch: Baird J. H. & Gotlib J. (2018) Clinical Validation of KIT Inhibition in Advanced Systemic Mastocytosis. *Current Hematologic Malignancy Reports* (13) s.408 <https://doi.org/10.1007/s11899-018-0469-3>
- [3] Mol, C. D., Lim, K. B., Sridhar, V., Zou, H., Chien, E. Y. T., Sang, B., Novakowski, J., Kassel, D.B., Cronin, C. N. & McRee, D.E. (2003) Structure of a c-Kit Product Complex reveals the basis for Kinase Transactivation. *The Journal of biological chemistry*, (34), 31461-31464. <https://doi.org/10.1074/jbc.C300186200>
- [4] Flanagan, J., Chan, D., & Leder, P. (1991). Transmembrane form of the kit ligand growth factor is determined by alternative splicing and is missing in the Sld mutant. *Cell*, 64,1025-1035. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(91\)90326-T](https://doi.org/10.1016/0092-8674(91)90326-T)
- [5] Jäger, K., & Kinaciyan, T. (2022). Mastozytose. *Hautnah*, (21), 160-170. <https://doi.org/10.1007/s12326-022-00517-2>
- [6] Deng, J., Wu, X., Ling, Y., Liu, X., Zheng, X. Y., & Gong, Y. (2020) The prognostic impact of variant allele frequency (VAF) in TP53 mutant patients with MDS: A systematic review and meta-analysis *European journal of Haematology*, 105(5), 524-539. <https://doi.org/10.1111/ejh.13483>

Abbildungen

Abb. 1: Arock M et al.

Abb. 2: Qiagen. (2018) *qBiomarker Somatic Mutation PCR Handbook*. Qiagen. Abgerufen am 26. Dezember 2022 von <https://www.qiagen.com/us/resources/resource-detail?id=839fb52b-d563-42ba-91d5-1238f2dca85c&lang=en>