

Aus dem Zentrum für Klinische Tiermedizin
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Arbeit angefertigt unter der Leitung von Professor Dr. med. vet. W. Hermanns

Angefertigt im Pathologischen Institut der LMU München
(Professor Dr. med. K. Sotlar)

Klonalitätsanalysen bei *KIT* D816V-positiver Systemischer
Mastozytose mit assoziierter hämatologischer nicht-mastozytärer
Neoplasie (SM-AHNMD)

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde der
Tierärztlichen Fakultät

der Ludwig-Maximilians-Universität München

von Anna Larissa Butschek

aus Filderstadt

München 2014

Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Walter Hermanns

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Johannes Hirschberger

Tag der Promotion: 12. Juli 2014

*für
meine
Großeltern*

INHALTSVERZEICHNIS

I.	EINLEITUNG	7
II.	LITERATURÜBERSICHT	8
1.	Mastozytosen in Mensch und Tier	8
1.1.	Manifestationsformen und Klinik der Mastozytosen	8
1.2.	Mastozytosen in der Veterinärmedizin	9
2.	Entstehung und Pathogenese der Mastozytose.....	10
2.1.	Hämatopoese	10
2.2.	Mastzellen	11
2.3.	<i>KIT</i> - Rezeptor	13
2.4.	Pathogenese der Mastozytosen.....	13
3.	Klassifikation und Diagnose der Mastozytose beim Menschen	15
3.1.	Klassifikation	15
3.2.	Diagnose der Mastozytosen	15
3.2.1.	Hauptkriterium für die Diagnose der SM.....	16
3.2.2.	Nebenkriterien für die Diagnose der SM	16
3.2.2.1.	Nachweis atypischer spindelförmiger Mastzellen.....	16
3.2.2.2.	Nachweis einer <i>KIT</i> Mutation im Codon 816	16
3.2.2.3.	Aberrante Expression von CD2/ CD25	16
3.2.2.4.	Erhöhte Mastzelltryptase im Serum	17
3.3.	Subklassifizierung der SM	19
3.4.	Klassifikation und Diagnose einer SM-AHNMD	20
4.	Prognose und Therapie.....	21
4.1.	Prognose	21
4.2.	Therapie.....	22
4.3.	Therapie in der Veterinärmedizin	23
5.	Ziele der Arbeit.....	24
III.	MATERIAL UND METHODEN	25
1.	Material	25
2.	Methoden.....	25
2.1.	Immunfärbung der Gewebeschnitte	25

2.2.	<i>KIT</i> Mutationsanalyse an Gesamt-DNA	29
2.2.1.	Extraktion der DNA	29
2.2.2.	Funktion der LNA	29
2.2.3.	Konventionelle PCR und LNA- <i>single</i> PCR.....	30
2.2.4.	Schmelzpunktanalyse mit Hybridisierungssonden	32
2.2.5.	LNA <i>semi-nested</i> PCR	33
2.2.6.	Auswertung der Ergebnisse der Gesamt-DNA	36
2.3.	<i>KIT</i> Mutationsanalyse an mikrodisezierten Zellen.....	36
2.3.1.	Lasermikrodisektion von Einzelzellen	36
2.3.1.1.	Vorbereitung des Reaktionsgefäßes	37
2.3.1.2.	Markieren der Zellen.....	37
2.3.1.3.	Katapultieren der Zellen.....	38
2.3.2.	Probenverarbeitung und Proteinase K-Verdau.....	40
2.3.3.	Amplifikation der DNA aus mikrodisezierten Zellen	40
2.3.4.	Auswertung der Ergebnisse der mikrodisezierten Zellen.....	40
IV.	ERGEBNISSE	41
1.	Morphologische Befunde	41
2.	<i>KIT</i>-Mutationsanalyse an mikrodisezierten Zellen	45
2.1.	Analyse der Patienten mit SM-MPN.....	48
2.2.	Analyse der Patienten mit SM-MDS/MPN.....	51
2.3.	Analyse der Patienten mit SM-MDS.....	57
2.4.	Analyse der Patienten mit SM-AML	59
3.	Analyse mikrodisezierter nicht-Mastzellen.....	60
4.	Zusammenfassung der Ergebnisse	62
V.	DISKUSSION	63
1.	Diskussion der morphologischen Befunde	63
2.	Diskussion der Methoden	65
VI.	ZUSAMMENFASSUNG	71
VII.	SUMMARY.....	72
VIII.	LITERATURVERZEICHNIS	73

IX.	ANHANG	81
X.	DANKSAGUNG	86

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AML	Akute myeloische Leukämie	MZT	Mastzelltumor
ASM	Akute systemische Mastozytose	PCR	Polymerasekettenreaktion
BMM	Isolierter Befall des Knochenmarks	PMF	Primäre Myelofibrose
CD	<i>Cluster of differentiation</i>	RARS	Refraktäre Anämie mit Ringsideroblasten
CEL	Chronisch eosinophile Leukämie	RCMD	Refraktäre Zytopenie mit multilineärer Dysplasie
CML	Chronisch myeloische Leukämie	SCF	Stammzellfaktor
CMML	Chronisch myelomonozytäre Leukämie	SM	Systemische Mastozytose
CNL	Chronisch neutrophile Leukämie	SM-AHNMD	Systemische Mastozytose und assoziierter hämatologischer nicht-mastozytärer Neoplasie
DNA	Desoxyribonukleinsäure	TKI	Tyrosinkinaseinhibitor
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	WHO	Weltgesundheitsorganisation
EPX	Eosinophile Peroxidase		
ET	Essentielle Thrombozythämie		
HE	Hämatoxylin und Eosin-Färbung		
HSC	Hämatopoetische Stammzelle		
IgE	Immunglobulin E		
IL	Interleukin		
ISM	Indolente systemische Mastozytose		
LNA	<i>Locked Nucleid Acid</i>		
MCL	Mastzellenleukämie		
MDS	Myelodysplastisches Syndrom		
MDS/MPN-U	Unklassifizierte MDS/MPN		
MPN	Myeloproliferative Neoplasie		
MPN-Eo	Eosinophilie-assoziierte myeloproliferative Erkrankung		
MPN-U	Unklassifizierte MPN		

I. EINLEITUNG

Mastozytosen bilden eine heterogene Gruppe von Erkrankungen, die ihren Ursprung im Knochenmark haben. Es handelt sich um sehr seltene Erkrankungen: Man schätzt, dass einer von 1000 bis 8000 neuen Patienten einer dermatologischen Klinik an einer Mastozytose erkrankt ist (SAGHER *et al.*, 1967). Mastozytosen werden durch eine Akkumulation neoplastischer Mastzellen in einem oder mehreren Organen charakterisiert. Prinzipiell werden kutane und systemische Mastozytosen (SM) unterschieden.

Unter einer SM versteht man eine pathologische Mastzellakkumulation in einem oder mehreren extrakutanen Organen (LENNERT *et al.*, 1979). Das Knochenmark ist meist involviert. In wenigen Fällen kommt es zusätzlich zu einer Infiltration von Lymphknoten, Milz, Leber oder anderen Organen, wie dem Gastrointestinaltrakt (HORNY *et al.*, 2008; METCALFE *et al.*, 2008). Darüber hinaus können Hautläsionen auftreten (METCALFE *et al.*, 2008).

Mastozytosen werden in der aktuellen Weltgesundheitsorganisation (WHO)-Klassifikation von 2008 der Gruppe der myeloproliferativen Neoplasien (MPN) zugeordnet (SWERDLOW *et al.*, 2008):

1. Chronisch myeloische Leukämie (CML)
2. Chronisch neutrophile Leukämie (CNL)
3. Polyzythämia vera (PV)
4. Primäre Myelofibrose (PMF)
5. Essentielle Thrombozythämie (ET)
6. Chronisch eosinophile Leukämie (CEL)
- 7. Mastozytose**
8. unklassifizierte myeloproliferative Neoplasie (MPN-U)

MPNs sind klonale Stammzellerkrankungen, die durch eine effektive Hämatopoese charakterisiert sind. Dies führt zu erhöhten peripheren Blutwerten in einer oder mehreren Zellreihen und nicht selten zur Ausbildung einer Hepato-Splenomegalie. Das Knochenmark ist hyperzellulär und zeigt eine ausreifende Hämatopoese, dysplastische Veränderungen fehlen (HARRIS *et al.*, 2000). Meist spielen deregulierte Tyrosinkinase bei der Entstehung dieser Erkrankungen eine entscheidende pathogenetische Rolle.

II. LITERATURÜBERSICHT

1. Mastozytosen in Mensch und Tier

1.1. Manifestationsformen und Klinik der Mastozytosen

Die Urticaria pigmentosa ist die häufigste Manifestationsform einer Mastozytose beim Menschen. Sie ist charakterisiert durch makulopapulöse Hautläsionen in Verbindung mit einem eindeutig positiven Darier-Zeichen. Dabei handelt es sich um eine urtikarielle Schwellung nach mechanischer Reizung der Hautläsionen (BROCKOW *et al.*, 2009). Die Urticaria pigmentosa manifestiert sich häufig in der Kindheit (VALENT *et al.*, 2001). Weitere seltenere Formen der kutanen Mastozytose sind die diffuse kutane Mastozytose und das Mastozytom der Haut.

Die SM, die hauptsächlich im Erwachsenenalter auftritt, wird in weitere Subtypen unterteilt. Die indolente systemische Mastozytose (ISM) ist die häufigste Variante einer SM, sie wird in ca. 46% der Fälle diagnostiziert (LIM *et al.*, 2009). Sie geht wie die kutane Mastozytose meist ebenfalls mit den typischen Hautveränderungen einher, zeigt aber gleichzeitig fast immer einen Knochenmarksbefall, häufig mit reifen Infiltraten metachromatisch granulierter Mastzellen. Im Gegensatz zur aggressiven systemischen Mastozytose (ASM) kommt es aufgrund der Mastzellinfiltration zu keinen Organschädigungen wie einer Knochenmarksinsuffizienz (VALENT *et al.*, 2001). Eine ASM kommt selten vor und wird nur bei 12% der SM-Fälle diagnostiziert (LIM *et al.*, 2009).

Bei ca. 40% der SM-Fälle wird eine systemische Mastozytose und assoziierte klonale hämatologische nicht-mastozytärer Neoplasie (SM-AHNMD; haematological non-mast cell lineage disease associated with systemic mastocytosis) beschrieben. Sie bildet damit die zweithäufigste Gruppe der SM (LIM *et al.*, 2009). Veränderungen im Blutbild, wie Eosinophilie, Monozytose oder Blastenexzesse deuten auf das Vorliegen einer SM-AHNMD hin.

Bei der sehr selten auftretenden Mastzellenleukämie (MCL) (ca. 1% der SM-Fälle) werden per Definition in den Knochenmarksausstrichen mehr als 20% atypische Mastzellen nachgewiesen. Werden weniger als 10% Mastzellen im peripheren Blut nachgewiesen, liegt eine aneoplastische MCL vor (HORNY *et al.*, 2008; VALENT *et al.*; 2014).

Wie bereits oben beschrieben, ist die Symptomatik einer Mastozytose sehr vielfältig. Der klinische Verlauf ist nicht nur abhängig vom jeweiligen Subtyp, sondern innerhalb eines Typs sehr variabel. Im Wesentlichen werden die Symptome von freigesetzten

Mastzellmediatoren und den Organschäden durch Mastzellinfiltrate ausgelöst. So kann es bei allen Mastzelltumorformen zu anaphylaktischen Reaktionen mit Hautrötungen, urtikariellen Schwellungen und Juckreiz kommen. Gastrointestinale Symptome wie Übelkeit und krampfartige Durchfälle können durch Histaminämie ausgelöst werden. Des Weiteren werden muskuloskeletale Symptome sowie Müdigkeit bis hin zu neurologischen Symptomen beschrieben (HORNY *et al.*, 2008).

1.2. Mastozytosen in der Veterinärmedizin

Mastzelltumore (MZT) können bei allen Tierarten vorkommen. Relativ häufig treten sie bei Hunden, Katzen, Pferden und Frettchen auf. Bei anderen Säugetierarten, Vögeln und Reptilien sind MZT sehr selten. Beim Hund gehören die MZT zu den häufigsten Hauttumoren (20-25% aller Haut- und Unterhauttumoren) und treten auch bei der Katze relativ häufig auf (2-21% aller Hauttumoren). Meist präsentieren sich MZT als kutane oder beim Hund auch als subkutane Umfangsvermehrungen, welche solitär, bei der Katze auch multipel auftreten können. Kutane MZT sind nach einer Feinnadelaspiration im zytologischen Ausstrich in der Diff-Quick-, Giemsa- oder Wright-Färbung meist anhand der monomorphen Population von Rundzellen mit prominenten, zytoplasmatischen, violetten Granula einfach und zuverlässig zu diagnostizieren.

Kanine MZT können in seltenen Fällen systemisch werden. Häufiger als beim Hund kommt es bei der Katze zu Infiltrationen der Milz und anderen viszerale Organen. Tiere mit einer SM werden mit Lethargie, Anorexie, Erbrechen, Gewichtsverlust, blassen Schleimhäuten, Splenomegalie, Hepatomegalie und gelegentlich kutanen Umfangsvermehrungen vorgestellt. Durch die Freisetzung von bioaktiven Substanzen, wie Histamin, kommt es häufig zu gastrointestinalen Ulzerationen. Zur Diagnose einer systemischen Form der Mastozytose sind weitere Untersuchungen, wie Abdomenpalpation, Sonographie, Röntgenaufnahmen, Blut- und Urinalysen notwendig (NELSON *et al.*, 2010).

Ebenso wie beim Mensch, scheinen auch beim Hund *KIT* Mutationen eine Rolle in der Pathogenese von MZT zu spielen, 20-30% der kaninen MZT exprimieren ein mutiertes *c-kit* Gen (LETARD *et al.*, 2008). Mittlerweile sind mehrere Mutationen beschrieben, welche zu einer *stem cell factor* (SCF)-unabhängigen Aktivierung der Rezeptortyrosinkinase führen. Am häufigsten treten Duplikationen (Tandemmutation) des Exon 11 auf (LONDON *et al.*, 1999).

2. Entstehung und Pathogenese der Mastozytose

2.1. Hämatopoese

Die adulte Blutzellbildung erfolgt durch multipotente hämatopoetische Stammzellen (HSC) im Knochenmark. HSCs befinden sich entweder im Ruhezustand oder sie erneuern sich selbst und können sich zu allen reifen Blutzellen der verschiedenen Zellreihen entwickeln. Während der Differenzierung verlieren HSCs ihre Multipotenz, verändern ihr Antigenmuster auf der Oberfläche und proliferieren. Schon früh in der Hämatopoese spalten sich zwei Arten von Vorläuferzellen voneinander ab: die gemeinsame lymphatische (CLP) und die gemeinsame myeloische Vorläuferzelle (CMP). Somit läuft die weitere Entwicklung der lymphatischen Reihe mit Differenzierung in T- und B-Lymphozyten getrennt von der myeloischen Reihe. Lymphozyten sind Zellen der spezifischen Immunabwehr. Ihre Hauptaufgabe besteht in der Erkennung von Fremdproteinen und deren Eliminierung über immunologische Mechanismen. Die myeloische Reihe spaltet sich weiter auf in die gemeinsame Granulozyten-Monozyten-Vorläuferzelle (GMP) und die gemeinsame Megakaryozyten-Erythrozyten Vorläuferzelle (MEP). Erst im Anschluss entwickeln sich die linienspezifischen Progenitoren, welche erst als reife Blutzellen das Knochenmark verlassen. Granulozyten und Monozyten sind Zellen der unspezifischen Immunabwehr. Sie sind in der Lage fremde Partikel, wie zum Beispiel Kohlepartikel, Bakterien und Pilze, aufzunehmen und zu zerstören. Es werden drei verschiedene Granulozytenpopulationen unterschieden, die sich anhand ihrer Granula, aber auch funktionell unterscheiden: die neutrophilen, die eosinophilen und die basophilen Granulozyten. Die Hauptaufgabe der Erythrozyten ist der Gastransport zur Versorgung des Gewebes mit Sauerstoff. Während der Reifung im Knochenmark kommt es zur Entkernung der Erythroblasten und zur Ausschwemmung kernloser Erythrozyten in das periphere Blut. Megakaryozyten bilden ebenfalls kernlose Thrombozyten aus Zytoplasmaabschnürungen, denen eine zentrale Rolle bei der Blutgerinnung zukommt. Es ist allgemein akzeptiert, dass auch Mastzellen von hämatopoetischen Vorläuferzellen aus dem Knochenmark abstammen. So konnte eine *cluster of differentiation* (CD)34+, c-kit+ Vorläuferzelle beschrieben werden, die sich in Anwesenheit bestimmter Wachstumsfaktoren, unter anderem dem *mast cell growth factor*, synonym SCF bezeichnet, zu reifen Mastzellen entwickel. SCF wird hauptsächlich von umliegenden Stromazellen gebildet. Die postulierte Vorläuferzelle ist darüber hinaus zur Ausdifferenzierung in Granulozyten und Monozyten in der Lage (KIRSHENBAUM *et al.*, 1999).

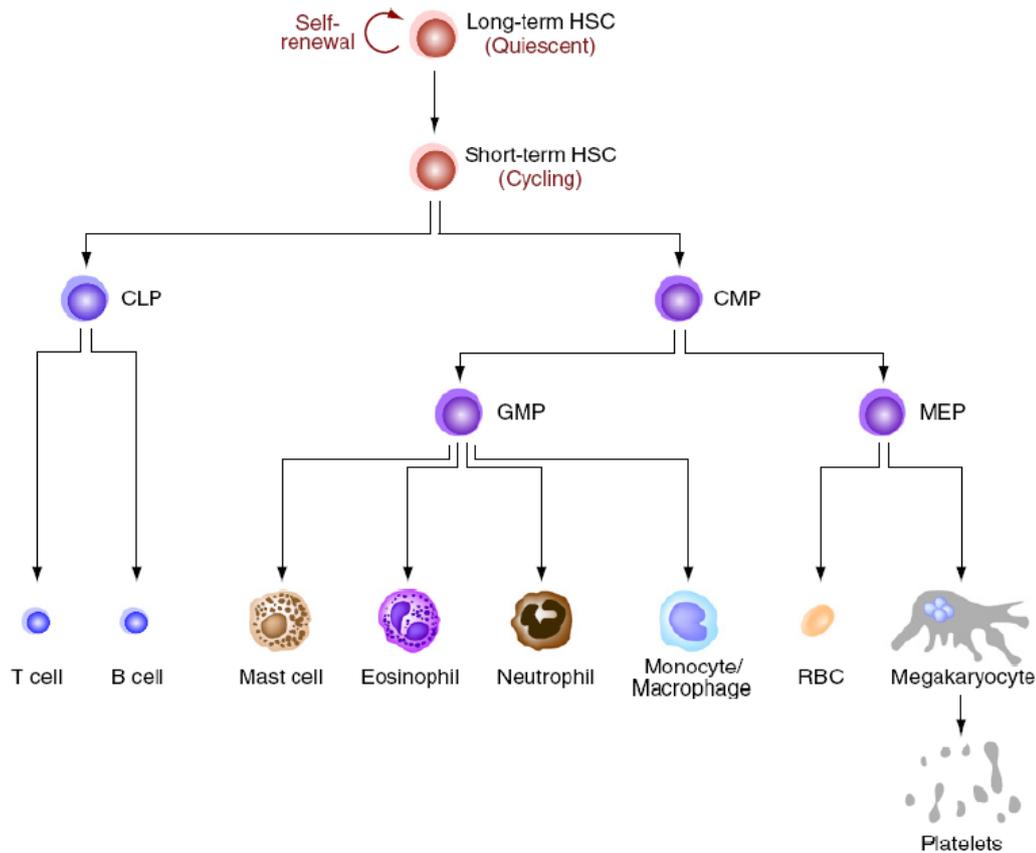


Abbildung 1: Abbildung der hämatopoetischen Entwicklung im Knochenmark (geändert nach ORKIN *et al.*, 2008). HSC= hämatopoetische Stammzelle, CLP= gemeinsame lymphatische Vorläuferzelle, CMP= gemeinsame myeloische Vorläuferzelle, GMP= Granulozyten-Monozyten Vorläuferzelle, MEP= Megakaryozyten-Erythrozyten Vorläuferzelle.

2.2. Mastzellen

Ihren Namen haben die Mastzellen von Paul Ehrlich erhalten, der sie bereits 1877 entdeckte. Er nannte sie „Mäszellen“. Der Begriff könnte sich einerseits auf die Annahme beziehen, wonach Mastzellen ihre Granula zum „Mästen“ anderer Zellen verwenden. Andererseits könnte Paul Ehrlich die Mastzellen aufgrund der gespeicherten Granula, als „gut-genährte“ Zelle interpretiert haben. Er beschrieb Mastzellen im Bindegewebe, die sich mit einem blauen Anilinfarbstoff braun-rot anfärben lassen. Diese Färbeeigenschaft wird auch Metachromasie genannt. Sie wird in Mastzellen durch eine Interaktion des Farbstoffes mit saurem Heparin, einem bekannten Mastzellinhaltsstoff, verursacht (KRISHNASWAMY *et al.*, 2006).

Morphologisch sind Mastzellen runde bis lang-gestreckte Zellen mit einem Durchmesser von ca. 10- 20 µm. Sie besitzen einen runden oder ovalen bis nierenförmigen Kern, der wenig strukturiert und zentral angeordnet ist und weitestgehend von den Granula überdeckt wird. In der histomorphologischen Standardfärbung Hämatoxylin und Eosin (HE) sind Mastzellen nur schwer auszumachen. Mastzellgranula lassen sich spezifisch

mit Toluidinblau anfärben. Weitere zur Erkennung von Mastzellen geeignete Färbungen sind Giemsa und die enzymhistochemische Darstellung der Chlorazetatesterase. Die immunhistologische Darstellung der Granula mit Antikörpern gegen Tryptase, einer neutralen Serinprotease, ist jedoch der sensitivste und verlässlichste histologische Marker für Mastzellen (YANG *et al.*, 2000; OLAFSSON *et al.*, 1986; SCHWARTZ *et al.*, 1985).

Ausgereifte Mastzellen zirkulieren gewöhnlich nicht im Blut. Stattdessen erwerben sie ihren ausgereiften Phänotyp erst in den peripheren Geweben und Organen, in denen sich Mastzellen letztendlich aufhalten. Diese Eigenschaft unterscheidet sie von anderen Leukozyten, wie den neutrophilen, eosinophilen und basophilen Granulozyten (METCALFE *et al.*, 1997). Gewöhnlich halten sich Mastzellen in der Nähe von Blutgefäßen, Nerven, glatten Muskelzellen, schleimproduzierenden Drüsen und Haarfollikeln auf. Besonders zahlreich sind sie in der Haut und den Schleimhäuten der Atemwege und des Gastrointestinaltrakts (GALLI *et al.*, 2008). Im Gewebe werden zwei Arten von Mastzellen beschrieben: Schleimhautmastzellen und Bindegewebsmastzellen, welche sich unter anderem in der Proteaseexpression unterscheiden (IRANI *et al.*, 1989). Die Anzahl im Gewebe, ihre Verteilung und phänotypische Eigenschaften der Mastzellen werden von diversen Wachstumsfaktoren wie SCF und Interleukin-3 (IL-3), IL-4 und IL-9, die in der T-Zell Antwort mitwirken, beeinflusst (GALLI *et al.*, 2008).

Mastzellen spielen bei der humoralen und zellulären Immunantwort, beispielsweise im Rahmen der Wundheilung und bei der Abwehr von Pathogenen eine wichtige Rolle, aber auch bei Allergien, insbesondere bei Überempfindlichkeitsreaktionen vom anaphylaktischen Typ (KRISHNASWAMY *et al.*, 2006). Im Gewebe können Mastzellen durch eine physikalische oder chemische (z.B. Alkohol) Verletzung, Quervernetzung von Immunglobulin E (IgE) Rezeptoren an der Mastzelloberfläche oder Komplementfaktoren aktiviert werden (PRUSSIN *et al.*, 2003). Aktivierte Mastzellen degranulieren und produzieren Mediatoren, die in zwei Gruppen unterteilt werden: den vorgefertigten, bereits in der Zelle gespeicherten und den neu synthetisierten Mediatoren, die erst nach Aktivierung von Mastzellen gebildet werden. Zu den neu synthetisierten Mediatoren zählen zum Beispiel Metaboliten der Arachidonsäure (Cyclooxygenasen und Lipoxigenasen) und viele weitere Zytokine, Chemokine und Wachstumsfaktoren (KRISHNASWAMY *et al.*, 2006; Galli *et al.*, 2005). Vorgefertigten Mediatoren sind unter anderem Proteasen (Tryptase, Chymase), Proteoglykane (Heparin und Chondroitin Sulfat E), Cytokine (Tumornekrosefaktor TNF- α) und Histamin, der wohl bekannteste Mastzellmediator. Freigesetztes Histamin führt unter anderem zu Vasodilatation, welche es Immunzellen erleichtert ins Gewebe einzuwandern (KRISHNASWAMY *et al.*, 2006). Interessanterweise besitzen Mastzellen eine große Ähnlichkeit zu den basophilen Granulozyten, die ebenfalls IgE Rezeptoren auf ihrer Oberfläche aufweisen und unter

anderem Histamin und Tryptase bilden können, jedoch in viel geringeren Konzentrationen als in den Mastzellen (Tab. 2) (LAWRENCE *et al.*, 1987; CASTELLS *et al.*, 1987).

Trotz zahlreicher Untersuchungen sind vermutlich viele Funktionen und Aufgaben von Mastzellen bis heute weitestgehend ungeklärt. Unbekannt ist auch, welche Mastzellvorstufen existieren und was für Faktoren dazu führen, dass Mastzellen ins Gewebe migrieren (THIENEMANN *et al.*, 2004).

2.3. *KIT*- Rezeptor

Das humane *c-kit*-Gen ist ein Protoonkogen, das auf Chromosom 4 lokalisiert ist. Es kodiert für den transmembranen Tyrosinkinase-Rezeptor *KIT* (CD117) und wurde als humanes Äquivalent des feline protoonkogenen *v-KIT* identifiziert (YARDEN *et al.*, 1987). *KIT* wird nicht nur auf Mastzellen (METCALFE *et al.*, 2005), sondern auch auf HSC (SIMMONS *et al.*, 1994), Melanozyten (HALABAN *et al.*, 1993), Cajalzellen (HUIZINGA *et al.*, 1995) und Keimzellen (STROHMEYER *et al.*, 1995) exprimiert. Die Expression von *KIT* wurde bereits ebenfalls in neoplastischen Zellen von myeloischen Neoplasien beschrieben, wie bei akuten myeloischen Leukämien (AML), myelodysplastischen Syndromen (MDS) und myeloproliferativen Erkrankungen (MPD) (ORFAO *et al.*, 2007). In hämatopoetischen Progenitorzellen wird *KIT* an der Zelloberfläche während der Differenzierung rasch herunterreguliert. Im Gegensatz dazu exprimieren Mastzellen auch als reife Zellen *KIT* (CD117) auf ihrer Oberfläche (METCALFE *et al.*, 2008). In normalen reifen Mastzellen führt die Aktivierung von *KIT* durch seinen Liganden SCF zu einer erhöhten Proliferation, einem verlängerten Überleben und einer gesteigerten Freisetzung von Mediatoren.

2.4. Pathogenese der Mastozytosen

Bei der SM liegen typischerweise Mutationen im Codon 816 (Exon 17) vor, die zu einer Autophosphorylierung von Tyrosinseitenketten im katalytischen Zentrum des Rezeptors führen. Daraus resultiert eine SCF-unabhängige Daueraktivierung der Rezeptortyrosinkinase. In mehr als 90% der Patienten mit SM kann eine aktivierende *KIT* D816V Mutation im Exon 17 nachgewiesen werden (HORNY *et al.*, 2007). Dennoch ist weder die Expression von *KIT* auf der Zellmembran, noch der Nachweis der *KIT* D816V Mutation spezifisch für eine Mastozytose (HORNY *et al.*, 2008). Die *KIT* Mutation D816V führt an Position 7176 der genomischen DNA (GenBank Accession No. L04143) zu einer Substitution der Basen Adenosin (A) zu Thymin (T). Bei der Proteinbiosynthese kommt es zu einem Aminosäureaustausch von Asparaginsäure gegen Valin im Codon 816 (Asp816Val oder D816V). Weitere bis heute beschriebene aktivierende Punktmutationen im Exon 17 sind D816Y, D816F, D816H, D816G (Abb. 1) (FÉGER *et*

al., 2002). Diese Mutationsvarianten kommen jedoch nur sehr selten vor (< 5% der untersuchten Fälle) (VALENT *et al.*, 2005).

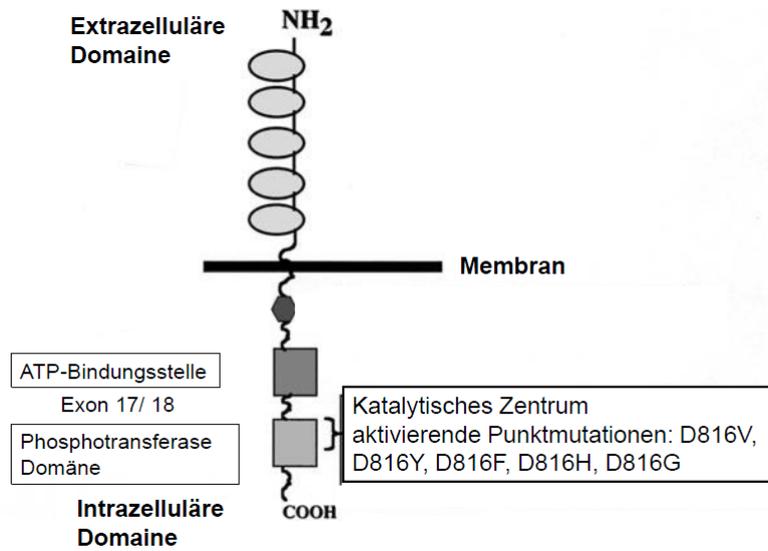


Abbildung 2: Die Abbildung, geändert nach Féger *et al.* (2002), zeigt den schematischen Aufbau des humanen *KIT* Rezeptors und Lokalisation der häufigsten Punktmutationen bei Patienten mit Mastozytosen.

3. Klassifikation und Diagnose der Mastozytose beim Menschen

3.1. Klassifikation

Der erste Anlauf einer Klassifizierung der Mastozytose wurde bereits 1979 von den deutschen Pathologen Lennert und Parwaresch aus Kiel gemacht (LENNERT *et al.*, 1979). Nach mehreren Modifikationen ist die heute gültige Klassifizierung, die WHO-Klassifizierung von 2008, nach der sieben Subtypen unterschieden werden (SWERDLOW *et al.*, 2008). Die Subtypen ISM, SM-AHNMD, ASM und MCL gehören zu den systemischen Mastozytosen (SM) (Kap. II 1.1.).

1. Kutane Mastozytose (CM)
 - Urticaria pigmentosa (UP)
 - Diffuse kutane Mastozytose
 - Mastozytom der Haut
2. Indolente Systemische Mastozytose (ISM)
 - *Smouldering* Mastozytose (SSM)
 - Isolierter Befall des Knochenmarks (BMM)
3. Systemische Mastozytose und assoziierte hämatologische nicht-mastozytäre Neoplasie (SM-AHNMD)
4. Aggressive systemische Mastozytose (ASM)
5. Mastzellenleukämie (MCL)
6. Mastzellsarkom (MCS)
7. Extrakutanen Mastozytom

3.2. Diagnose der Mastozytosen

Die Diagnose einer Mastozytose kann nur aufgrund von histologischen Untersuchungen von Gewebeproben gestellt werden. Die wichtigsten Entnahmelokalisationen sind Hautbiopsien bei Verdacht auf eine kutane Mastozytose und Knochenmarksbiopsien bei Verdacht auf eine SM (VALENT *et al.*, 2007). Selten werden Biopsien von anderen Organen, wie Leber, Lymphknoten oder Milz zur Diagnose einer Mastozytose verwendet. Grund für die Biopsie dieser Organe ist meist eine Vergrößerung des Organs auf dem Boden einer Mastzellinfiltration (z.B. Lymphknoten) oder einer Einschränkung der Funktion (insbesondere Leber) (PARDANANI *et al.*, 2012). Das Beckenkammtranseptat sollte ausreichend lang sein (> 1,5 cm), um zu gewährleisten, dass kompakte Mastzellinfiltrate als diagnostisches Hauptkriterium in dem Biopsat enthalten sind (SOTLAR *et al.*, 2012).

In der Diagnostik einer SM werden ein Haupt- und vier Nebenkriterien unterschieden (Tab.1). Die Diagnose der SM kann gestellt werden, wenn entweder das Hauptkriterium

und mindestens ein Nebenkriterium erfüllt oder, in Abwesenheit des Hauptkriteriums, drei der vier Nebenkriterien erfüllt sind. Bei wenigen Patienten in frühen Krankheitsstadien oder bei nicht repräsentativen Knochenmarksbiopsien kann das Hauptkriterium fehlen (BROCKOW *et al.*, 2009).

3.2.1. Hauptkriterium für die Diagnose der SM

Als Hauptkriterium wurde das Auftreten multifokaler extrakutaner Mastzellinfiltrate (≥ 15 Mastzellen) definiert (Abb. 3D) (VALENT *et al.*, 2001). Die Identifikation von Mastzellen wird durch den Einsatz bestimmter Antikörper, insbesondere anti-Tryptase und anti-CD117 (*KIT*), erheblich erleichtert (Abb. 3D,H) (HORNY *et al.*, 1998). Weder Tryptase noch CD117 lassen jedoch eine Unterscheidung zwischen normalen und neoplastischen Mastzellen zu (Tab. 3) (JORDAN *et al.*, 2001).

3.2.2. Nebenkriterien für die Diagnose der SM

Neben dem Hauptkriterium wurden vier diagnostische Nebenkriterien für die SM definiert (VALENT *et al.*, 2001).

3.2.2.1. Nachweis atypischer spindelförmiger Mastzellen

Mehr als 25% der Mastzellen in der extrakutanen Gewebebiopsie oder im Knochenmarksausstrich sind spindelförmig bzw. haben eine atypische Mastzellmorphologie, im Gegensatz zu den physiologisch runden Mastzellen (Abb. 3F) (VALENT *et al.*, 2001).

3.2.2.2. Nachweis einer *KIT* Mutation im Codon 816

Ein weiteres Nebenkriterium ist der Nachweis einer aktivierenden Punktmutation im Codon 816 in Mastzellen aus Blut, Knochenmark oder läsionalem Gewebe (NAGATA *et al.*, 1995; LONGLEY *et al.*, 1999). Am häufigsten ist das Auffinden der Mutation D816V (HORNY *et al.*, 2007).

3.2.2.3. Aberrante Expression von CD2/ CD25

Die Expression der Oberflächenmarker CD2 und CD25 ist physiologischerweise auf T-Lymphozyten und natürliche Killerzellen beschränkt. Normale und reaktive Knochenmarksmastzellen weisen keine immunhistochemisch nachweisbaren Mengen des Oberflächenmarkers CD2 und CD25 auf, interessanterweise werden sie aber von neoplastischen Mastzellen exprimiert (JORDAN *et al.*, 2001). Somit stellt der Nachweis einer abnormen Expression von CD2 und/oder CD25 eine besonders spezifische und sensitive Methode zum Nachweis neoplastischer Mastzellen bei einer SM dar (Abb. 3J und Tab. 2).

3.2.2.4. Erhöhte Mastzelltryptase im Serum

Die von Mastzellen produzierte Tryptase kommt in zwei relevanten Unterformen vor. Die β -Tryptase wird nach plötzlicher Aktivierung von Mastzellen, wie zum Beispiel bei anaphylaktischen Reaktionen produziert, während die α -Tryptase kontinuierlich freigesetzt wird (SCHWARTZ *et al.*, 1995). Der Serumspiegel der Gesamt-Tryptase hängt damit von der Mastzellaktivierung und der Gesamtzahl der Mastzellen im Körper ab (BROCKOW *et al.*, 2002). Die mittlere Tryptasekonzentration im Serum ist bei gesunden Menschen bei etwa 5 ng/ml. Eine dauerhafte Erhöhung von über 20 ng/ml zeigt dagegen nahezu immer eine SM an (SCHWARTZ *et al.*, 1995).

Tabelle 1: WHO-Kriterien für eine SM (übernommen aus BROCKOW *et al.*, 2009).

<p>Hauptkriterium*</p> <p>Dichte multifokale Mastzellinfiltrate (Mastzellaggregate mit ≥ 15 Zellen) in Knochenmark oder in einem anderen extrakutanen Organ.</p> <p>Nebenkriterien*</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Mehr als 25% der Mastzellen in der extrakutanen Gewebebiopsie oder im Knochenmarksausstrich sind spindelförmig bzw. haben eine atypische Mastzellmorphologie. 2. Nachweis einer aktivierenden Punktmutation in <i>KIT</i> Codon 816 im Blut, Knochenmark oder einem anderen extrakutanem Organ. 3. Veränderter Immunphänotyp der Mastzellen im Blut, Knochenmark oder anderen extrakutanen Organen mit Expression von CD2 und/oder CD25. 4. Gesamt-Tryptase-Wert dauerhaft > 20ng/ml. <p>*Haupt- und ein Nebenkriterium oder drei Nebenkriterien rechtfertigen die Diagnose einer SM.</p>

Tabelle 2: Oberflächenantigene von Mastzellen und Basophilen.

Antigen	Normale/ reaktive Mastzellen	Neoplastische Mastzellen	Basophile Granulozyten
CD34	-	-	-
CD117 (<i>KIT</i>)	+	+	-
Histamin	+	+	+
Tryptase	+	+	+ / -
Chymase	+ / -	+ / -	-
CD25	-	+	+
CD2	-	+	-
Chlorazetatesterase	+	+	-

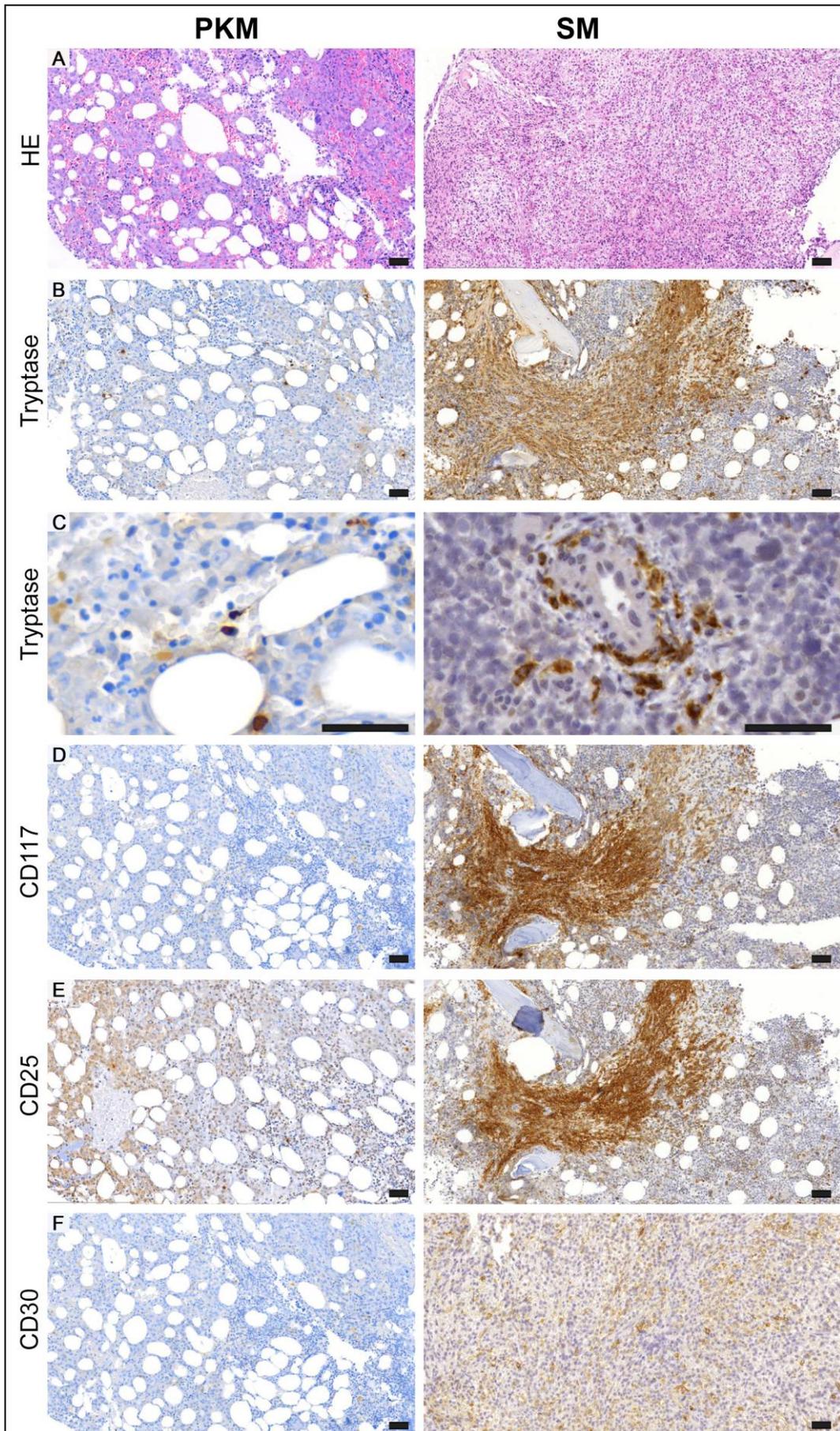


Abbildung 3: Knochenmarksbiopsie mit und ohne SM im Vergleich. HE-gefärbtes physiologisches Knochenmark und hyperzellulärem Knochenmark bei SM (**A**); Tryptase-Färbung, physiologisches Knochenmark und kompaktem Mastzellinfiltrat mit locker verstreuten Mastzellen bei SM (**B**); Tryptase-Färbung, physiologisch runde Mastzellen und atypischen spindelförmigen Mastzellen bei SM (**C**); CD117-, CD25-, CD30-Färbung, physiologisches Knochenmark und aberranter Expression von CD117, CD25 und CD30 (**D,E,F**). PKM= physiologisches Knochenmark, HE=Hämatoxylin und Eosin-Färbung.

3.3. Subklassifizierung der SM

Um eine weitere Typisierung der SM vornehmen zu können, sind klinische und laborchemische Befunde in die differenzialdiagnostischen Überlegungen mit einzubeziehen. Die klinischen Befunde werden in *B-* und *C-findings* unterteilt. Bei den *B-findings* liegt die Mastzellinfiltration des Knochenmarks unter 30% der Markraumfläche und der Serumtryptasespiegel liegt unter 200 ng/ml. Darüberhinaus sind Veränderungen im Knochenmark feststellbar, im Gegensatz zu den *C-findings* kommt es aber zu keiner Knochenmarksdysfunktion mit daraus resultierenden Zytopenien. Organfunktionsstörungen und periphere Blutbildveränderungen mit Verschlechterungstendenz sind nicht feststellbar. *C-findings* sind definiert als Organschädigungen, bedingt durch die Infiltration mit neoplastischen Mastzellen. Darunter fallen Malabsorption mit Gewichtsverlust, Hepatomegalie mit Aszites, Splenomegalie mit Hypersplenismus oder pathologischen Spontanfrakturen bedingt durch die Mastzellinfiltrate.

ISM ist durch das Fehlen von *B-* und *C-findings* charakterisiert. Ein vorläufiger Subtyp der ISM ist in der WHO-Klassifikation die *smouldering SM* (SSM) (SWERDLOW *et al.*, 2008). Bei dieser Form treten ein oder zwei *B-findings* auf. Eine ASM ist durch das Auffinden von *C-findings* charakterisiert. (Zur Diagnose einer MCL siehe 1.1., auf die SM-AHNMD wird im folgenden Kapitel eingegangen.)

B-findings

1. Mastzellinfiltration im Knochenmark > 30% und/oder Serumtryptasespiegel > 200 ng/ml.
2. Dysmyelopoese des Knochenmarks: Hyperzellularität mit vermindertem Fettzellenanteil; geringe Anzeichen einer Myelodysplasie oder Myeloproliferation, normale Blutwerte oder leichte persistierende Abweichungen ohne Verschlechterung.
3. Organvergrößerungen: Lebervergrößerung ohne eingeschränkte Leberfunktion und/oder palpierbare Milzvergrößerung ohne Milzüberaktivität, und/oder palpierbare oder viscerale Lymphknotenvergrößerung.

C-findings

1. Knochenmarksdysfunktion aufgrund einer oder mehrerer Zytopenien (Leukozyten < 1000/ µl, Hämoglobin < 10 g/dl, Thrombozyten < 100 000/ µl).
2. Palpierbare Lebervergrößerung mit Leberfunktionsstörung, Aszites und/oder portaler Hypertension.
3. Palpierbare Milzvergrößerung mit Milzüberfunktion.
4. Malabsorption mit Hypalbuminämie und Gewichtsverlust.
5. Knochenveränderungen mit Osteolyse und/oder pathologischen Frakturen.

3.4. Klassifikation und Diagnose einer SM-AHNMD

Die SM-AHNMD ist durch das Vorliegen einer weiteren nicht-mastozytären hämatologischen Neoplasie gekennzeichnet. Die Diagnose einer SM-AHNMD kann gestellt werden, wenn die WHO-Kriterien für ein SM (Kap. II 3.2.) und eine hämatologische Nichtmastzell-Erkrankung erfüllt sind. Diese Gruppe von Neoplasien kann ein sehr heterogenes morphologisches und klinisches Erscheinungsbild zeigen. In vielen Fällen ist das Knochenmark das einzig betroffene Organ (PULLARKAT *et al.*, 2003). In der Praxis lässt sich eine SM-AHNMD anhand folgender Kriterien diagnostizieren: pathologisches Blutbild und Morphologie, Hyperzellularität des Knochenmarks, Anzeichen einer Dysplasie oder abnormen Myelopoese, erhöhte Blastenzahl sowie abnorme Lymphozyten- bzw. Plasmazellaggregate (STOECKER *et al.*, 2012).

Die oben beschriebene Klassifikation einer SM nach WHO-Kriterien lässt sich auf die SM-AHNMD nicht immer übertragen. Das diagnostische Hauptkriterium für die SM „dichte multifokale Mastzellinfiltrate“ können durch eine AHNMD verdeckt sein und erst nach zytoreduktiver Therapie sichtbar werden. Ferner kann ein erhöhter Serumtryptasespiegel auch von nicht-mastozytären myeloischen Neoplasien induziert werden (SPERR *et al.*, 2000). Die Diagnose basiert in diesen Fällen allein auf dem Nachweis der verbleibenden drei Nebenkriterien (BERND *et al.*, 2004).

Bei der Mehrzahl der Patienten mit einer SM-AHNMD, wird als sekundäre Zweitneoplasie eine myeloische Stammzellerkrankung diagnostiziert (HORNY *et al.*, 1985). Am häufigsten sind darunter eine AML oder eine chronisch myelomonozytäre Leukämie (CMML) (SPERR *et al.*, 2000). Lymphoide Neoplasien wurden ebenfalls beschrieben, kommen aber sehr viel seltener vor (TRAVIS *et al.*, 1988). Die Einteilung der AHNMD und des SM-Subtyps erfolgen nach den WHO-Kriterien (Tab. 3; SWERDLOW *et al.*, 2008).

Tabelle 3: Myeloischen Neoplasien nach der WHO (SWERDLOW *et al.*, 2008).

Myeloische Neoplasie	AHNMD-Subtyp
Myeloproliferative Neoplasien (MPN)	Chronisch myeloische Leukämie (CML) Chronisch neutrophile Leukämie (CNL) Chronisch eosinophile Leukämie (CEL) Primäre Myelofibrose (PMF) Polyzythämia Vera (PV) Essentielle Thrombozythämie (ET) Eosinophilie-assoziierte MPN (MPN-Eo) Mastozytose Unklassifizierte MPN (MPN-U)
Myelodysplastische/myeloproliferative Neoplasien (MDS/MPN)	Chronisch myelomonozytäre Leukämie (CMML) Atypische CML (aCML) Juvenile myelomonozytäre Leukämie (JMML) Unklassifizierte MDS/MPN (MDS/MPN-U)
Myelodysplastische Syndrome (MDS)	Refraktäre Anämie (RA) Refraktäre Anämie mit Ringsideroblasten (RARS) Refraktäre Zytopenie mit multilineärer Dysplasie (RCMD) Refraktäre Anämie mit Blastenexszess (RAEB) MDS mit Deletion des Chromosoms 5q (MDS del 5q) Unklassifiziertes MDS (MDS-U)

Als weitere myeloische AHNMD-Erkrankungen wurden die verschiedenen Typen der AML gefunden. Aus dem Formenkreis maligner Lymphome wurden unter anderem die chronisch lymphatische Leukämie, lymphozytische Lymphome, Plasmazellmyelome, Hodgkin Lymphome und andere non-Hodgkin Lymphome als AHNMDs nachgewiesen (SPERR *et al.*, 2000; STOCKER *et al.* 2012).

4. Prognose und Therapie

4.1. Prognose

Die Prognose einer Mastozytose ist vom jeweiligen Subtyp abhängig. Patienten mit einer kutanen Mastozytose und einer ISM haben eine sehr gute Prognose. In über 95% der Fälle ist ihre Lebenserwartung nicht reduziert (VALENT *et al.*, 2001). Bei Kindern kommt es bei mehr als der Hälfte der Patienten mit einer kutanen Mastozytose bis zum Erreichen des Erwachsenenalters zu einer spontanen Remission.

Bei Patienten mit einer SM-AHNMD, ist meist die AHNMD entscheidend für die Prognose (HORNY *et al.*, 2008). Patienten mit einer SM-AHNMD haben eine kürzere mittlere Überlebenszeit (zwei Jahre), als Patienten mit einer ISM oder ASM. Patienten

mit einer MCL besitzen die kürzeste mittlere Überlebenszeit von zwei Monaten (LIM *et al.*, 2009). Unter den Patienten mit einer SM-AHNMD weisen Patienten mit einer SM-MPN eine signifikant längere mittlere Überlebenszeit auf, als Patienten mit SM-CMML und SM-MDS. Patienten mit SM-AML besitzen die schlechteste Prognose (PARDANANI *et al.*, 2009).

4.2. Therapie

Die Therapie der Mastozytose erfolgt größtenteils symptomatisch. Histamin- (H1- und H2) Antihistaminika werden bei Irritationen der Haut, Pruritus und gastrointestinalen Symptomen, wie Ulzera eingesetzt (METCALFE *et al.*, 1991). Weitere Medikamente, welche die Mediatorfreisetzung und -wirkung beeinflussen sind Glukokortikoide, Cromolyn Natrium, Acetylsalicylsäure und Leukotrienantagonisten (AUSTEN *et al.*, 1992; METCALFE *et al.*, 1991). Die oben beschriebene Therapie ist für die meisten Patienten mit einer kutanen Mastozytose und einer ISM ausreichend.

Für sogenannte high-grade Mastozytosen, dazu zählen die ASM, MCL und SM-AHNMD, sind häufig zytoreduktive Behandlungen notwendig. Da der Krankheitsverlauf bei SM-AHNMD sowohl von der AHNMD als auch der SM beeinflusst werden kann, sollte die Therapie auf beide Komponenten abgestimmt werden. Das prinzipielle Vorgehen bei diesen Patienten ist daher, die SM so zu behandeln, als wäre keine AHNMD vorhanden und die AHNMD so zu behandeln, als ob keine SM diagnostiziert worden wäre (PARKER *et al.*, 1991; RONNOV-JESSEN *et al.*, 1991). Eine erfolgreiche Behandlung der AHNMD kann zu einer Verschiebung der SM-Komponente in einen anderen SM-Subtyp führen (SPERR *et al.*, 1998).

Knochenmarkstransplantationen wurden bereits in einigen Fällen von SM-AHNMD angewandt (PREZEPIORKA *et al.*, 1998). Da es aber nur wenig Erfahrung mit dieser Methode gibt, sollte sie nur im Falle einer schweren Form der SM-AHNMD, MCL oder ASM zur Anwendung kommen (METCALFE *et al.*, 2008).

Immunmodulierende und myelosuppressive Therapien, wie zum Beispiel Interferon α , Kortikosteroide oder zytoreduktive Verfahren, wurden bereits alleine oder in Kombination als Therapiemaßnahme bei einer SM-AHNMD eingesetzt, häufig in Kombination mit einer Splenektomie. Diese Maßnahmen führen aber in der Regel nur zu einer partiellen oder kurzandauernden Remission (VALENT *et al.*, 2001; METCALFE *et al.*, 2008 und PULLARKAT *et al.*, 2009). Ähnliche Ergebnisse konnten mit zytostatischen Therapien erzielt werden. Bis heute eingesetzte Medikamente sind Cytosin Arabinosin (ARA-C), Doxorubicin, Daunorubicin und Vincristin, die alleine oder in Kombination eingesetzt wurden (METCALFE *et al.*, 2008).

Eine weitere verwendete Wirkstoffgruppe sind die Tyrosinkinaseinhibitoren (TKI). Dabei ist zu beachten, dass Imatinib, einer der am längsten bekannten TKI, bei Vorliegen von aktivierenden Punktmutationen im Codon 816 nahezu wirkungslos ist (AKIN *et al.*, 2003). Der Grund liegt darin, dass Imatinib nur eine Inhibierung der Adenosintriphosphat (ATP)-Bindungsstelle in der inaktiven Konformation des *KIT*-Rezeptors bewirkt und die aktive Konformation nicht binden kann (SCHINDLER *et al.*, 2000). Die Wirkungslosigkeit von Imatinib bei Patienten mit einer D816V Mutation führte zum Einsatz von neuen Multikinaseinhibitoren. Zu diesen zählt Dasatinib. Kokristallisationsstudien haben gezeigt, dass Dasatinib, im Gegensatz zu Imatinib, an die aktive Konformation bindet und daher bei vielen aktivierenden Mutationen inhibierend wirkt (LOMBARDO *et al.*, 2004). In ersten Studien führte Dasatinib zu einer Reduktion der Mastzellenanzahl, zu einer Abschwächung der Symptome und zu einer nicht mehr nachweisbaren D816V Mutation (USTUN *et al.*, 2009). Ein anderer Wirkstoff aus der Klasse der TKI stellt Midostaurin (PKC412) dar. Dieses inhibiert die Autophosphorylierung von *KIT* (GROWNEY *et al.*, 2005). Ein anderer TKI, Nilotinib (AMN 107) könnte ebenfalls eine potentielle Wirksamkeit in der Behandlung einer SMAHMND zeigen (VON BUBNOFF *et al.*, 2005).

4.3. Therapie in der Veterinärmedizin

Die Therapie der Wahl eines MZT ist eine frühestmögliche, radikale chirurgische Entfernung des Tumors. Eine Behandlung mit Radiotherapie oder Chemotherapie wird häufig angestrebt, wenn die chirurgische Entfernung aufgrund der Lokalisation aus kosmetischen oder funktionellen Gründen nicht möglich ist oder es sich um eine systemische Erkrankung oder bereits metastasierte Tumoren handelt. Eine weitere Möglichkeit stellt die Kombination aller drei Methoden dar. Eine Splenektomie wird bei Katzen mit SM empfohlen, um einen weiteren Abbau der intakten Blutzellreihen zu verhindern. Bei gastrointestinalen Beschwerden, insbesondere bei Ulzerationen, kommen Antihistaminika zum Einsatz (NELSON *et al.*, 2010). Aufgrund des häufigen Auftretens einer aktivierenden *KIT* Mutation bei Hunden (Kap. II 1.2.) können verschiedene TKIs bei dieser Tierart erfolgreich eingesetzt werden (HAHN *et al.*, 2008). Positive Erfahrungen gibt es ebenfalls mit dem für die Humanmedizin zugelassenen TKI Imatinib (YAMADA *et al.*, 2011).

5. Ziele der Arbeit

Der Nachweis einer *KIT* Mutation im Codon 816 wird nach der WHO in der Diagnose einer SM als ein diagnostisches Nebenkriterium gewertet (SWERDLOW *et al.*, 2008). Bei der systemischen Mastozytose und assoziierter klonaler hämatologischer nicht-mastozytärer Neoplasie (SM-AHNMD) kann *KIT* zusätzlich als Klonalitätsmarker für die beiden Komponenten der Erkrankung verwendet werden. In einer vorhergehenden Studie in unserer Arbeitsgruppe konnte eine klonale Beziehung in Abhängigkeit bestimmter AHNMD-Subtypen festgestellt werden, insbesondere bei myeloischen Zweitneoplasien (SOTLAR *et al.*, 2010). In dieser Studie soll der linienspezifische Nachweis der *KIT* Mutation in Knochenmarkszellen erbracht und die Korrelation der Mutationsfrequenz sowohl mit dem SM-, wie auch mit dem AHNMD-Subtyp untersucht werden. Abschließend soll geklärt werden, ob die Ergebnisse Rückschlüsse auf das Ausmaß der klonalen Beziehung zwischen beiden Erkrankungskomponenten zulassen. Mit Hilfe der Methode des *Laser Pressure Catapulting* wurden immunhistochemisch doppelmarkierte hämatopoetische Einzelzellen mikrodisektiert, deren gepoolt DNA von zirka 1000 Zellen mittels *semi-nested* Polymerase-Kettenreaktion (PCR) amplifiziert und in einer anschließenden Schmelzpunktanalyse mit spezifischen Hybridisierungssonden genotypisiert. Hierdurch wurden Patienten mit SM-AHNMD bezüglich einer Beteiligung mehrerer hämatopoetischer Zellreihen analysiert.

Insgesamt wurden in dieser Arbeit die folgenden spezifischen Ziele adressiert:

1. Häufigkeit von *KIT* Mutationen in der AHNMD-Komponente bei SM-AHNMD.
2. Identifikation der am *KIT* D816V-positiven Klon beteiligten hämatopoetischen Zellreihen.
3. Korrelation des linienspezifischen Mutationsnachweises mit dem AHNMD Subtyp.
4. Korrelation des linienspezifischen Mutationsnachweises mit dem SM-Subtyp.

III. MATERIAL UND METHODEN

1. Material

In die Studie wurden Patienten aufgenommen, bei denen eine SM-AHNMD mit Subtypisierung der SM- und der AHNMD-Komponente, mit detaillierten morphologischen, immunhistologischen und molekularbiologischen Untersuchungen, basierend auf den WHO-Kriterien, diagnostiziert wurde (Kap. III 3.). Bei allen Patienten war das zweite Nebenkriterium (Nachweis einer *KIT* Mutation im Codon 816 im Blut, Knochenmark oder läSIONalem Gewebe) erfüllt.

Im Rahmen der vorliegenden Dissertationsarbeit wurden Knochenmarksbiopsien von 50 Patienten aus den Jahren 2008 bis 2013 retrospektiv analysiert. Die Knochenmarksstanzzylinder wurden in 5%-igem Formalin fixiert, über Nacht in Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) dekalzifiziert und in Paraffin eingebettet. Für die Herstellung immunhistochemischer Doppelfärbungen zur anschließenden Laser-Mikrodissektion wurden Paraffinschnitte von ca. 3-4 µm Dicke angefertigt. Bei dieser Schnittdicke liegen die angeschnittenen Zellen zumeist nebeneinander und sind so bestmöglich zu beurteilen und zu dissektieren. Die Diagnose, das Geschlecht und das Alter der Patienten sind der Tabelle Anhang 1 zu entnehmen.

Als Positivkontrolle für den Nachweis der *KIT* Mutation D816V diente genomische DNA der Zelllinie HMC-1.2 (zur Verfügung gestellt von Butterfield, Rochester, USA). Die Zelllinie stammt von einem Patienten mit MCL und trägt die *KIT* Mutation D816V heterozygot (BUTTERFIELD *et al.*, 1988).

2. Methoden

2.1. Immunfärbung der Gewebeschnitte

Um die *KIT* Mutationen im Codon 816 separat an unterschiedlichen Zellpopulationen (z.B. neutrophile Granulozyten, Monozyten, eosinophile Granulozyten, Erythroblasten, Megakaryozyten, T-Lymphozyten, etc.) zu ermöglichen, hat sich die Methode der Mikrodissektion mittels *Laser Pressure Catapulting* bewährt (SOTLAR *et al.*, 2010; SCHÜTZE *et al.*, 1998). Um die verschiedenen Zelltypen unterscheiden und insbesondere von *KIT* D816V-positiven Mastzellen abgrenzen zu können, werden immunhistochemische Doppelfärbungen an Paraffinschnitten angefertigt.

Im Knochenmark von Patienten mit (*high-grade*) SM sind zumeist multifokale, lichtmikroskopisch oft leicht erkennbare, kompakte Mastzellinfiltrate nachweisbar. Zusätzlich liegt eine Vermehrung diffus verteilter Mastzellen vor, welche in der Regel nur immunhistochemisch zu erkennen sind. Insbesondere um diese diffus verteilten

Mastzellen bei der Mikrodisektion anderer hämopoetischer Zellen nicht versehentlich mitzuerfassen, und so eine Kontamination dieser Zellen mit *KIT* D816V-positiven Mastzellen zu riskieren, wurden immunhistochemische Doppelmarkierungen der Mastzellen einerseits, sowie der zu analysierenden Zellen andererseits, vorgenommen. Die verschiedenen Antikörper (Tab. 4) werden mit unterschiedlichen Detektionssystemen nachgewiesen (Tab. 5).

Tabelle 4: Folgende Antikörper werden mit Mastzelltryptase, bzw. Mastzellchymase, beides selektive Marker für Mastzellen, kombiniert.

Antigen	Klon	Verdünnung	Hersteller (Kat.Nr.)
MCT	AA1	1:600 (500*)	Dako
MCC	CC1	1:1000	Novocastra
CD15	Carb-3	1:2200	Dako
CD14	7	1:50	Novocastra
EPX	polyclonal	1:100	Santa Cruz (sc-19147)
GlycophorinC	Ret40f	1:50	Dako
CD61	Y2/51	1:50	Dako
CD3	F7.2.38	1:200	Dako

MCT= Mastzelltryptase, MCC= Mastzellchymase, EPX= eosinophile Peroxidase, *Verdünnung 1:500 bei CD61+MCT.

Tabelle 5: Übersicht über verwendete Detektionssysteme, Chromogene und Antikörper.

Detektionssystem (Hersteller)	Chromogen (Hersteller)	Antikörper
Biotinylated anti mouse IgM (Vector)	AEC+ (Dako)	CD15
Streptavidin HRP (Novocastro)	AEC+ (Dako)	CD15
Real Detektion System APAPP (Dako)	Vektor Blue Alkaline Phosphatase Substrate Kit III (Vector)	MCT, MCC
ImmPress Reagent Kit Anti-Mouse Ig (Vector)	HRP-Green (Biomol), AEC+ (Dako)	MCT, CD14, GlycophorinC
ImmPress Reagent Kit Anti-Rabbit Ig (Vector)	AEC+ (Dako)	CD3
ImmPress Reagent Kit Anti-Goat Ig (Vector)	AEC+ (Dako)	EPX
MACH 3 Mouse AP Polymer Detection (Biocare)	Chromogen Red (Dako)	CD61

AEC= 3-Amino-9-Ethyl-Carbazol, HRP= horseradish peroxidase, APAPP= Alkalische-Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase, AP= Alkalische Phosphatase, MCT=Mastzelltryptase, MCC= Mastzellchymase, EPX= eosinophile Peroxidase.

Die angefertigten Gewebeschnitte werden zur Entparaffinierung für 30 Min. in Xylol inkubiert und anschließend in einer absteigenden Alkoholreihe schrittweise rehydriert. Die weitere Vorbehandlung der Schnitte erfolgt mittels Kochen für 2x15 Min. in der Mikrowelle bei 750 W in *Target Retrieval Solution* (10 mM Citrat-Puffer pH 6,0 (10x), Dako). Sie dient dem Aufbrechen von Formalinverbindungen und damit der Freisetzung

antigener Epitope. Zum pH-Angleich werden die Gewebeschnitte nach jedem Arbeitsschritt für 2x10 Min. in TRIS-Puffer pH 7,5 (7,4 mM Trizma® base, Sigma; 43,5 mM Trizma® hydrochlorid, Sigma; 150 mM Natriumchlorid, Merck) gespült. Die Blockierung endogener Peroxidasen erfolgt mittels 10-minütiger Inkubation in 7,5%-iger wässriger Wasserstoffperoxidlösung. Um unspezifische Antikörperbindungen zu verhindern, wird anschließend für 10 Min. ein serumfreier Proteinblock (0,25% Kasein in Phosphate-Buffered Saline (PBS), Dako) aufgetragen. Die *Labelled-Strept-Avidin-Biotin*-Methode wird zur Detektion der neutrophilen Granulozyten und Monozyten (CD15+) eingesetzt. Das Gewebe wird für 60 Min. mit 100 µl in *Antibody Diluent* (Dako) verdünntem Primärantikörper inkubiert. Im nächsten Schritt erfolgt eine 30-minütige Inkubation mit einem biotinylierten Sekundärantikörper, welcher als Brücke zwischen dem Primärantikörper und dem Detektionskomplex dient. Das Detektionssystem besteht aus Streptavidin-gekoppelter Meerrettichperoxidase (*horseradish peroxidase* (HRP); Abb. 4). Der Peroxidase wird Wasserstoffperoxid als Substrat angeboten. Die freiwerdenden Protonen oxidieren das, für 10 Min. aufgetragene, fast farblose Chromogen AEC+ zu einem braunroten Endprodukt (Abb. 21A).

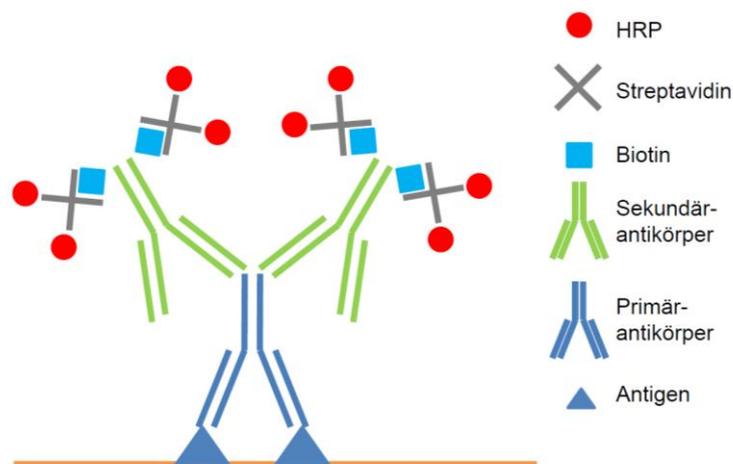


Abbildung 4: *Labelled-Strept-Avidin-Biotin*-Methode. Der Primärantikörper erkennt das Antigen im Gewebe. Zur Detektion und Signalamplifikation bindet biotinylierter Sekundärantikörper den Primärantikörper sowie die Streptavidin-gekoppelte Meerrettichperoxidase.

In einem zweiten Schritt werden mit dem *Real Detektion System* APAAP Mastzellen detektiert. Der Primärantikörper (100 µl verdünnter anti-Tryptase Antikörper) wird für 60 Min. aufgetragen. Anschließend erfolgt die Inkubation mit dem Sekundärantikörper für 30 Min. Dieser fungiert auch hier als Brücke zwischen dem Primärantikörper und dem Detektionskomplex Alkalische-Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase (APAAP; Abb. 5). Der APPAP-Komplex wird für 30 Min. aufgetragen. Als Chromogen wird *Vector Blue Alkaline Phosphatase Substrate Kit III* verwendet. Dieses wird für 20 Min. auf den

Schnitt aufgetragen und färbt die Zellen blau (Abb. 21B-E).

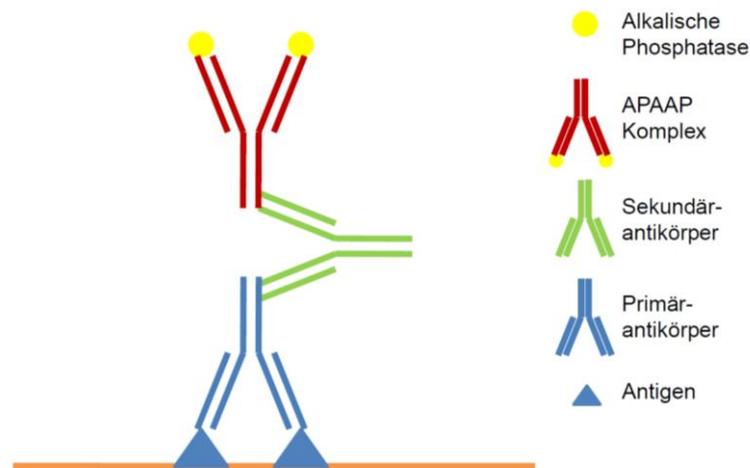


Abbildung 5: *Real Detection System APAAP*. Der Primärantikörper erkennt das Antigen im Gewebe. Zur Detektion und Signalamplifikation verbindet der Sekundärantikörper den Primärantikörper mit dem APPAP-Komplex, dessen konjugierte alkalische Phosphatase mit dem Chromogen reagiert.

Im Gegensatz zur *Labelled-Strept-Avidin-Biotin-Methode* funktionieren sowohl das *ImmPress Reagent Kit-System* als auch das *MACH 3 Mouse AP Polymer Detection System* ohne Biotin, und der Sekundärantikörper ist direkt an das Enzym-Mikropolymer gebunden (Abb. 6). Mit dem *ImmPress System* werden Mastzellen in der Doppelfärbung mit Megakaryozyten markiert. Außerdem werden auch Monozyten, Erythroblasten, eosinophile Granulozyten und T-Lymphozyten mit dem *ImmPress System* angefärbt. Das *MACH 3 Mouse AP Polymer Detection System* wird zur Markierung von Megakaryozyten benutzt. Die Peroxidase des *ImmPress Reagent Kit-System* wird reduziert und oxidiert das farblose Chromogen AEC+ (braunrot) oder HRP-Green (grün) (Abb. 21B-F). Die alkalische Phosphatase des *MACH 3 Mouse AP Polymer Detection System* reagiert mit Chromogen Red zu einem roten Farbstoff (Abb. 21 F).

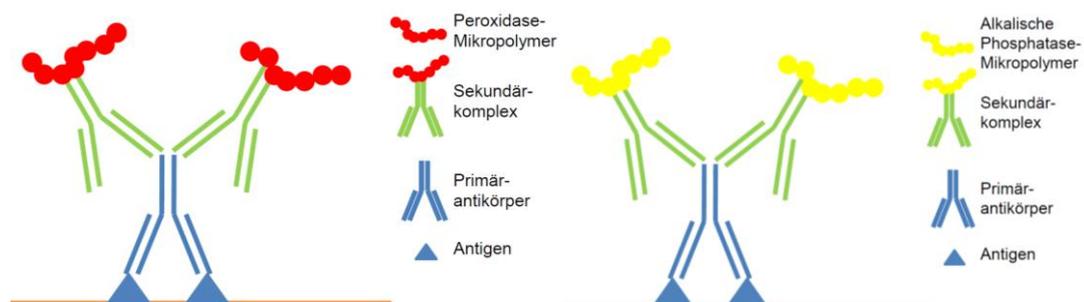


Abbildung 6: *ImmPress Reagent Kit-System* (links) und *MACH 3 Mouse AP Polymer Detection System* (rechts). Der Primärantikörper erkennt das Antigen im Gewebe. Zur Detektion und Signalamplifikation können mehrere direkt mit Peroxidase oder alkalischer Phosphatase konjugierte Sekundärantikörper an den Primärantikörper binden.

Die gefärbten Schnitte werden nicht, wie in der Histologie üblich, mit einem Deckglas versehen, da bei der Mikrodissektion einzelne Zellen aus dem Gewebe zu isolieren sind.

Die Aufnahmen der immunhistochemisch gefärbten Knochenmarksbiopsien werden mit zwei verschiedenen Kameramodellen erstellt (Spiegelreflexkamera EOS 550D, Canon; Axio Cam, AxioPlan 2, Zeiss, Software: Axio Vision Rel. 4.8). Von einzelnen ausgewählten Fällen werden die diagnostischen Schnitte (Kap. II 3.2. und Kap. IV) eingescannt (Mirax Desk, Manual Brightfield Scan, Zeiss, Software: Mirax Viewer 1.12; MikroScan D2, Microscan, Software: Q-Skan Software).

2.2. KIT Mutationsanalyse an Gesamt-DNA

Für die Mutationsanalyse an Gesamt-DNA aus Gewebeschnitten werden drei PCR Methoden parallel angesetzt: 1. Konventionelle PCR (SOTLAR *et al.*, 2003), 2. *Locked Nucleic Acid (LNA)-single* PCR (SOTLAR *et al.*, 2003) und 3. *LNA semi-nested* PCR (SOTLAR *et al.*, 2010),

2.2.1. Extraktion der DNA

Für die Mutationsanalyse an der Gesamt-DNA werden je nach Größe der Knochenmarksbiopsie vier bis acht Paraffinschnitte benötigt. Zunächst erfolgt eine Entparaffinierung der Gewebeschnitte. Dazu werden die Schnitte für 2x10 Min. in Xylol entparaffiniert und in absolutem Ethanol für 2x10 Min. inkubiert, um Xylolreste zu entfernen. Danach werden die Gewebeschnitte an der Luft getrocknet. Die weitere Isolierung und Reinigung der DNA wird mittels eines Kits der Firma Quiagen (QIAamp® DNA Micro Kit) durchgeführt. Nach der Trocknung wird das entparaffinierte Gewebe aller Schnitte eines Falles mit Hilfe eines sterilen Skalpells abgekratzt und in einem Ansatz aus 180 µl ATL-Puffer (Quiagen) und 20 µl Proteinase K für 21 Stunden bei 56°C verdaut. Die verdaute DNA wird entsprechend den Anleitungen des Kits gereinigt und in 12 µl ddH₂O gelöst. Die DNA-Konzentration wird photometrisch bestimmt und mit ddH₂O auf 25 ng/µl verdünnt. Die so aufbereitete DNA wird für die PCR Amplifikation der *hot-spot* Region im Codon 816 des c-kit Gens verwendet.

2.2.2. Funktion der LNA

Locked Nucleic Acid (LNA) ist ein modifiziertes Ribonukleinsäure-Nukleotid. Die Ribose-Einheit von einem LNA Nukleotid ist mit einer zusätzlichen Brücke zwischen dem 2'-Sauerstoff und 4'-Kohlenstoff mit dem Ribosering verknüpft. LNA-modifizierte Oligonukleotide sind für ihre erhöhte Hybridisationsaffinität zu komplementärer DNA und RNA bekannt (KAUR *et al.*, 2006). Das verwendete LNA-Molekül weist die Wildtypsequenz auf (Tab. 6) und inhibiert so die Amplifikation des Wildtyp-Allels. Dies

führt zu einer verstärkten Amplifikation der mutierten Allele (Abb.7). Die Methode wird daher als *PCR-clamping* bezeichnet (ORUM *et al.*, 1993).

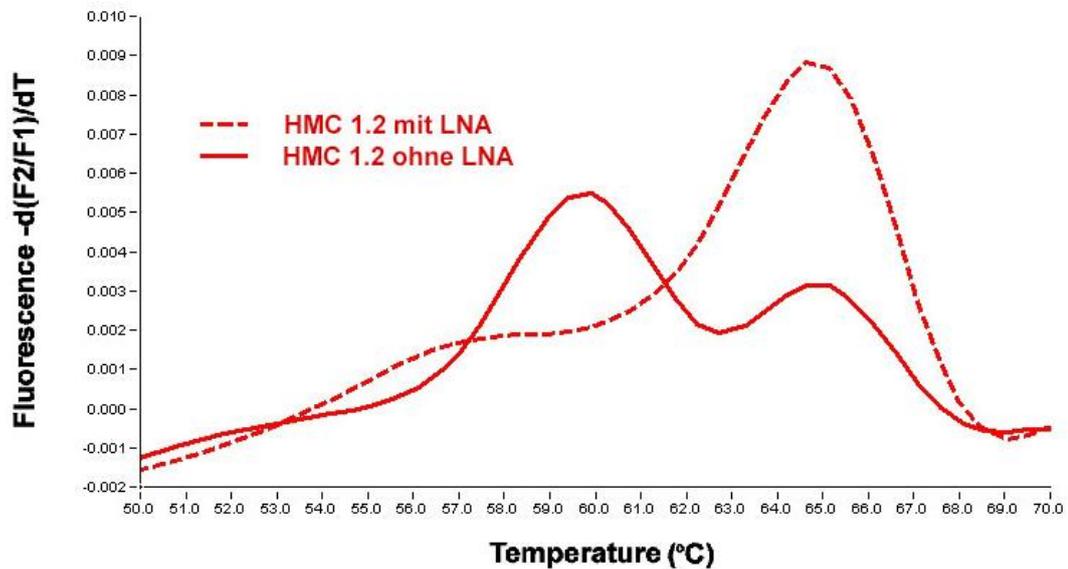


Abbildung 7: Schmelzpunktanalyse von HMC-1.2 DNA mit (gestrichelt) und ohne (durchgezogen) LNA. LNA inhibiert die Amplifikation des Wildtyp-Allels und führt zu der charakteristischen Verstärkung des Schmelzpunktsignals der Sensorsonde für die *KIT* Mutation D816V.

2.2.3. Konventionelle PCR und LNA-single PCR

Die PCR ist eine Methode, um einen definierten DNA-Abschnitt *in vitro* zu vervielfältigen. Der PCR-Prozess besteht aus einer bestimmten Anzahl von Zyklen; jeder Zyklus besteht aus drei Schritten. Der Reaktionsablauf läuft automatisiert in einem Thermocycler (Veriti 96 Well Thermocycler, Applied Biosystems) ab. In der *Denaturierungsphase* wird die doppelsträngige DNA auf 95°C erhitzt. Dabei brechen die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den beiden DNA-Strängen auf. Anschließend wird das Reaktionsgemisch auf die, für die ausgewählten Primer optimale, Hybridisierungs- oder Annealingtemperatur – in dieser Studie 56°C – abgekühlt. In der *Hybridisierungsphase* binden die beiden ausgewählten PCR-Primer nun an die komplementären DNA-Sequenzen der DNA-Einzelstränge und schließen den zu analysierenden DNA-Abschnitt ein. In der *Elongationsphase* synthetisiert eine thermostabile DNA-Polymerase von den Primern ausgehend den entsprechenden komplementären DNA-Strang. Alle neu synthetisierten DNA-Abschnitte dienen anschließend als Ausgangsmaterial für den nächsten PCR-Zyklus und ermöglichen so theoretisch eine exponentielle Vervielfältigung des Ausgangsmaterials, wodurch die Analyse bezüglich einer Mutation erst ermöglicht wird. Im Rahmen dieser Studie wurden jeweils 40 bis 55 PCR-Zyklen durchgeführt.

Dem ersten PCR-Zyklus wird eine längere Initialisierungsphase bei 95°C vorangestellt, um sicherzustellen, dass sich sowohl die Ausgangs-DNA als auch die Primer vollständig voneinander getrennt haben und nur noch in Einzelsträngen vorliegen. Dies dient der Vermeidung einer unbeabsichtigten Amplifikation von DNA auf dem Boden unspezifischer Primerbindungen. Des Weiteren wird durch diesen Schritt die verwendete *hot-start* Polymerase erst aktiviert. Im Anschluß an den letzten Zyklus folgt eine längere Elongationsphase, um möglichst viele Kopien zu komplettieren (Abb. 8).

Die Amplifikation der DNA und die Detektion der *KIT* Codon 816 Mutationen erfolgt am LigthCycler® (LightCycler 1.5, Roche, Software: LigthCycler® 1. Instrument). In diesem System können die PCR-Amplifikation und die anschließende Schmelzpunktanalyse in einem Schritt ablaufen, ohne dass zwischen den beiden Analysen erneut pipettiert werden muss. Dies führt zu einer Minimierung des Kontaminationsrisikos. Es wird eine konventionelle PCR und eine LNA-*single* PCR mit Einsatz des LNA-medierten *PCR-clampings* durchgeführt. Die verwendeten Primer und Sonden sind in Tabelle 6 aufgeführt.

Tabelle 6: Übersicht der verwendeten Primer und Sonden.

Primer	Sequenz	Länge	Position ¹ (nt)	T _m (C°)
<i>KIT</i> 1F	5'-CAC AGA GAC TTG GCA GCC AG-3'	20 nt	7097-7116	59,0
<i>KIT</i> 2F	5'-CAG CCA GAA ATA TCC TCC TTA CT-3'	23 nt	7110-7132	54,4
<i>KIT</i> 2B	5'-TTG CAG GAC TGT CAA GCA GAG-3'	21 nt	7247-7227	57,9
<i>KIT</i> LNA ²	5'-GCC AGA GAC ATC AAG AAT G—NH ₂	19 nt	7169-7187	-
<i>KIT</i> Sensor ³	AGC CAG AGT CAT CAA GAA TGA TTC TA-FL	26 nt	7168-7193	56,7
<i>KIT</i> Anchor	LC640-ATG TGG TTA AAG GAA ACG TGA GTA CCC A	28 nt	7197-7214	62,8

1: GenBank Accession No. L04143, **2:** Wildtyp-Sequenz, **3:** Mutation A→T für D816V an Position 7176, T_m= Schmelztemperatur.

Ansatz für die Analyse von Gesamt-DNA:

- 1,5 µl LightCycler FastStart DNA Master HybProbe (Roche)
- 2,4 µl MgCl₂ (25 mM, Quiagen)
- je 0,75 µl *KIT* 2F (5 µM, Tibmolbiol) und *KIT* 2B (5 µM, Tibmolbiol)
- je 0,75 µl *KIT* Anchor (6 µM, Tibmolbiol) und *KIT* Sensor (6 µM, Tibmolbiol)
- 0,5 µl LNA (0,5 µM, Tibmolbiol)
- 3 µl DNA (25 ng/µl) oder HMC-1.2 DNA (2,5 ng/µl, Positivkontrolle) oder ddH₂O (Negativkontrolle)

mit ddH₂O auf 15 µl auffüllen.

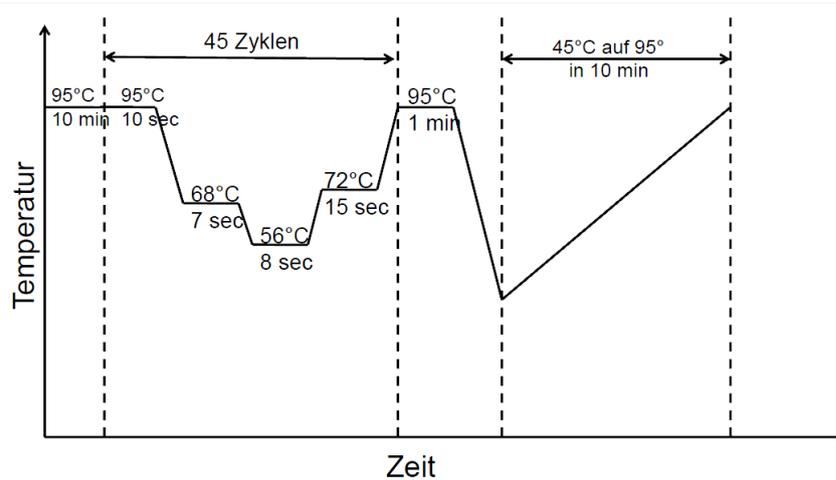


Abbildung 8: Ablauf der konventionellen PCR und LNA-*single* PCR am LightCycler®. Initialisierungsphase von 10 Min. bei 95°C, 45 Amplifikationszyklen bestehend aus 10 Sek. Denaturierungsphase bei 95°C, Hybridisierungsphasen von 7 Sek. bei 68°C (LNA-Molekül) und 8 Sek. bei 56°C (PCR-Primer), Elongationsphase von 15 Sek. bei 72 °C, anschließend Schmelzpunktanalyse bestehend aus 1 Min. Denaturierungsphase bei 95°C, Temperaturerhöhung von 45°C auf 95°C innerhalb von 10 Min.

2.2.4. Schmelzpunktanalyse mit Hybridisierungssonden

Die Mutationsanalyse erfolgt nach dem Prinzip der Schmelzpunktanalyse. Diese basiert auf dem sogenannten *fluorescence resonance energy transfer* (FRET) zwischen zwei am 3'- und am 5'-Ende fluoreszenzgelabelten Oligonukleotidsonden, welche in unmittelbarer Nachbarschaft (Abstand von ca. 3 Basen) an dem Zielstrang binden. Dabei kommen sich die Fluorophore sehr nahe (WITTMER *et al.*, 1997). Der F1 Donor Fluorophor (zum Beispiel Fluorescein) wird durch eine externe Lichtquelle angeregt und überträgt einen Teil der aufgenommenen Energie an den angehängten F2 Akzeptor (zum Beispiel LightCycler-Red 640 oder 705) in einer Dipol-Dipol Interaktion. Das angeregte F2 Fluorophor emittiert ein messbares Signal (in einer unterschiedlichen Wellenlänge).

Zur Detektion der *KIT* Mutation werden zwei spezifische Sonden verwendet (Tab. 6). Die „strangaufwärts“ liegende Sensorsonde ist am 3'-Ende mit Fluorescein (LC-F) markiert und weist im Bereich des *hot-spots* die Sequenz der *KIT* Mutation D816V auf. Die „strangabwärts“ liegende Anchorsonde ist an ihrem 5'-Ende mit LightCycler-Red 640 (LC-R640) gelabelt. Beide Sonden binden im Abstand von einer Base an ihren Zielstrang. Im Anschluss an die PCR wird das Reaktionsgemisch auf 95°C erhitzt und anschließend auf 40°C abgekühlt, so dass die Sonden an die DNA-Einzelstränge binden können. Die Temperatur in der Reaktionskammer wird im Anschluss daran kontinuierlich auf 95°C erhitzt (0,3°C pro Sekunde). Erst durch Hybridisierung beider Sonden, kann ein Energietransfer vom Donor LF-C auf den Akzeptor LC-R640 stattfinden. Die von diesem emittierte Fluoreszenz wird im LightCycler® gemessen und ist proportional zur Menge des Amplifikationsprodukts. Ist der im Verhältnis zur Anchorsonde niedrigere

Schmelzpunkt der Sensorsonde erreicht, löst sich diese vom Amplikon ab und der Energietransfer zwischen den Fluoreszenz-Molekülen der Hybridisierungs sonden bricht ab. Es kommt zu einer abrupten Abnahme der emittierten und vom LightCycler® registrierten Energie. In der ersten Ableitung wird dieser Energieabfall als Peak dargestellt (SOTLAR *et al.*, 2009; MANGASSER-STEPHAN *et al.*, 1999). Der Schmelzpunkt der Sensorsonde liegt bei 64°C und entspricht der *KIT* D816V Mutation. Aufgrund eines *mismatches* der Sensorsonde mit der Wildtyp-DNA, löst sie sich bereits 4°C früher, also bei ca. 60°C (Abb. 9).

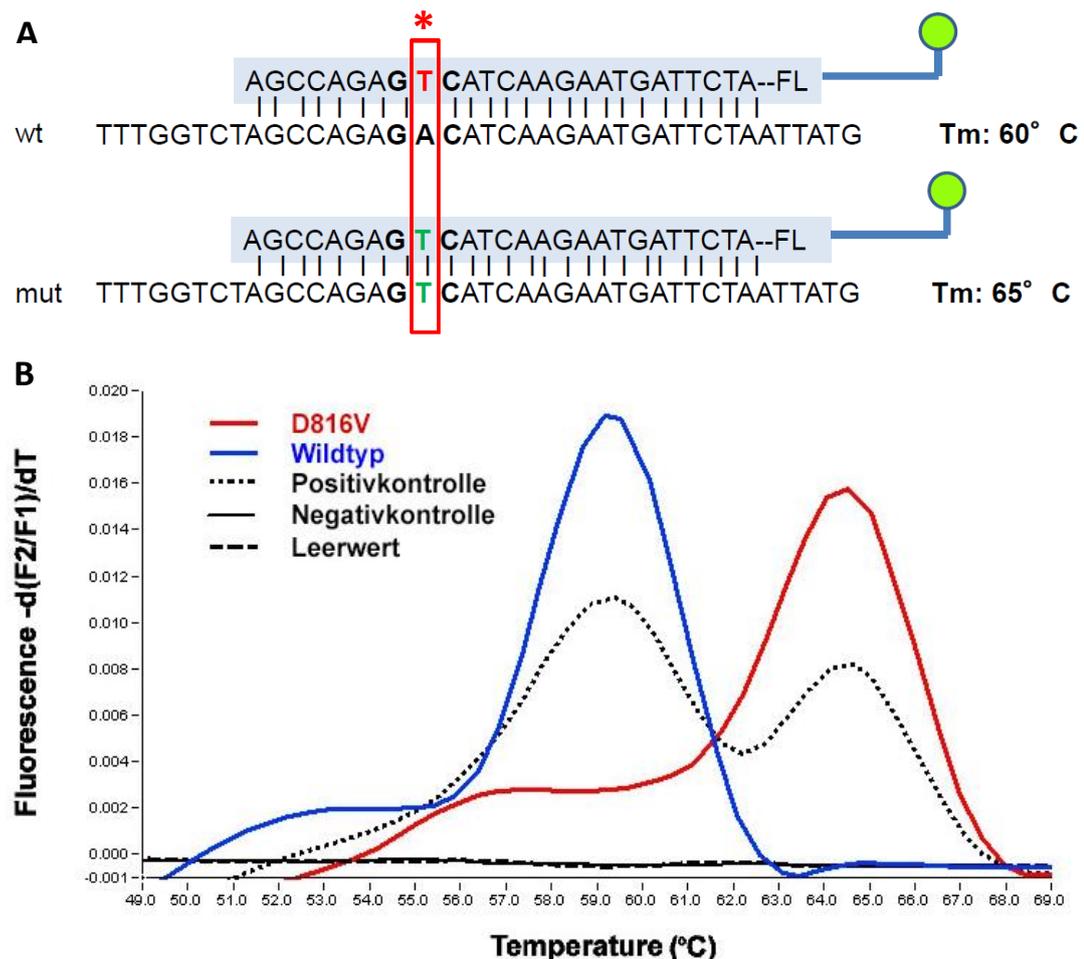


Abbildung 9: Hybridisierungsposition der Sensorsonde (A) und Darstellung der Peaks nach Schmelzpunktanalyse (B). Die Sensorsonde besitzt die Basensequenz der *KIT* Mutation D816V, ihr Schmelzpunkt liegt bei 64°C. Mit der Wildtypsequenz besitzt die Sensorsonde aufgrund des *mismatches* einen um 4°C niedrigeren Schmelzpunkt bei 60°C (A). Die Mutation *KIT* D816V zeigt einen Peak bei 64°, die Wildtypprobe bei 60°. Die heterozygote Zelllinie HMC-1.2 weist Peaks bei beiden genannten Temperaturen auf (B). * = Basenposition 7176, wt= Wildtyp, mut= mutiert.

2.2.5. LNA *semi-nested* PCR

Die Amplifikation der Gesamt-DNA erfolgt zusätzlich mittels einer LNA *semi-nested* PCR. Bei diesem Verfahren wird in einer ersten PCR (Abb. 11) ein größerer DNA-Abschnitt amplifiziert (Primerpaar 1F und 2B). In einer zweiten PCR (Abb.12) dienen die

PCR-Produkte als Template von dem ein kleinerer Abschnitt noch einmal amplifiziert wird (Primerpaar 2F und 2B) (Abb. 10). Ein Primer (*KIT 2B*) wird für beide PCRs verwendet, daher die Bezeichnung *semi-nested* PCR. Dieses aufwändige Verfahren ist notwendig, um die Sensitivität der Methode ausreichend zu erhöhen.

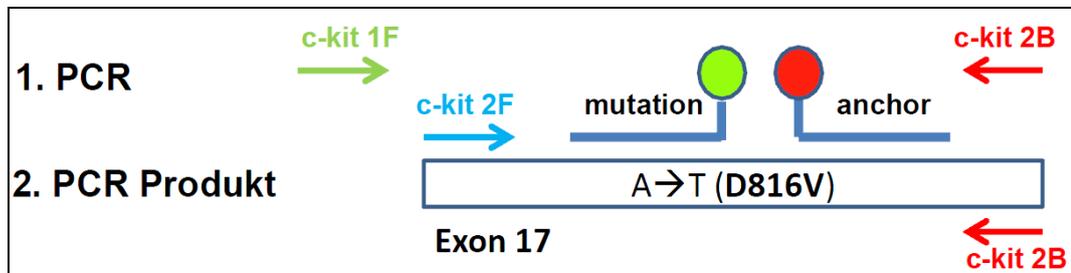


Abbildung 10: Schematische Darstellung der Primer und Hybridisierungssonden.

Zusammensetzung des Ansatzes der ersten PCR:

- 1,5 µl 10xBuffer (100 mM Tris-HCl, pH 8.3, 500 mM KCl, 15 mM Magnesiumchlorid, 0.01% (w/v) Gelatine, Applied Biosystems)
- 0,12 µl dNTPs (25 µM, Fermentas)
- je 0,9 µl Primer *KIT 1F* (5 µM, Tibmolbiol) und Primer *KIT 2B*
- 0,7 µl LNA
- 0,09 µl Taq Polymerase (5 U/µl, Applied Biosystems)
- 1,5 µl DNA oder 2 µl HMC-1.2 DNA (Positivkontrolle) oder 3 µl ddH₂O (Negativkontrolle)

mit ddH₂O auf 15 µl auffüllen.

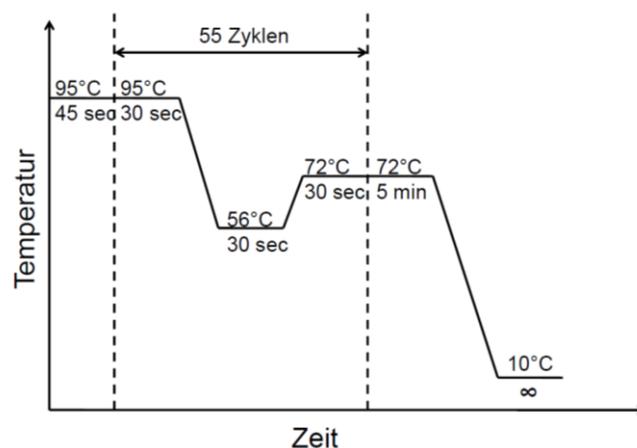


Abbildung 11: Ablauf der 1. PCR. Initialisierungsphase von 45 Sek. bei 95°C, 55 Amplifikationszyklen bestehend aus 30 Sek. Denaturierungsphase bei 95°C, 30 Sek. Hybridisierungsphase bei 56°C, 30 Sek. Elongationsphase bei 72°C, 5 Min. Elongationsphase bei 72°C, Abkühlung auf 10°C.

Zusammensetzung des Ansatzes der *semi-nested* PCR:

- 1,5 µl 10xBuffer
- 0,12 µl dNTPs
- je 0,9 µl Primer *KIT* 2F und Primer *KIT* 2B
- 0,09 µl Taq Polymerase
- 1 µl Template der 1. PCR oder HMC-1.2 DNA (Positivkontrolle) oder ddH₂O (Negativkontrolle)

mit ddH₂O auf 15 µl auffüllen.

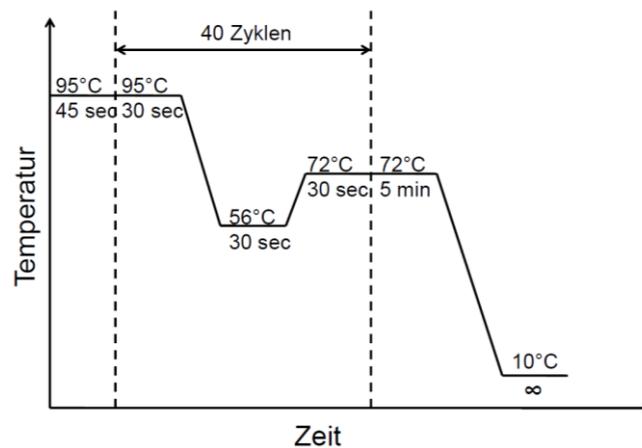


Abbildung 12: Ablauf der *semi-nested* PCR. Initialisierungsphase von 45 Sek. bei 95°C, 40 Amplifikationszyklen bestehend aus 30 Sek. Denaturierungsphase bei 95°C, 30 Sek. Hybridisierungsphase bei 56°C, 30 Sek. Elongationsphase bei 72°C, 5 Min. Elongationsphase bei 72°C, Abkühlung auf 10°C.

Direkt nach der PCR erfolgt die reine Schmelzpunktanalyse am LigthCycler® (Abb. 13).

Der Ansatz für die Schmelzpunktanalyse:

- 0,54 µl *KIT* Anchor
- 0,54 µl *KIT* Sensor
- 0,91 µl MgCl₂
- 6 µl Template PCR 2

mit ddH₂O auf 12 µl auffüllen.

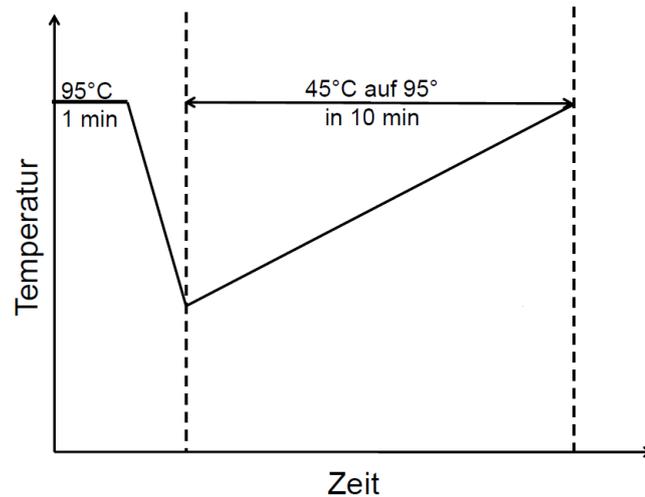


Abbildung 13: Ablauf der Schmelzpunktanalyse am LigthCycler®. 1 Min. Denaturierungsphase bei 95°C, Temperaturerhöhung von 45°C auf 95°C in 10 Min.

2.2.6. Auswertung der Ergebnisse der Gesamt-DNA

Die Gesamt-DNA wird als mutiert bewertet, wenn die Mutation entweder mittels aller drei PCR-Methoden oder in den jeweils sensitiveren Verfahren nachgewiesen werden konnte. Eine in der LNA *semi-nested* PCR nicht reproduzierbare Mutation aus den *single*-PCRs, führt zu einer Wiederholung der gesamten Analyse.

2.3. KIT Mutationsanalyse an mikrodisezierten Zellen

2.3.1. Lasermikrodisektion von Einzelzellen

Um einzelne Zellen auf das Vorhandensein von *KIT* Codon 816 Mutation zu untersuchen, wird die Methode des *Laser Pressure Catapulting* eingesetzt. Diese Methode verwendet einen Laser (Axiovert 200M, Palm System, Zeiss, Software: Palm@Robo Software, Micro Laser Systems, Version 2.2-0103 (DE)), um einzelne Zellen aus dem Gewebeschnitt direkt in den Deckel eines vorbereiteten PCR-Tubes zu katapultieren (Abb. 14). Dabei handelt es sich um eine Methode, welche mechanischen Kontakt mit dem Gewebe vermeidet und damit das Risiko von Kontaminationen minimiert (SCHÜTZE *et al.*, 1998). Diese Form der Mikrodisektion wurde bereits erfolgreich eingesetzt, um Zellen des Kolonkarzinoms (SCHÜTZE *et al.*, 1998), Mastzellen (SOTLAR *et al.*, 2000) und Zellen von AHNMDs zu untersuchen (SOTLAR *et al.*, 2010).

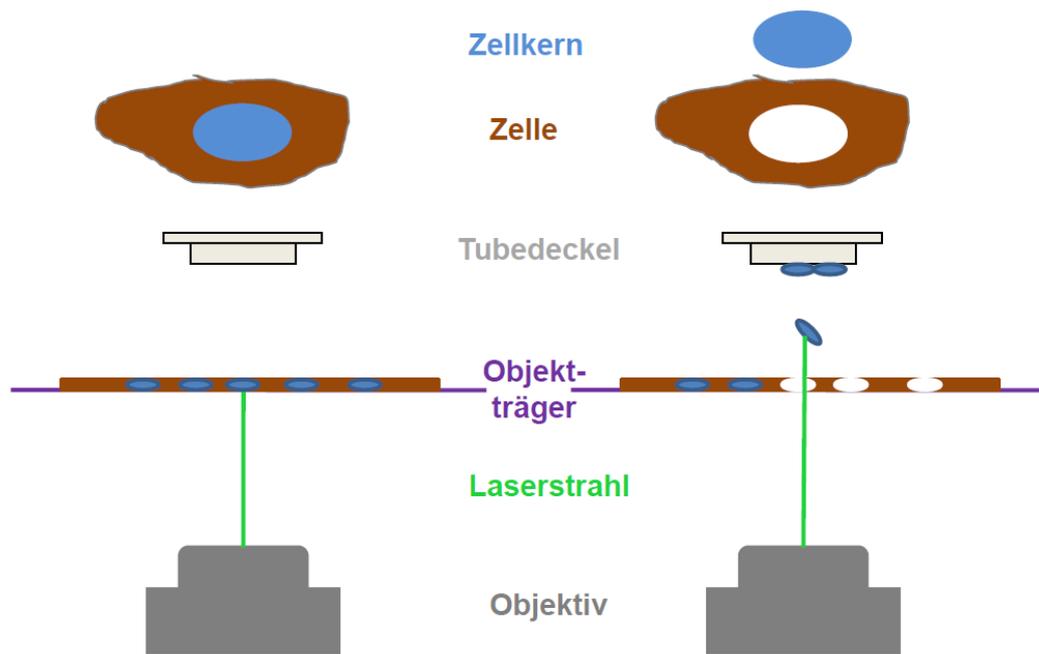


Abbildung 14: Schematische Darstellung des Palm *Micro-Beam-Systems*.

2.3.1.1. Vorbereitung des Reaktionsgefäßes

Als Reaktionsgefäß werden PCR-Tubes (0,2 ml) mit einem flachen Deckel verwendet. Die Innenseite wird mit in einer Pipettenspitze aufgezogenem Mineralöl (Sigma) dünn benetzt. Anschließend wird der Deckel vom übrigen Gefäß abgetrennt und in eine Haltevorrichtung direkt über dem Objektträger angebracht. Er sollte möglichst nah an das Gewebe herangeführt werden ohne es zu berühren, damit eine Kontamination mit unerwünschten Zellen vermieden wird. Der Abstand sollte nicht zu groß sein, da sonst die Zellen nicht in den Deckel katapultiert werden können.

2.3.1.2. Markieren der Zellen

Das Mikroskop mit dem integrierten Laser besitzt eine Videokamera an der ein Monitor angeschlossen ist. Auf diesem ist der eingelegte Schnitt in der jeweiligen Vergrößerung „live“ zu sehen. Die gewünschten immunhistochemisch gefärbten Zellen werden mit Hilfe der Software per Mausklick markiert (Abb. 15). Der Zielpunkt für den Laser wird möglichst exakt auf den Zellkern platziert, da dieser die zu analysierende DNA enthält (Abb. 16). Auf diese Weise können beliebig viele Zellen für das anschließende Katapultieren markiert werden.

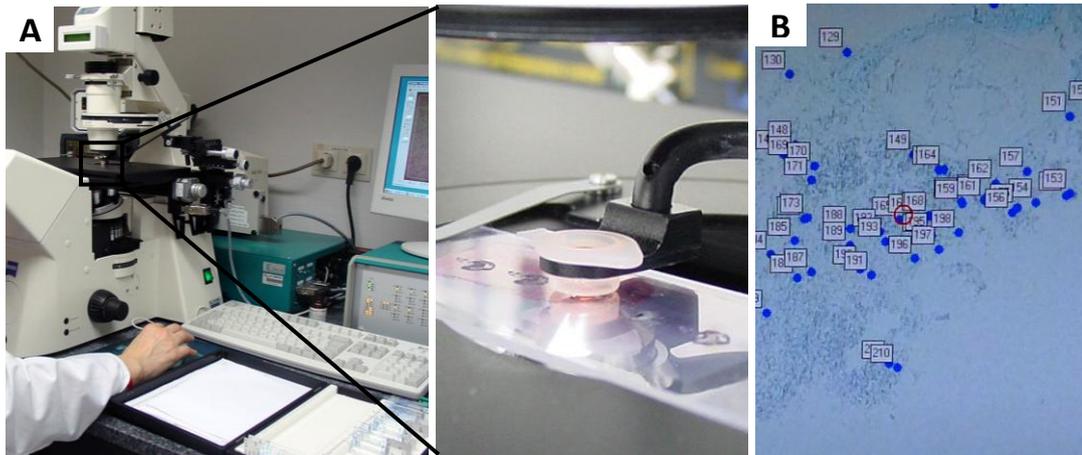


Abbildung 15: Ablauf der Mikrodissektion. Das Mikroskop mit dem integrierten Laser ist an einen Monitor angeschlossen. Der Deckel eines PCR-Tubes wird in der Halterung oberhalb des Objektträgers angebracht (A). Die gewünschten Zellen werden am Bildschirm mit Hilfe der Software per Mausklick markiert (B).

2.3.1.3. Katapultieren der Zellen

Wird der Laser aktiviert, trifft dieser aufgrund der inversen Optik des Mikroskops von unten auf das Gewebe. Die markierten Zellen werden mitsamt ihrer Kerne mittels eines kurzen Impulses UV-Lichts (337 nm) einzeln aus dem Gewebeverband gelöst und direkt in den Deckel des Reaktionsgefäßes katapultiert, in welchem sie an einem dünnen Ölfilm haften bleiben. Mit Hilfe der Optik des Mikroskops wird der Fokus des Lasers so eingestellt, dass er direkt unter dem Objektträger ausgerichtet ist. Der Brennpunkt des Lasers liegt daher außerhalb des Gewebes und ermöglicht kontaktfreies – und die DNA schonendes – "Herauskatapultieren" von Zellen aus einem Gewebeschnitt. Die Methode wird aufgrund dieser Besonderheit als *Laser Pressure Catapulting* bezeichnet. Um genügend DNA für die anschließende Amplifikation und Schmelzpunktanalyse zu erhalten, werden bis zu 1000 Zellen pro Zelltyp in den Deckel eines PCR-Gefäßes katapultiert. Anschließend wird der Deckel wieder auf das dazugehörige Reaktionsgefäß gesetzt. Zu jeder Patientenprobe und jeder Doppelfärbung wird ein Kontrollsample angefertigt, bei dem lediglich der Deckel mit Öl benetzt wurde, ohne jedoch Zellen hinein zu katapultieren. Das Kontrollsample wird allen weiteren Analyseprozeduren unterzogen.

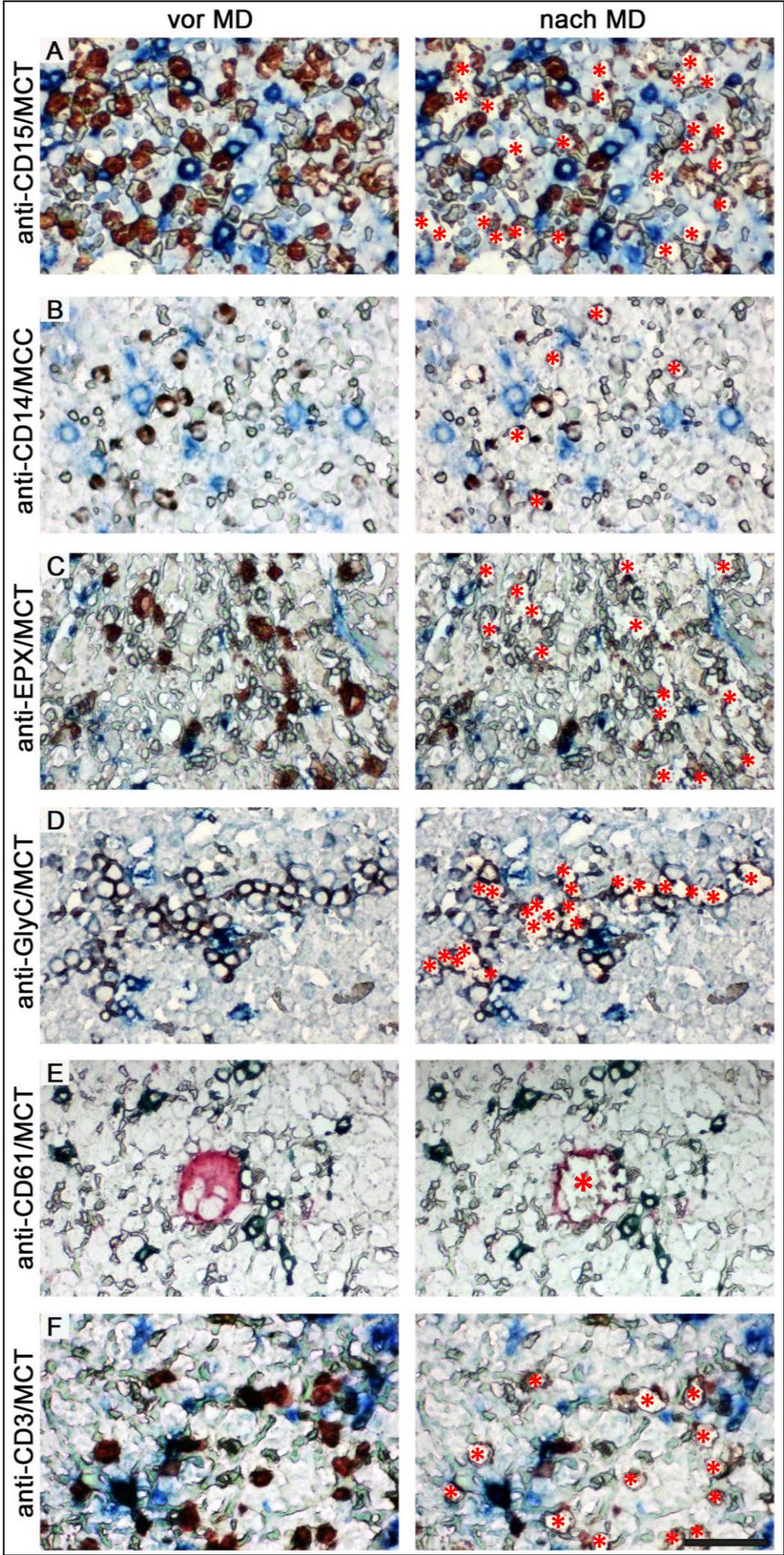


Abbildung 16: Mikrodissektion von Knochenmarkszellen. Auf den linken Abbildungen ist der Zustand vor der Mikrodissektion (MD), auf der rechten Seite der Zustand nach der Mikrodissektion dargestellt. * = mikrodissektierte Zellen, MCT= Mastzelltryptase, MCC= Mastzellchymase, EPX= eosinophile Peroxidase. Maßstab: 50 µm.

2.3.2. Probenverarbeitung und Proteinase K-Verdau

Um die DNA der mikrodissektierten Zellen auf *KIT* Mutationen im Codon 816 untersuchen zu können, wird die entsprechende *hot-spot* Region amplifiziert. Dies setzt eine Lyse der Zellproteine und insbesondere die Trennung der DNA von Histonproteinen voraus, sodass der zu amplifizierende DNA-Abschnitt während der PCR frei zugänglich ist. Die an den Deckeln der Reaktionsgefäße in dem aufgetragenen Ölfilm haftenden Zellen werden mit 9 µl TE-Puffer (50 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8,4) mit 0,5% Tween 20 (Merck) im Deckel vermischt und bei 97°C denaturiert und anschließend abzentrifugiert. Im nächsten Schritt werden die Proben mit 5 µl Proteinase K (> 318 mAU/ml, Quiagen) im Thermocycler für 12 Stunden bei 55°C verdaut. Die Proteinase K wird abschließend durch 5-minütiges Erhitzen auf 95°C inaktiviert.

2.3.3. Amplifikation der DNA aus mikrodissektierten Zellen

Die aufbereitete DNA der mikrodissektierten Zellen wird gleichmäßig auf vier PCR-Tubes aufgeteilt, jeweils die DNA von ca. 250 Zellen enthaltend. Nach Amplifikation liegen von jeder Probe vier Ergebnisse vor, welche zur Auswertung herangezogen werden können. Die Amplifikation der DNA erfolgt mittels einer *semi-nested* PCR, wie bereits in Kap. III 2.2.4. beschrieben mit folgendem ersten PCR-Ansatz ohne LNA:

- 2,5 µl 10xBuffer
- 0,2 µl dNTPs
- je 1 µl Primer *KIT* 1F und Primer *KIT* 2B
- 0,1 µl Taq Polymerase
- 3 µl DNA oder 2 µl HMC-1.2 DNA (Positivkontrolle) oder 3 µl ddH₂O (Negativkontrolle)

mit ddH₂O auf 25 µl auffüllen.

2.3.4. Auswertung der Ergebnisse der mikrodissektierten Zellen

Eine Zellreihe wird als mutiert gewertet, wenn die Mutation reproduzierbar darstellbar ist. Dies ist der Fall, wenn in mindestens zwei PCR-Reaktionsgefäßen die Mutation nachgewiesen werden konnte. Bei unklaren Ergebnissen wird die Mikrodissektion wiederholt. Eine Zellreihe gilt als nicht amplifizierbar, wenn auch nach Wiederholung der Mikrodissektion kein Amplifikat (k.A.) erzielt werden kann.

IV. ERGEBNISSE

1. Morphologische Befunde

Insgesamt konnten 50 Fälle mit systemischer Mastozytose und assoziierter klonaler hämatologischer nicht-mastozytärer Neoplasie (SM-AHNMD) analysiert werden. In allen Fällen wurden die Diagnosen unter Anwendung definierter Kriterien basierend auf histomorphologischen, zytomorphologischen, immunhistologischen und molekularpathologischen Analysen sowie unter Berücksichtigung klinischer Parameter gestellt (SWERDLOW *et al.*, 2008).

In den meisten Fällen konnte eine SM bereits histomorphologisch und immunhistochemisch an Paraffinschnitten von Knochenmarksbiopsien diagnostiziert werden. Dabei lagen häufig kompakte Mastzellinfiltrate mit einem hohen Gehalt an spindelförmigen Mastzellen vor und erfüllten damit bereits vollständig die erforderlichen diagnostischen SM Kriterien (ein Hauptkriterium und ein Nebenkriterium) (Abb. 17A,F). Innerhalb der zumeist peritrabekulär gelegenen kompakten Mastzellinfiltrate war das Retikulinfasernetz häufig verdichtet (Abb. 18A). Zum Anfärben der Retikulinfasern nutzt man ihr argyrophiles Verhalten, sie färben sich mit ammoniakalischer Silbernitrat-Lösung schwarz (Versilberung nach Gomori) (Abb. 18B). Aufgrund spärlich ausgebildeter Granula erschienen die Mastzellen in der Giemsa-Färbung oft dysplastisch und blass (Abb. 18C). Die endgültige Identifizierung als Mastzellen konnte durch Koexpression von Tryptase sowie *KIT* (CD117) (Abb. 17B,C) und der neoplastische Charakter durch Expression von CD25 belegt werden (Abb. 17D). Ein weiterer Marker, der ausschließlich auf neoplastischen Mastzellen im Rahmen einer Mastozytose beobachtet wird, ist CD30 oder auch Ki-1 Antigen genannt (Abb. 3L und 18E). Dieses Antigen wird häufiger und stärker von Mastzellen bei aggressiven SM-Formen, wie einer aggressiven systemischen Mastozytose (ASM) und einer Mastzellenleukämie (MCL) als bei einer indolenten systemischen Mastozytose (ISM) und einem isolierten Befall des Knochenmarks (BMM) exprimiert (SOTLAR *et al.*, 2011). Zusätzliche Lymphozyten- und Eosinophilen-Infiltrate in den und um die Mastzellansammlungen herum konnten als assoziierte Befunde häufig nachgewiesen werden (Abb. 18D).

Die weitere Subtypisierung der SM erfolgte anhand zusätzlicher klinischer und morphologischer Befunde, unter anderem wurden der Mastzellinfiltrationsgrad des Knochenmarks und das Auftreten von *B-* und *C-findings* (Kap. II 3.3.) herangezogen. Bei 41 von 50 Patienten konnten Knochenmarkszytopenien festgestellt werden, sechs Patienten wiesen eine Hepatomegalie mit Funktionsstörung auf, vier Patienten eine Splenomegalie mit Milzüberfunktion und vier Patienten hatten eine Malabsorption mit

Hypoalbuminämie und Gewichtsverlust. 31 von 50 Fällen (62%) wurden daraufhin als ASM gewertet, 17 Fälle (34%) als (indolente) SM und zwei Fälle (4%) als MCL. Auf die Subtypisierung der AHNMD wird in Kapitel IV 3. näher eingegangen, eine Übersicht über die analysierten Fälle gibt Tabelle 7. Im Patientenkollektiv waren 32 Patienten männlich und 16 weiblich, das Durchschnittsalter betrug 65 ± 9 Jahre. Bei 42 von 50 Patienten (84%) konnte eine Anämie hinsichtlich einer erniedrigten Hämoglobinkonzentration im peripheren Blut diagnostiziert werden, bei 30 Patienten zusätzlich aufgrund eines erniedrigten Hämatokritwertes. Eine Leukozytose bestand bei 22 von 50 Patienten (22%), am häufigsten in Form einer Monozytose (16 Patienten), gefolgt von einer Eosinophilie (13 Patienten) und einer Neutrophilie (12 Patienten). Die exakten Diagnosen und weitere Laborparameter der Patienten sind der Tabelle im Anhang 1 zu entnehmen.

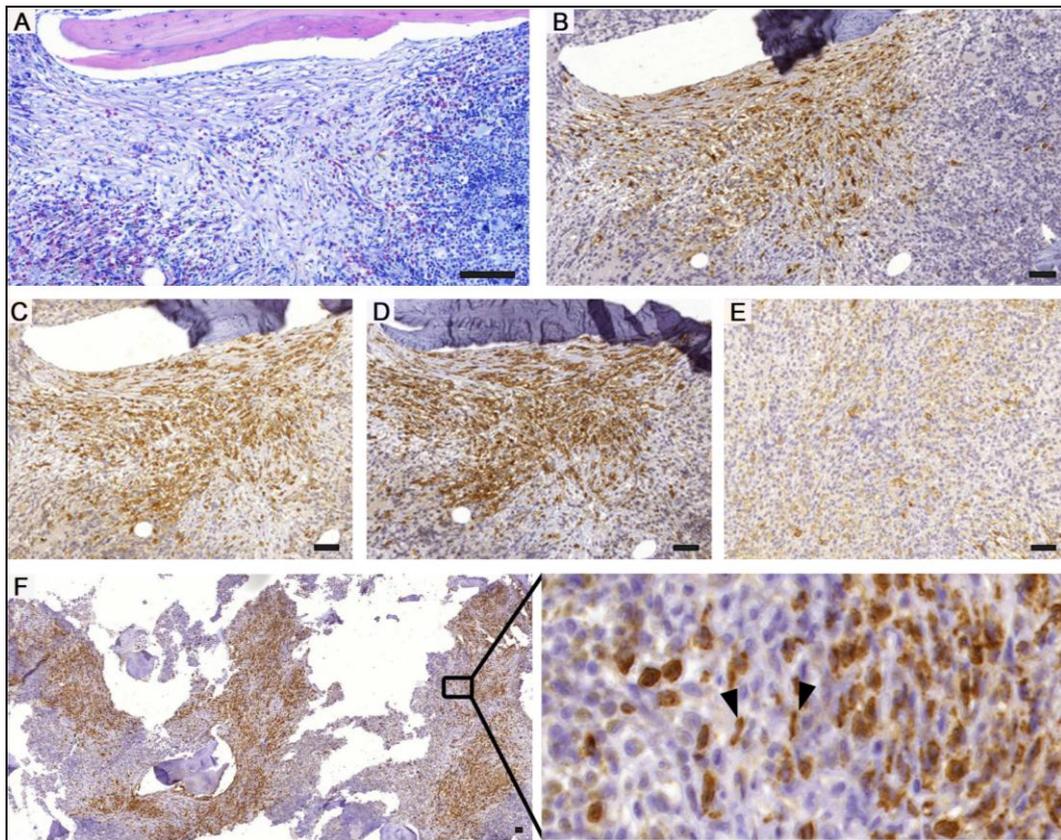


Abbildung 17: Knochenmarksbiopsie mit SM. Giemsa-Färbung, kompaktes Infiltrat neoplastischer Mastzellen (A). Mastzellen koexprimieren die Antigene Tryptase (B) und CD117 (C). Der neoplastische Charakter der Mastzellen zeigt sich in der aberranten Expression von CD25 (D) und CD30 (E). Immunhistochemischer Nachweis der Tryptase, kompakte Mastzellinfiltrate mit hohem Gehalt an spindelförmigen Mastzellen (Pfeil) als weiteres diagnostisches Nebenkriterium (F). Maßstab: 100 μ m.

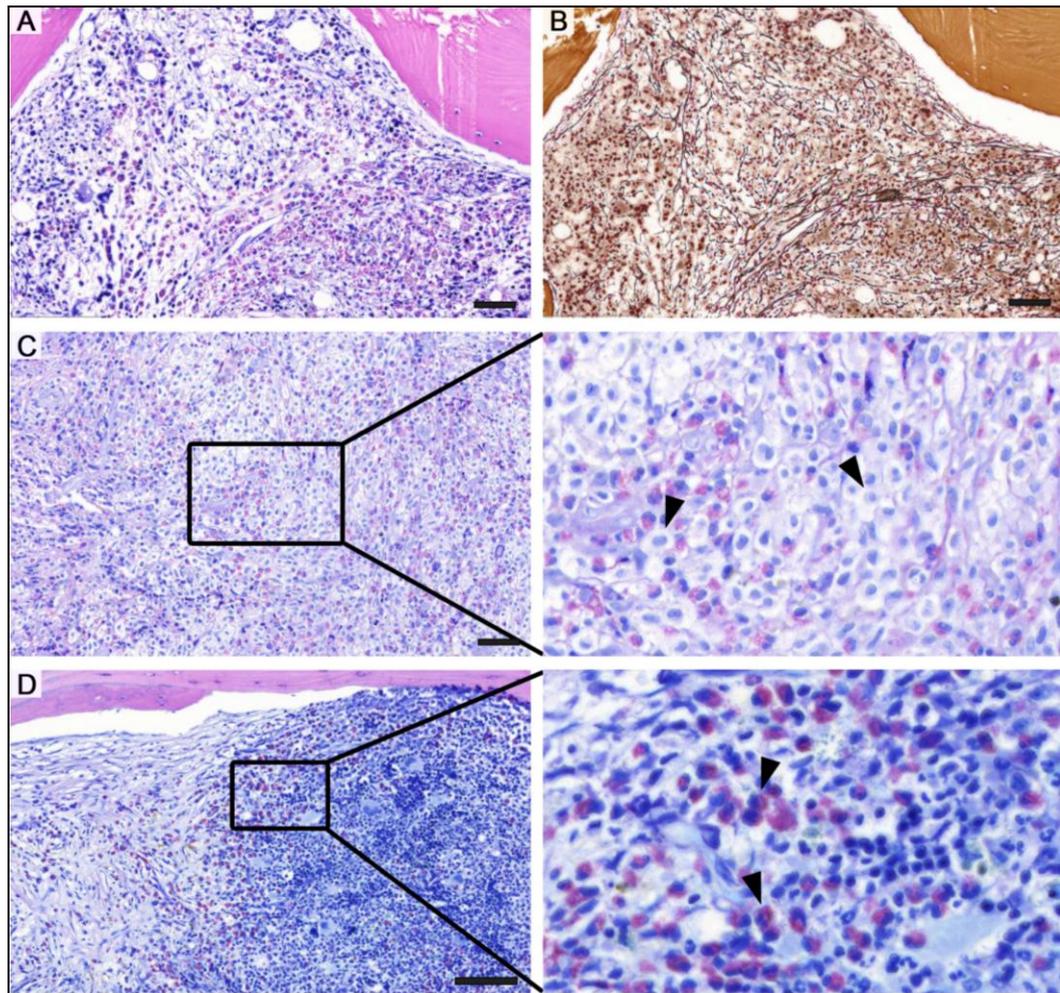


Abbildung 18: Knochenmarksbiopsie mit SM, weitere Befunde. Giemsa-Färbung, paratrabekuläres kompaktes Mastzellinfiltrat mit deutlicher Fibrose (A), wird in der Versilberung nach Gomori bestätigt (Retikulinfasern schwarz) (B). Giemsa-gefärbtes hyperzelluläres Knochenmark, Pfeile zeigen blasse (hypogranulierte) und dysplastisch wirkende Mastzellen (C). Giemsa-Färbung, kompaktes Mastzellinfiltrat mit Eosinophilen-Infiltrate im Randbereich (Pfeil) (D). Maßstab: 100 µm.

Tabelle 7: Übersicht der analysierten AHNMD-Subtypen.

Diagnose	AHNMD-Subtyp	Fälle
SM-MPN	Chronisch eosinophile Leukämie (CEL)	1-5
	Eosinophilie-assoziierte MPN (MPN-Eo)	6
	Unklassifizierte MPN (MPN-U)	7, 8
SM-MPS/MPN	Chronisch myelomomozytäre Leukämie (CMML)	9-32
	Unklassifizierte MDS/MPN (MDS/MPN-U)	33-43
SM-MDS	Refraktäre Zytopenie mit multilineärer Dysplasie (RCMD)	44,46,47
	Refraktäre Anämie mit Ringsideroblasten (RARS)	45
	MDS mit Deletion des Chromosoms 5q (MDS del 5q)	48
SM-AML	Megakaryoblastäre AML (AML-M7)	49
	Sekundäre AML	50

In der Gesamt-DNA konnte eine *KIT* Codon 816 Mutation in der konventionellen PCR in 41 von 50 Fällen (82%), in der LNA-*single* PCR in 46 von 50 (92%) und in der LNA *semi-nested* PCR in 49 von 50 Fällen (98%) detektiert werden (Tab. Anhang 1). Es wurde in 49 von 50 (98%) Fällen die Mutation D816V nachgewiesen (Tab. Anhang 1), in einem Fall (Fall 14 mit ASM-CMML-1) wurde eine andere Mutation im Codon 816 gefunden. Die Schmelzpunktanalyse zeigte hier einen aberranten Peak bei 57°C (Abb. 19B,D), die Sequenzierung nach Sanger erbrachte das Ergebnis der Mutation D816Y (Abb. 20). Diese Mutation basiert auf einer Substitution der Base Guanidin (G) zu Thymin (T) an Position 7177 (GenBank Accession No. L04143). Bei der Proteinbiosynthese kommt es zu einem Aminosäureaustausch von Asparaginsäure gegen Tyrosin im Codon 816 (Asp816Tyr oder D816Y). Beim Vorliegen dieser Mutation kommt es, wie bei der *KIT* D816V Mutation, zu einer SCF-unabhängigen Daueraktivierung der Rezeptortyrosinkinase mit der daraus resultierenden dauerhaften Mastzellaktivierung (LONGLEY *et al.*, 1999) (Kap II.1.5. und Abbildung 2).

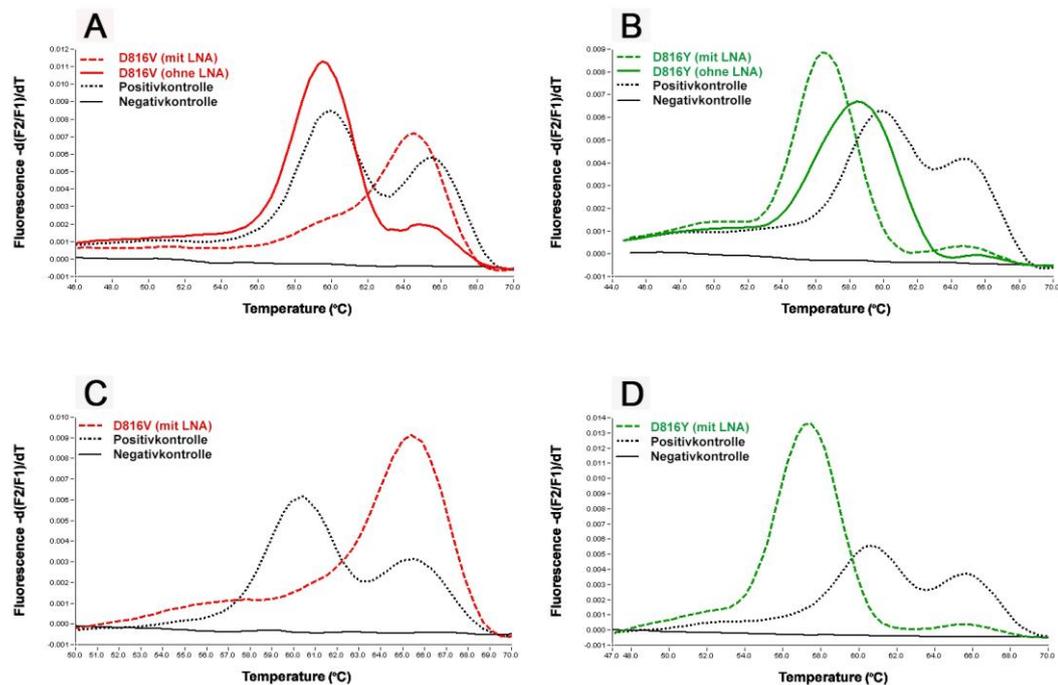


Abbildung 19: Schmelzpunktanalysen nach LNA-*single* PCR (A,B) und LNA *semi-nested* PCR (C,D). Fall 21 (rote Kurven) weist die *KIT* D816V Mutation bei 64° mit (gestrichelt) und ohne (durchgezogen) Einsatz von LNA auf (A,C). Fall 14 (grüne Kurven) weist die *KIT* D816Y Mutation bei 57° mit (gestrichelt) und ohne (durchgezogen) Einsatz von LNA auf (B,D).

MCL. Als AHNMD-Subtyp wurde in 21 der 27 Fälle (78%) MDS/MPN, speziell in 17 Fällen CMML, in vier Fällen (15%) MPN und in zwei Fällen (7%) MDS diagnostiziert.

Bezogen auf die Gesamtzahl aller 50 untersuchten Fälle waren *KIT* Codon 816 Mutationen bei Patienten mit einer ASM in 61% der Fälle (19/31), bei Patienten mit einer (indolenten) SM in 41% der Fälle (7/17) sowie in einem der beiden Patienten mit einer MCL detektierbar. In CD15-positiven neutrophilen Granulozyten waren Mutationen am häufigsten bei Patienten mit SM-CMML (67%) nachweisbar. Vergleichbar häufig gelang der Nachweis bei Patienten mit SM-MPN (50%), Patienten mit SM-MDS/MPN-U (45%) und bei Patienten mit SM-MDS (40%) (Tab. 8). In die aktuelle Studie konnten nur zwei Patienten mit SM und einer assoziierten akuten myeloischen Leukämie (AML) aufgenommen werden, so dass dieses Ergebnis, auch im Hinblick auf in der Literatur publizierte Daten, nicht als repräsentativ für diesen AHNMD-Subtyp zu werten ist. Es wurde in keiner der beiden Patienten mit SM-AML die *KIT*-Mutation in den AML-Blasten gefunden.

In 26 von 27 Fällen (96%) wurde die Mutation D816V gefunden, in einem Fall mit ASM-CMML-1 (Fall 14) konnte in neutrophilen Granulozyten, sowie in Monozyten, entsprechend dem Befund in der Gesamt-DNA, die Mutationsvariante D816Y nachgewiesen werden.

Tabelle 8: Mutationsfrequenz in CD15-positiven Zellen.

Diagnose	<i>KIT</i> Codon 816 Mutation Neutrophilen	Klonale Assoziation
SM-MPN	4/8 (50%)	Variabel
SM-MDS/MPN	21/35 (60%)	Variabel
CMML	16/24 (67%)	Variabel
MDS/MPN-U	5/11 (45%)	Variabel
SM-MDS	2/5 (40%)	Variabel
SM-AML	0/2	Nicht klonal assoziiert
SM-AHNMD	27/50 (54%)	

Bei der Analyse CD15-positiver neutrophiler Granulozyten wurde in 23 von 50 Fällen (42%) die *KIT* Wildtypsequenz nachgewiesen, bei der SM-Komponente handelte es sich in 12 der 23 Fälle (52%) um eine ASM, in 10 Fällen (43%) um eine (indolente) SM und in einem Fall (4%) um eine MCL. Der AHNMD-Subtyp war in 14 der 23 Fälle (61%) MDS/MPN, in vier Fällen (17%) MPN, in drei Fällen (13%) MDS und in zwei Fällen (9%) AML.

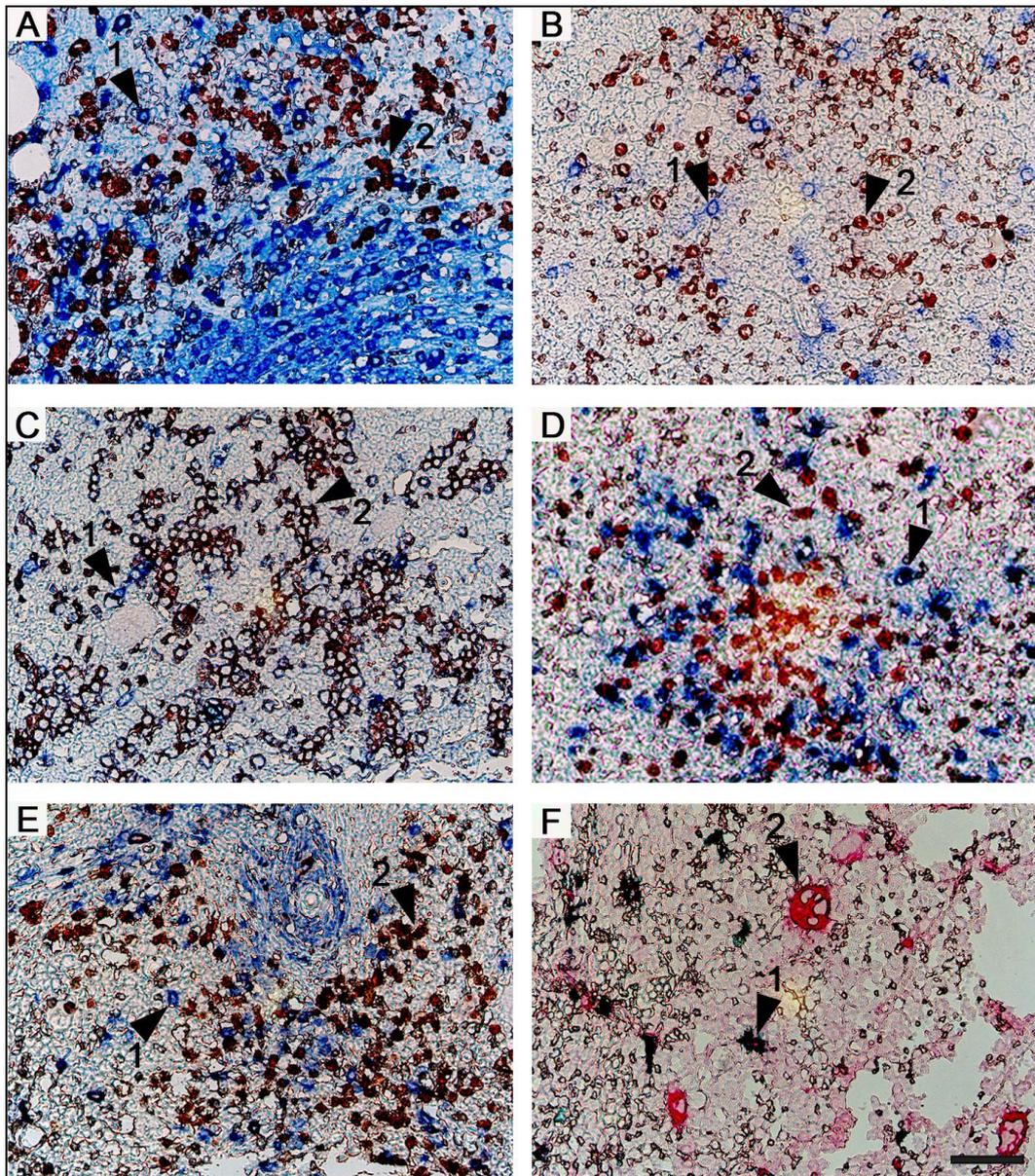


Abbildung 21: Immunhistochemische Doppelmarkierung an Knochenmarksbiopsien. Pfeil 1 markiert Mastzelltryptase (MCT) bzw. Mastzellchymase (MCC) gefärbte Mastzellen blau (A-E) bzw. grün (F). Pfeil 2 markiert anders gefärbte Zellreihe braunrot (A-E) bzw. rot (F). CD15 und MCT Doppelmarkierung von Fall 31 (ASM-CMML-1) (A); CD14 und MCC Doppelmarkierung von Fall 31 (ASM-CMML-1) (B); GlycoC und MCT Doppelmarkierung von Fall 33 (ASM-CMML-1) (C); CD3 und MCT Doppelmarkierung von Fall 43 (SM-MDS/MPN-U) (D); EPX und MCT Doppelmarkierung von Fall 37 (ASM-MDS/MPN-U) (E); CD61 und MCT Doppelmarkierung von Fall 33 (ASM-CMML-1) (F); Maßstab= 40 µm.

2.1. Analyse der Patienten mit SM-MPN

MPNs sind klonale Stammzellstörungen, die durch eine „effektive“ Hämatopoese charakterisiert sind, was diese Erkrankungen von den Myelodysplasien unterscheidet (HARRIS *et al.*, 2000). Bei einer chronisch eosinophilen Leukämie (CEL) kommt es zu einer autonomen, klonalen Proliferation der eosinophilen Vorläuferzellen mit zumeist stark diffuser und teilweise kompakter Infiltration durch vorwiegend reife eosinophile Granulozyten (Abb. 22A,B). Die Zahl der Megakaryozyten- und Erythroblastennester lagen meist im Normalbereich, geringe Atypien und/oder Hypoplasie der Megakaryozyten kamen vor. Einzelne Fälle wiesen ein stark verdichtetes Retikulinfasernetz auf (Abb. 22C,D). Die eosinophilie-assoziierte myeloproliferative Erkrankung (MPN-Eo) unterscheidet sich von der CEL laut WHO-Definition lediglich aufgrund des Nachweises einer zytogenetischen Anomalie meist im *Platelet-derived growth factor receptor* (PDGF-R) (SWERDLOW *et al.*, 2008; SOTLAR *et al.*, 2012). In der Regel kommt es zu einer Deletion des CHIC2 Gens und einer daraus folgenden FIP1L1-PDGFRA Fusion (LAMBERT *et al.*, 2007). Unklassifizierte myeloproliferative Neoplasien (MPN-U) erfüllen die klinischen, labordiagnostischen und morphologischen Kriterien einer MPN, lassen sich aber keiner spezifischeren MPN zuordnen.

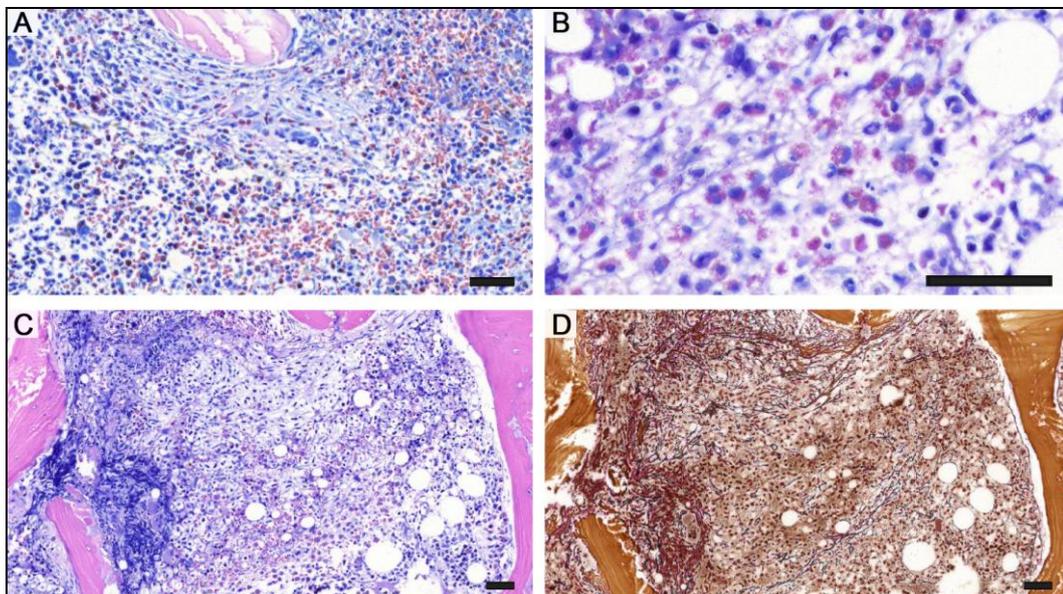


Abbildung 22: Knochenmarksbiopsie mit ASM-CEL, Fall 3 (A,B), Fall 2 (C,D). Giemsa-Färbung, diffuse Vermehrung atypischer eosinophiler Granulozyten (A,B). Giemsa-Färbung, kompaktes Mastzellinfiltrat mit stark verdichtetem Retikulinfasernetz (C). Die Retikulinfasern färben sich in der Versilberung nach Gomori schwarz (D).

Acht der 50 untersuchten Fälle stammten aus der Gruppe MPN. Als assoziierte Neoplasie wurde in fünf Fällen eine CEL diagnostiziert und in einem Fall eine MPN-Eo. In zwei Fällen war die myeloproliferative Neoplasie nicht weiter zu bestimmen, so dass eine SM-MPN-U diagnostiziert wurde (Tab. Anhang 1).

Tabelle 9: Mikrodissektionsergebnisse der Fälle mit SM-MPN.

Fall	Diagnose	NG	EG	Epz	Mk	T-Zellen
1	ASM-CEL (Abb. 23)	wt	wt	wt	wt	wt
2	ASM-CEL	wt	wt	wt	wt	wt
3	ASM-CEL	D816V	D816V	D816V	n.u.	wt
4	SM-CEL	wt	wt	wt	wt	wt
5	SM-CEL	D816V	D816V	D816V	k.A.	wt
6	ASM-MPN-Eo (Abb. 24)	D816V	wt	wt	wt	wt
7	SM-MPN-U	D816V	n.u.	n.u.	n.u.	D816V
8	SM-MPN-U	wt	wt	wt	wt	wt
$\Sigma=8$	SM-MPN	4/8	2/7	2/7	0/5	1/8

NG= neutrophile Granulozyten, EG= eosinophile Granulozyten, Epz= Erythroblasten, Mk= Megakaryozyten, wt= Wildtyp, n.u. = nicht untersucht, k.A. = keine Amplifikation.

In vier der acht Fälle konnte die Mutation D816V in CD15-positiven neutrophilen Granulozyten nachgewiesen werden. In den anderen vier Fällen konnte in allen untersuchten Zellreihen der Wildtyp detektiert werden (Abb. 23). Der Nachweis der Mutation in den neoplastischen EPX-positiven eosinophilen Granulozyten gelang nur in zwei von sieben Fällen. Bei Fall 6 (ASM-MPN-Eo) fand sich die Mutation nur in CD15-positiven Zellen, interessanterweise jedoch nicht in EPX-positiven Eosinophilen und auch nicht in Zellen der Erythropoese (GlycoC+), der Megakaryopoese (CD61+) und in T-Lymphozyten (CD3+) (Tab. 9 und Abb. 24).

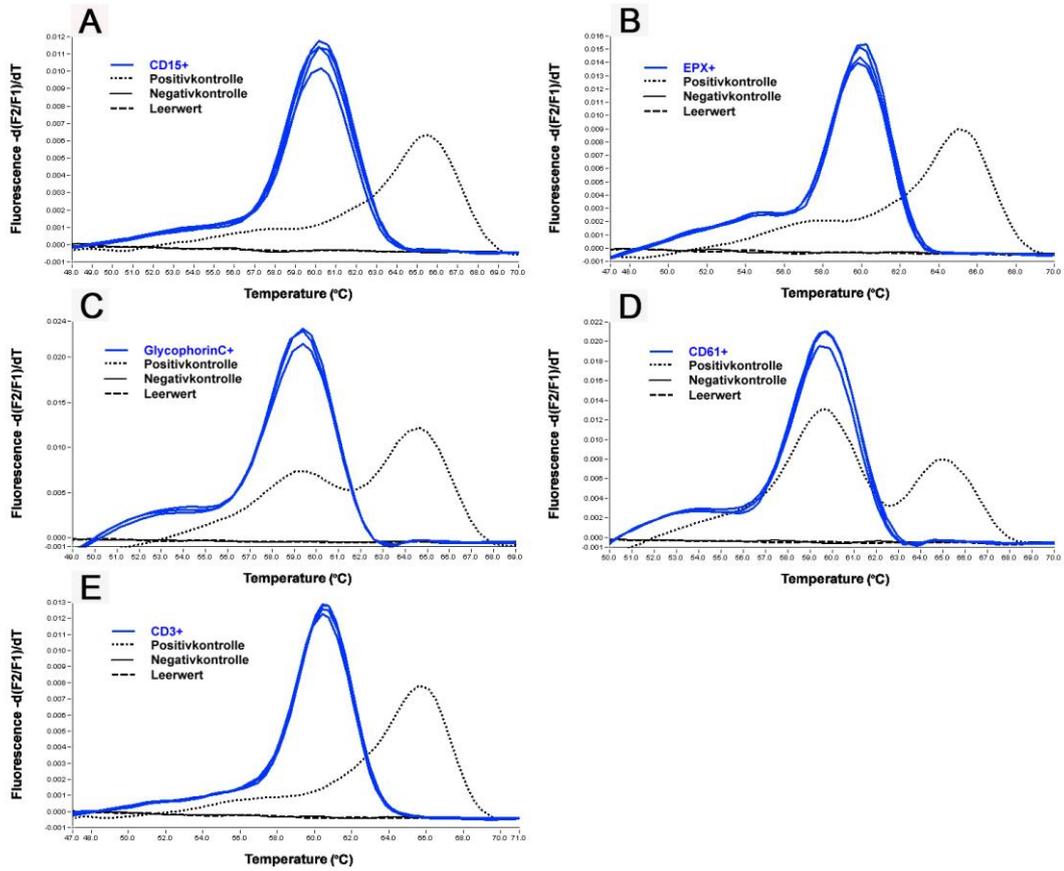


Abbildung 23: ASM-CEL, Fall 1, Ergebnis der Schmelzpunktanalyse. In den CD15-positiven Neutrophilen und EPX-positiven Eosinophilen (**A,B**), sowie den anderen untersuchten hämatopoetischen Zellreihen (GlycoC+, CD61+, CD3+) (**C,D,E**) konnte der Wildtyp detektiert werden.

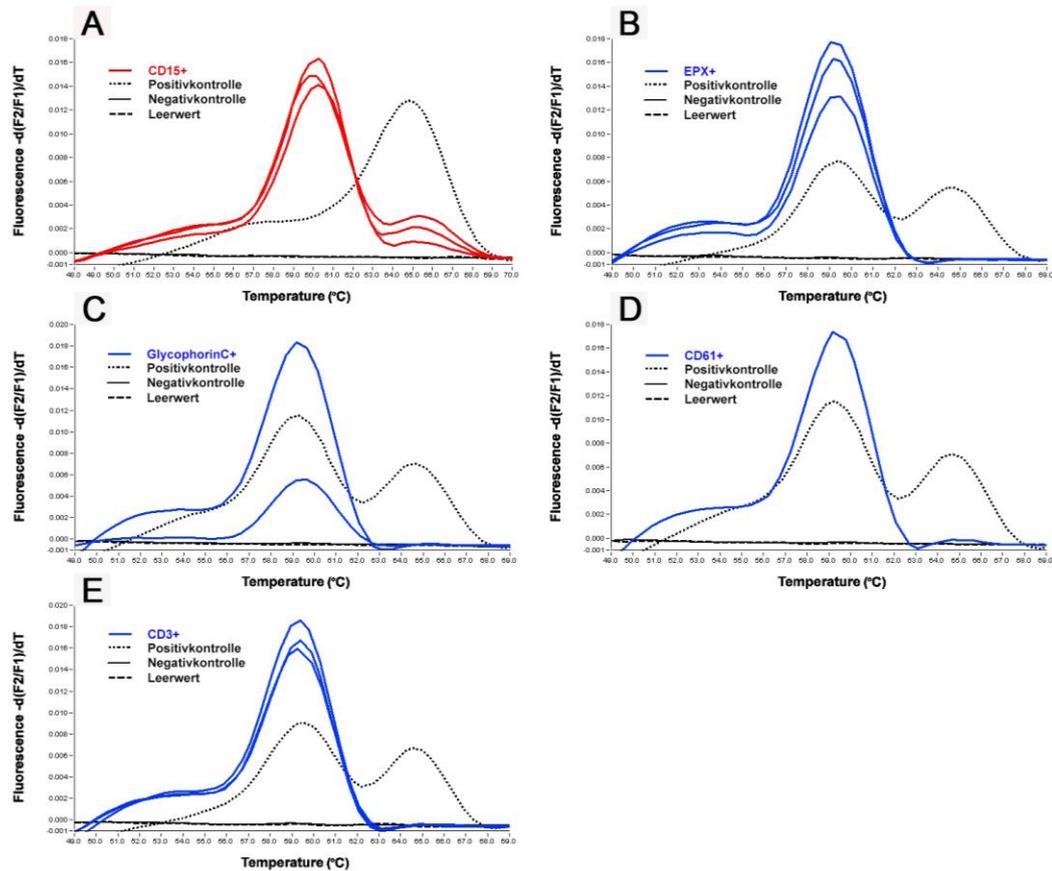


Abbildung 24: ASM-MPN-Eo, Fall 6, Ergebnis der Schmelzpunktanalyse Die *KIT* D816V Mutation konnte nur in Neutrophilen (CD15+) (A) nachgewiesen werden, in den anderen Zellreihen (B-E) fand sich der Wildtyp.

2.2. Analyse der Patienten mit SM-MDS/MPN

MDS/MPN sind eine Gruppe maligner hämatologischer Erkrankungen, die sowohl Merkmale einer myeloproliferativen, als auch einer myelodysplastischen Neoplasie aufweisen. Insgesamt fielen 35 Fälle dieser Studie in diese Gruppe. Auf dem Boden der morphologischen und hämatologischen Parameter (Blutmonozytose $> 1 \times 10^9/l$, $< 20\%$ Blasten in peripherem Blut und Knochenmark und Dysplasie in einer oder mehreren myeloischen Zellreihen) wurden 24 Fälle als CMML klassifiziert. In den übrigen 11 Fällen war die AHNMD nicht näher zu typisieren, somit wurden diese als unklassifizierte MDS/MPN (MDS/MPN-U) gewertet (Tab. Anhang 1). Eine CMML wird in Abhängigkeit von der Blastenzahl weiter unterteilt in eine CMML-1 (5-9% Blasten) und eine CMML-2 (10-19% Blasten) (SWERDLOW *et al.*, 2008). Eine Proliferation von Monozyten ließ sich auch histomorphologisch durch einen erhöhten Gehalt an CD14 positiven-Zellen im hyperzellulären Knochenmark nachweisen (Abb. 25A,B). Die meist reifen Monozyten wiesen eine unauffällige Morphologie auf, zeigten aber häufig eine abnorme Granulation oder eine atypische Kernlappung. Dysplastische Veränderungen im Knochenmark konnten unter anderem durch den Nachweis von CD61 positiven Mikromegakaryozyten oder Megakaryozyten mit atypisch gelappten Zellkernen bestätigt

werden (Abb. 25C,D).

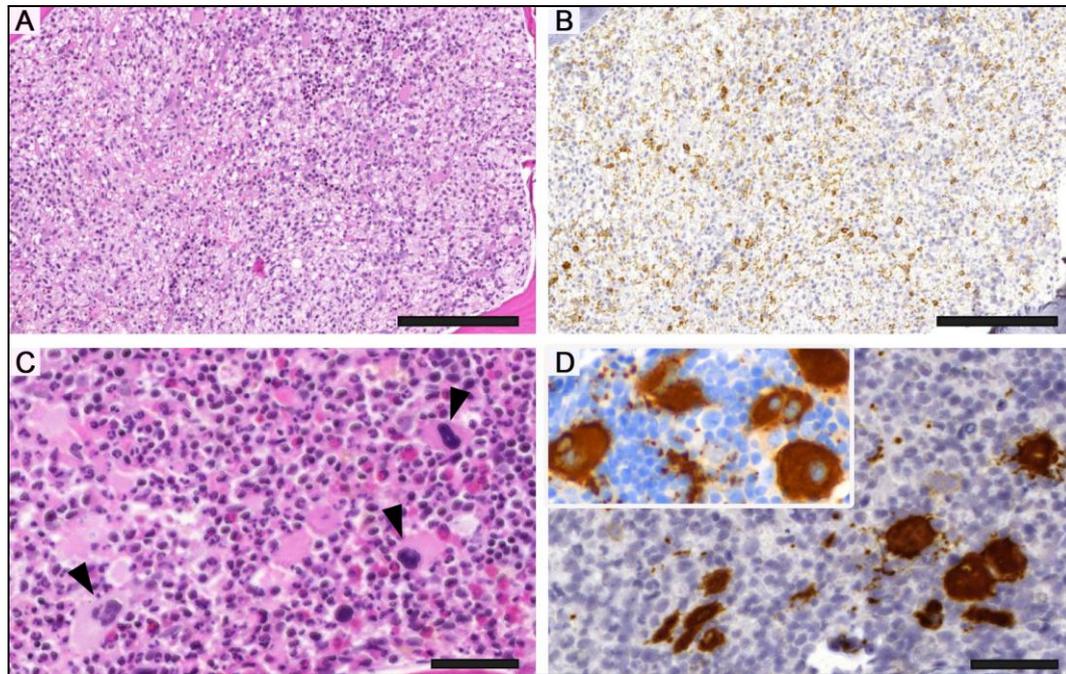


Abbildung 25: Knochenmarksbiopsie mit MCL-CMML-1, Fall 22 (A,B), Fall 44 (C,D). HE-gefärbtes hyperzelluläres Knochenmark mit Proliferation der Monozyten (A), bestätigt durch erhöhte Expression von CD14 (B). HE-Färbung, Pfeile zeigen kleine, teils hyperchromatische Megakaryozyten (C). CD61-Färbung, Bestätigung polymorpher Megakaryozyten mit atypisch gelappten Zellkernen, das Inset zeigt physiologische Megakaryozyten (D).

Die Mutationshäufigkeit bei SM-MDS/MPN erwies sich in den unterschiedlichen Knochenmarkszellen als sehr heterogen. In den myeloischen Zellreihen konnte eine Mutation im Codon 816 in neutrophilen Granulozyten (CD15+) in 21 von 35 Fällen (60%) gefunden werden, in den neoplastischen Monozyten (CD14+) in 13 von 19 Fällen (68%), in eosinophilen Granulozyten (EPX+) in 12 von 22 Fällen (55%), in Erythroblasten (GlycoC+) in 12 von 23 Fällen (52%) und in Megakaryozyten (CD61+) in drei von neun Fällen (33%). In T-Lymphozyten (CD3+) konnte die Mutation in lediglich zwei von 31 Fällen (6%) nachgewiesen werden (Tab. 10).

Tabelle 10: Mikrodissektionsergebnisse der Fälle mit SM-MDS/MPN.

Fall	Diagnose	NG	M	EG	Epz	Mk	T-Zellen
9	ASM-CMML-1	D816V	D816V	k.A.	wt	k.A.	wt
10	ASM-CMML-1 (Abb. 26)	D816V	D816V	wt	wt	k.A.	wt
11	ASM-CMML-1	D816V	D816V	D816V	wt	n.u.	wt
12	ASM-CMML-1	D816V	n.u.	D816V	D816V	k.A.	wt
13	ASM-CMML-1	D816V	n.u.	wt	D816V	k.A.	wt
14	ASM-CMML-1 (Abb. 27)	D816Y	D816Y	wt	D816Y	D816Y	D816Y
15	ASM-CMML-1	D816V	D816V	D816V	D816V	k.A.	wt
16	SM-CMML-1	D816V	D816V	D816V	D816V	n.u.	D816V
17	SM-CMML-1	wt	n.u.	n.u.	wt	wt	wt
18	SM-CMML-1	D816V	D816V	D816V	k.A.	k.A.	wt
19	ASM-CMML-2	D816V	D816V	D816V	D816V	n.u.	wt
20	ASM-CMML-1	wt	wt	n.u.	n.u.	n.u.	wt
21	ASM-CMML-1	D816V	D816V	wt	wt	k.A.	wt
22	MCL-CMML-1	D816V	D816V	D816V	D816V	n.u.	wt
23	ASM-CMML-1	wt	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.
24	MCL-CMML-2	wt	n.u.	n.u.	k.A.	k.A.	wt
25	ASM-CMML-1	wt	wt	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.
26	SM-CMML-2	wt	wt	wt	wt	wt	wt
27	SM-CMML-1	wt	wt	wt	k.A.	k.A.	wt
28	SM-CMML-1	wt	n.u.	n.u.	wt	wt	wt
29	ASM-CMML-1	D816V	n.u.	D816V	k.A.	wt	wt
30	ASM-CMML-1 (Abb. 28)	D816V	D816V	D816V	D816V	D816V	wt
31	ISM-CMML-1	D816V	D816V	D816V	D816V	k.A.	wt
32	ASM-CMML-1	D816V	D816V	wt	D816V	k.A.	wt
Σ24	SM-CMML	16/24	13/17	10/17	10/17	2/6	2/22
33	ASM-MDS/MPN-U	wt	wt	wt	wt	n.u.	wt
34	ASM-MDS/MPN-U	D816V	n.u.	n.u.	D816V	n.u.	wt
35	ASM-MDS/MPN-U	wt	wt	n.u.	n.u.	n.u.	wt
36	ASM-MDS/MPN-U	wt	n.u.	wt	wt	wt	wt
37	ASM-MDS/MPN-U	wt	n.u.	wt	n.u.	n.u.	wt
38	SM-MDS/MPN-U (Abb. 29)	D816V	n.u.	D816V	D816V	D816V	wt
39	ASM-MDS/MPN-U	D816V	n.u.	D816V	wt	wt	wt
40	SM-MDS/MPN-U	wt	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.
41	ASM-MDS/MPN-U	D816V	n.u.	n.u.	k.A.	k.A.	wt
42	ASM-MDS/MPN-U	D816V	n.u.	k.A.	k.A.	n.u.	k.A.
43	SM-MDS/MPN-U	wt	n.u.	n.u.	wt	n.u.	wt
Σ=11	SM-MDS/MPN-U	5/11	0/2	2/5	2/6	1/3	0/9
Σ=35	SM-MDS/MPN	21/35	13/19	12/22	12/23	3/9	2/31

NG= neutrophile Granulozyten, M= Monozyten, EG= eosinophile Granulozyten, Epz= Erythroblasten, Mk= Megakaryozyten, wt= Wildtyp, n.u. = nicht untersucht, k.A. = keine Amplifikation.

In drei von 35 Fällen (9%) (Fall 9, 10 und 21) konnte eine Mutation im Codon 816 nur in den CD15-positiven neutrophilen Granulozyten und den CD14-positiven Monozyten nachgewiesen werden, die anderen untersuchten Zellreihen (EPX+, GlycoC+ und CD3+) wiesen den Wildtyp auf (Tab. 10). In Fall 10 konnte die Mutation in CD14 positiven Monozyten erst nach Wiederholung der Mikrodissektion bestätigt werden (Abb. 26).

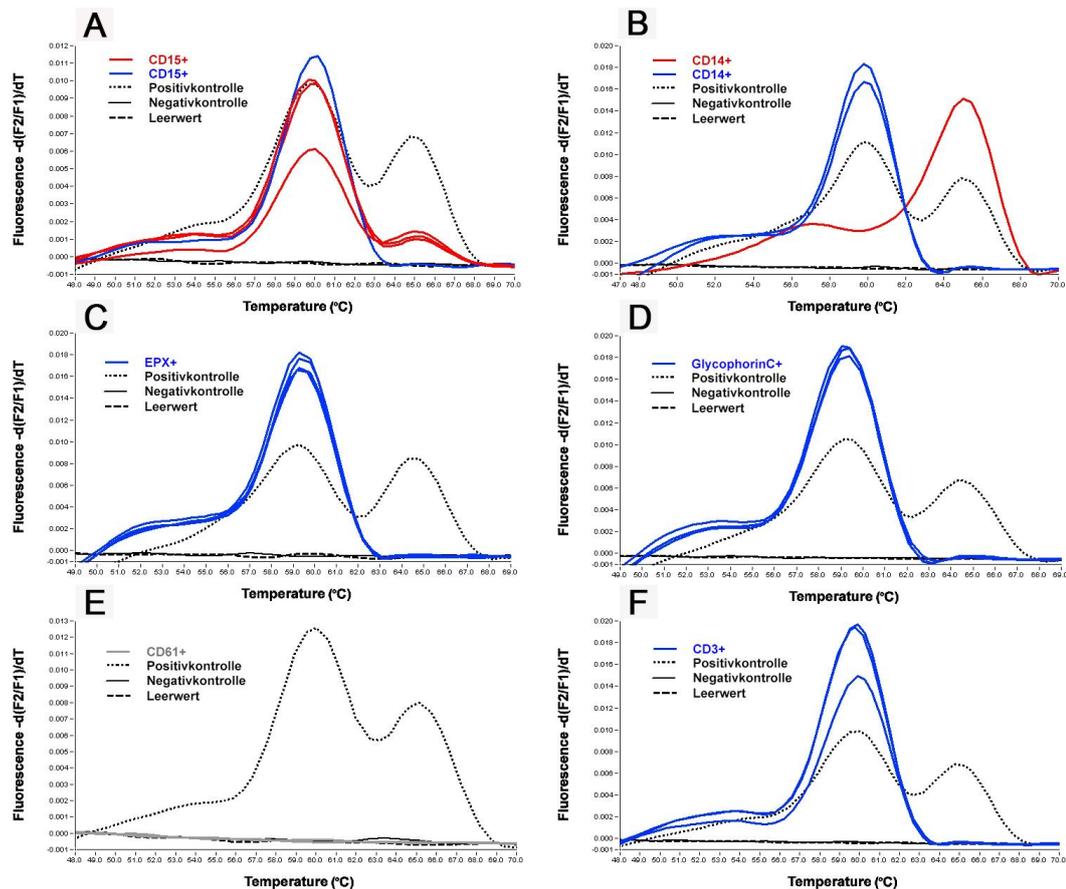


Abbildung 26: ASM-CMML-1, Fall 10, Ergebnis der Schmelzpunktanalyse. In diesem Fall waren die neutrophile Granulozyten (CD15+) (A) und Monozyten (CD14+) (B) mutiert, in eosinophilen Granulozyten (EPX+) (C), Erythroblasten (GlycoC+) (D) und den T-Lymphozyten (CD3+) (F), fand sich der Wildtyp. Die Amplifikation der mikrodisssektierten Megakaryozyten (CD61+) (E) ergab keine Amplifikation.

In Fall 14 (ASM-CMML-1) konnte die Mutationsvariante D816Y in allen myeloischen Zellreihen (CD15+, CD14+, GlycoC+ und CD61+) und sogar in lymphatischen Zellen (CD3+) detektiert werden. Überraschenderweise gelang dies nicht in Eosinophile (EPX+) (Tab. 10 und Abb. 27). In zwei weiteren Fällen (Fall 13 und 32) konnte eine *KIT* Codon 816 Mutation ebenfalls in Erythroblasten (GlycoC+), nicht aber in eosinophilen Granulozyten (EPX+) nachgewiesen werden (Tab. 10).

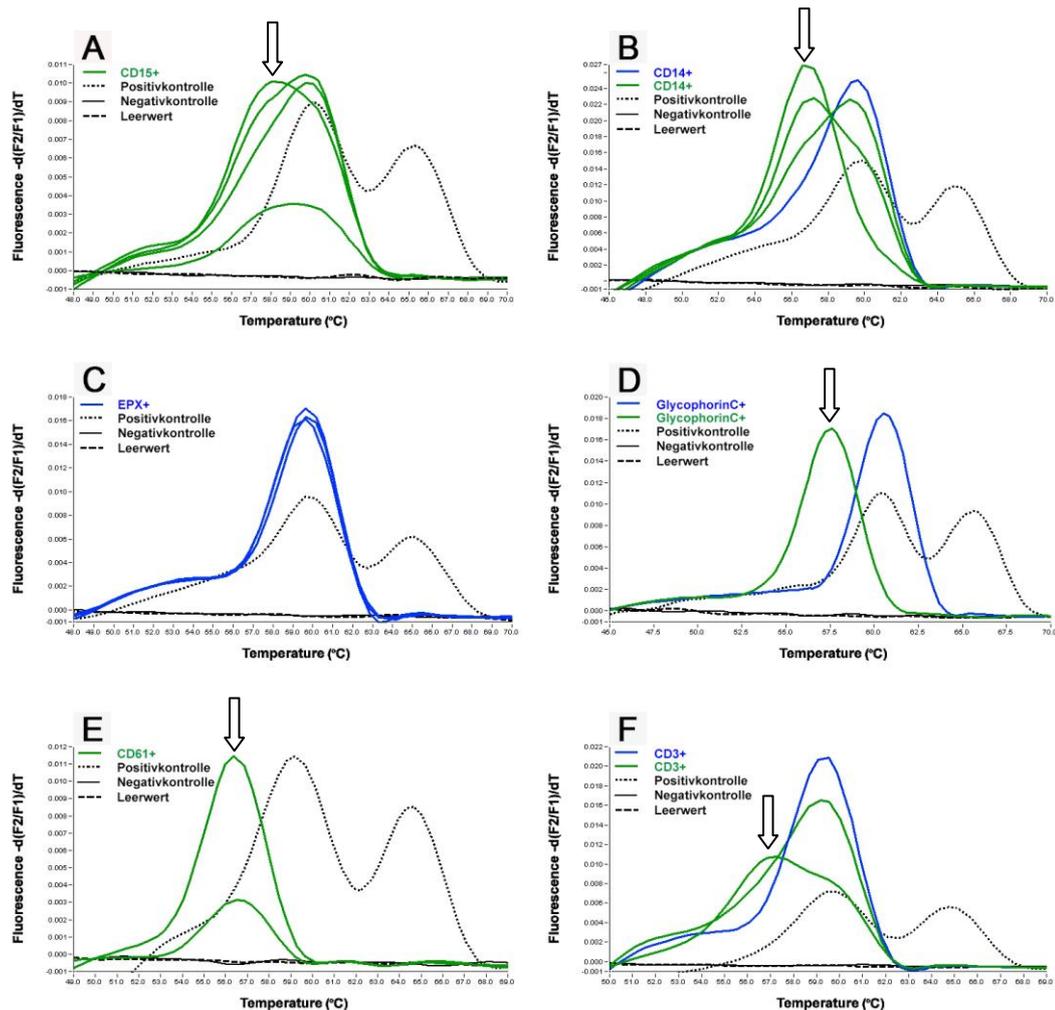


Abbildung 27: ASM-CMML-1, Fall 14, Ergebnis der Schmelzpunktanalyse. In diesem Fall konnte in neutrophilen Granulozyten (CD15+) (A), Monozyten (CD14+) (B), Erythroblasten (GlycoC+) (D), Megakaryozyten (CD61+) (E) und den T-Lymphozyten (CD3+) (F) ein abnormer Schmelzpunkt bei 56°C (Pfeil) nachgewiesen werden. In eosinophilen Granulozyten (EPX+) (C) wurde der Wildtyp detektiert.

In acht von 35 Fällen (23%) fand sich eine *KIT* Codon 816 Mutation in allen untersuchten myeloischen Zellen, konnte aber nicht in den lymphatischen Zellen nachgewiesen werden (Tab. 10 und Abb. 28 und 29).

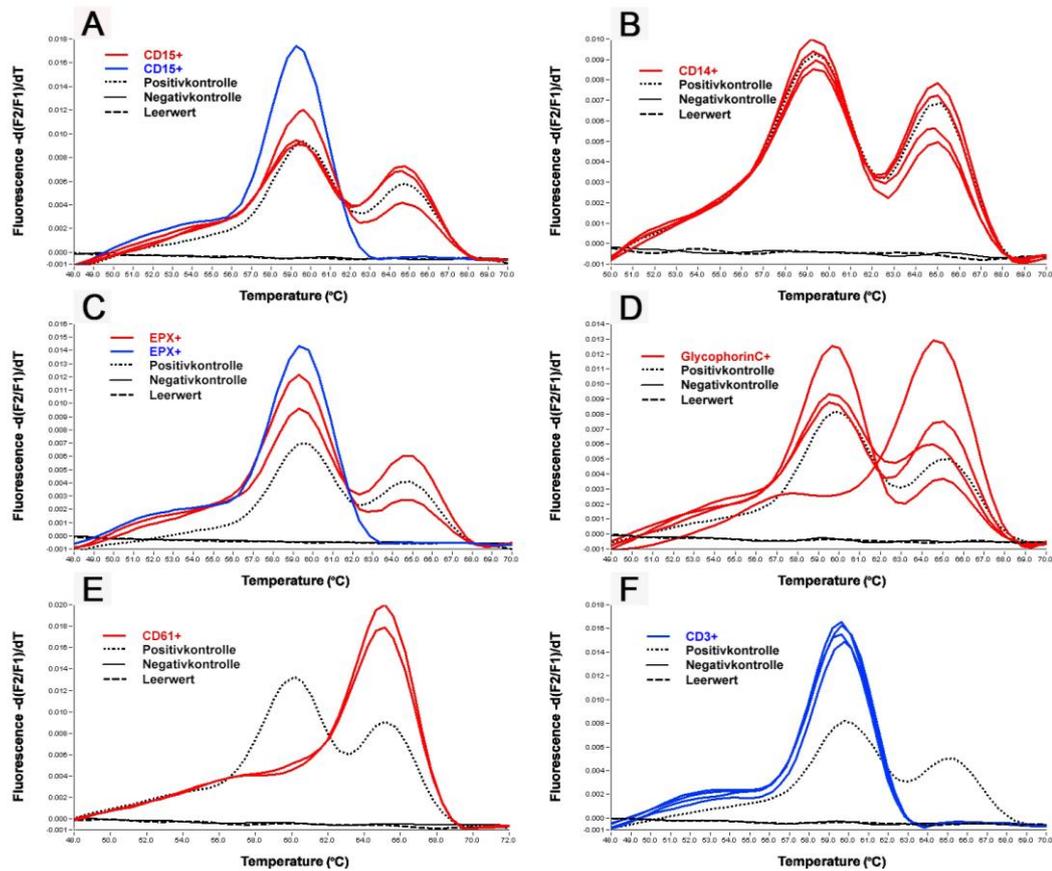


Abbildung 28: ASM-CMML-1, Fall 30, Ergebnis der Schmelzpunktanalyse. Die *KIT* D816V Mutation konnte in neutrophilen Granulozyten (CD15+) (A), Monozyten (CD14+) (B), eosinophilen Granulozyten (EPX+) (C), Erythroblasten (GlycoC+) (D) und Megakaryozyten (CD61+) (E) nachgewiesen werden. T-Lymphozyten (CD3+) (F) zeigten den Wildtyp.

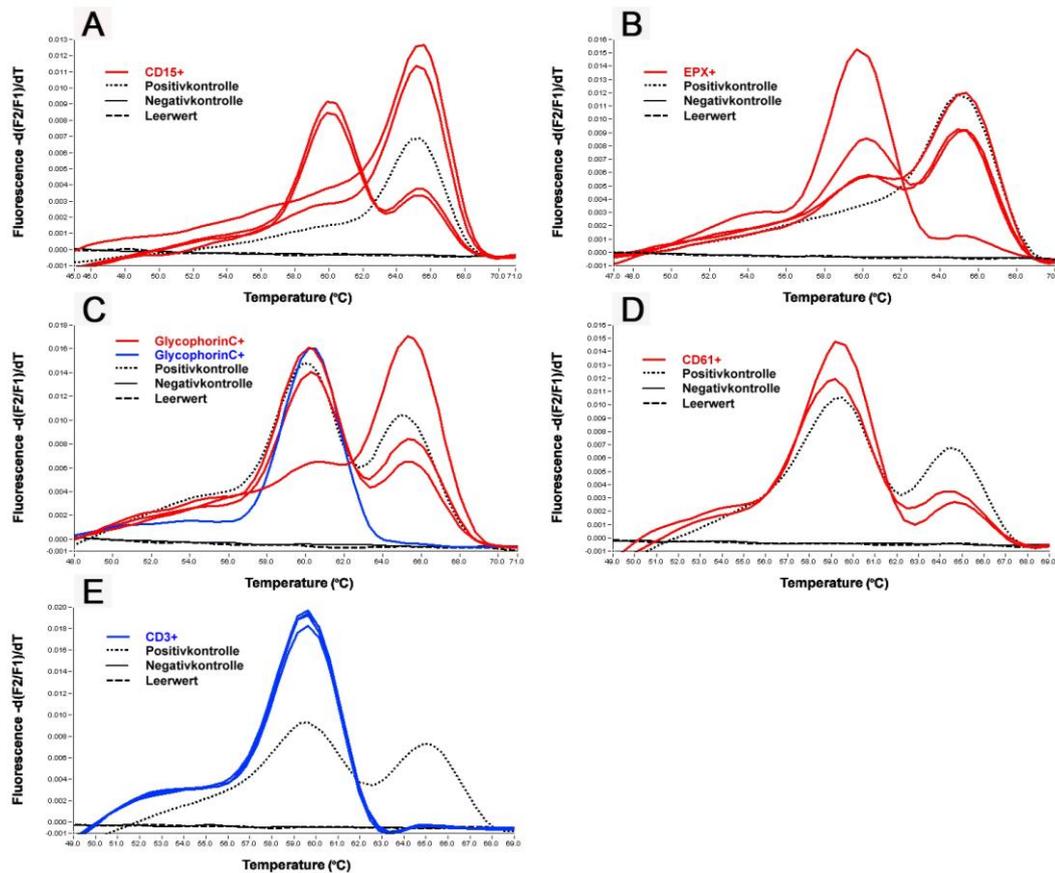


Abbildung 29: SM-MDS/MPN-U, Fall 38, Ergebnis der Schmelzpunktanalyse. Bis auf die T-Lymphozyten (CD3+) (E) konnte die *KIT* D816V Mutation in allen Zellreihen nachgewiesen werden (A-D).

2.3. Analyse der Patienten mit SM-MDS

Unter dem Begriff des MDS wird eine heterogene Gruppe von klonalen myeloischen Erkrankungen zusammengefasst, deren gemeinsames Merkmal, im Gegensatz zu den Myeloproliferativen Neoplasien, eine „ineffektive“ Hämatopoese auf dem Boden dysplastischer Veränderungen ist. Die Patienten zeigen klinische Symptome bedingt durch Zytopenien in einer oder mehrerer Zellreihen.

In fünf Fällen dieser Studie wurde die AHNMD als MDS klassifiziert (Tab. Anhang 1). Es handelte sich dabei in drei Fällen um ein MDS vom Typ der refraktären Zytopenie mit multilineärer Dysplasie (MDS-RCMD). In einem Fall konnte in der Berlinerblau-Färbung eine signifikante Ringsideroblastose nachgewiesen werden, welche die Diagnose einer refraktären Anämie mit Ringsideroblasten (RARS) erlaubte. Ein Fall wurde als myelodysplastisches Syndrom mit Deletion des Chromosoms 5q (MDS del 5q) diagnostiziert. In der Giemsa-Färbung war eine spärliche betont eosinophile Granulozytopenie mit disseminierten, teilweise irregulären Nestern einer linksverschobenen, normoblastär wirkenden Erythrozytopenie zu sehen (Abb. 30A,B). Die Megakaryozyten waren zahlreich und locker verstreut und stellten sich in der HE-Färbung mit hyperchromatischen Kernen dar (Abb. 30C). Mit einem Antikörper gegen

das plättchen-assoziierte Antigen CD16 konnte eine geringe diffuse Vermehrung zumeist unreif wirkender, stark hypolobulierter Megakaryozyten bestätigt werden (Abb. 30D).

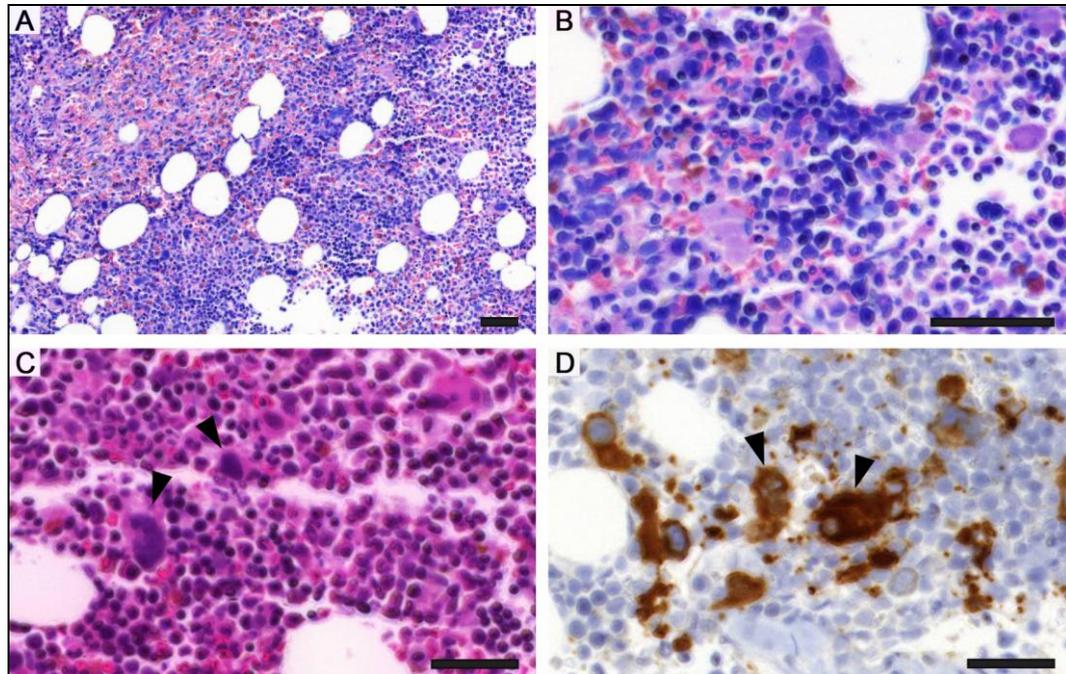


Abbildung 30: Knochenmarksbiopsie mit SM-MDS del 5q (Fall 48). Giemsa-Färbung, betont eosinophile Granulozytopenese mit disseminierten, teilweise irregulären Nestern einer stark linksverschobenen Erythrozytopenese in allen Reifungsstadien (A, B). HE-Färbung, Pfeile zeigen Megakaryozyten mit hyperchromatischen Kernen (C). CD61-Färbung, Pfeile zeigen unreif wirkende und hypolobulierte Megakaryozyten (D).

In zwei der fünf Fälle konnte die Mutation D816V in CD15-positiven neutrophilen Granulozyten nachgewiesen werden (Tab.11). Bei Fall 48 fand sich die *KIT* D816V Mutation in allen untersuchten myeloischen Zellreihen (CD15+, EPX+, GlycoC+, und CD61+) und sogar in den lymphatischen Zellen (CD3+) (Abb. 31).

Tabelle 11: Mikrodissektionsergebnisse der Fälle mit SM-MDS.

Fall	Diagnose	NG	EG	Epz	Mk	T-Zellen
44	ASM-RCMD	D816V	wt	k.A.	k.A.	wt
45	ASM-RARS	wt	wt	n.u.	n.u.	n.u.
46	ASM-RCMD	wt	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.
47	ASM-RCMD	wt	n.u.	wt	k.A.	n.u.
48	ISM-MDS del 5q (Abb. 32)	D816V	D816V	D816V	D816V	D816V
Σ=5	SM-MDS	2/5	1/3	1/2	1/1	1/2

NG= neutrophile Granulozyten, EG= eosinophile Granulozyten, Epz= Erythroblasten, Mk= Megakaryozyten, wt= Wildtyp, n.u. = nicht untersucht, k.A. = keine Amplifikation.

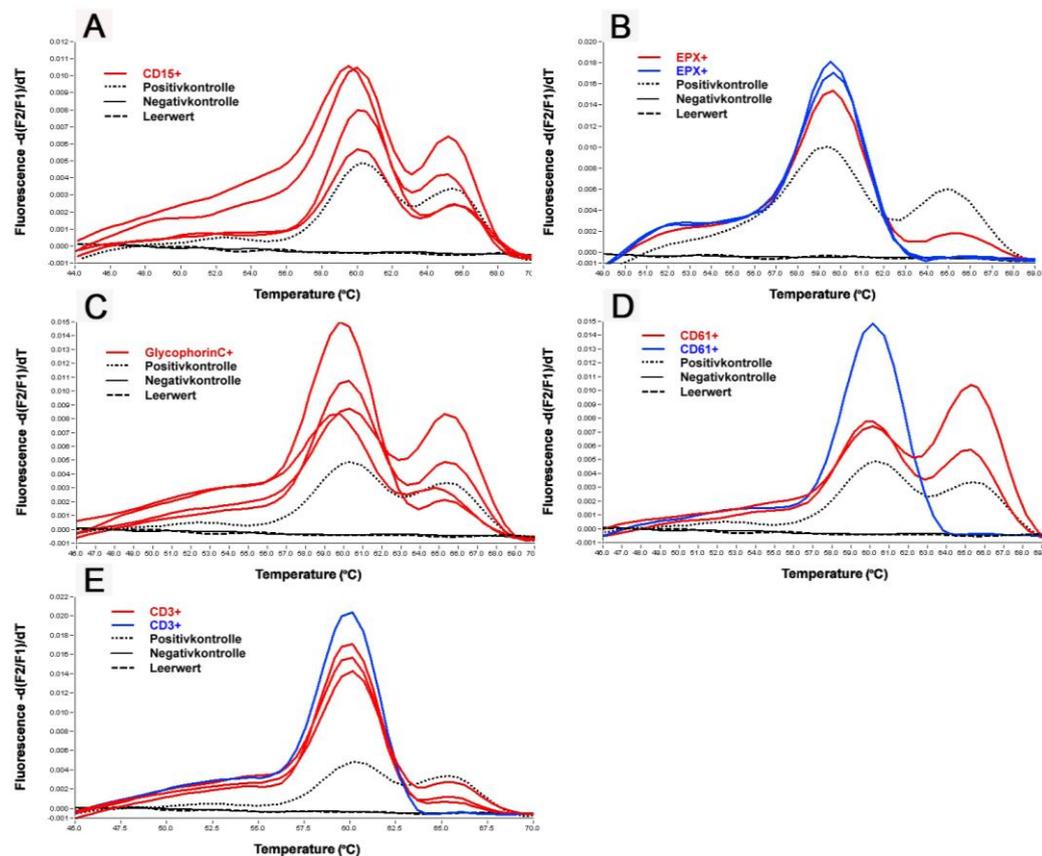


Abbildung 31: ISM-MDS del 5q, Fall 48, Ergebnis der Schmelzpunktanalyse. Die *KIT* D816V Mutation konnte in allen myeloischen Zellreihen (neutrophile (CD15+) (A) und eosinophile Granulozyten (EPX+) (B), Erythroblasten (GlycoC+) (C), Megakaryozyten (CD61+) (D) und in den lymphatischen Zellen (CD3+) (E) detektiert werden.

2.4. Analyse der Patienten mit SM-AML

Die AML ist definiert durch einen Blastenanteil von > 20% im Knochenmark oder peripherem Blut. Man unterscheidet eine de-novo AML von einer sekundären AML, wenn der Erkrankung eine hämatologische Erkrankung, z. B. ein myelodysplastisches Syndrom, vorangegangen ist. Bei einem Fall wurde aufgrund der hochgradigen Vermehrung der Megakaryoblasten die Diagnose einer akuten megakaryoblastären Leukämie (AML-M7) gestellt. Ein Fall zeigte myelodysplasie-assoziierte Veränderungen: Hier wurde eine sekundäre AML (sAML) diagnostiziert (Tab. Anhang 1). Mutationen im Codon 816 waren in keiner der untersuchten Zellreihen nachweisbar (Tab.12).

Tabelle 12: Mikrodissektionsergebnisse der Fälle mit SM-AML.

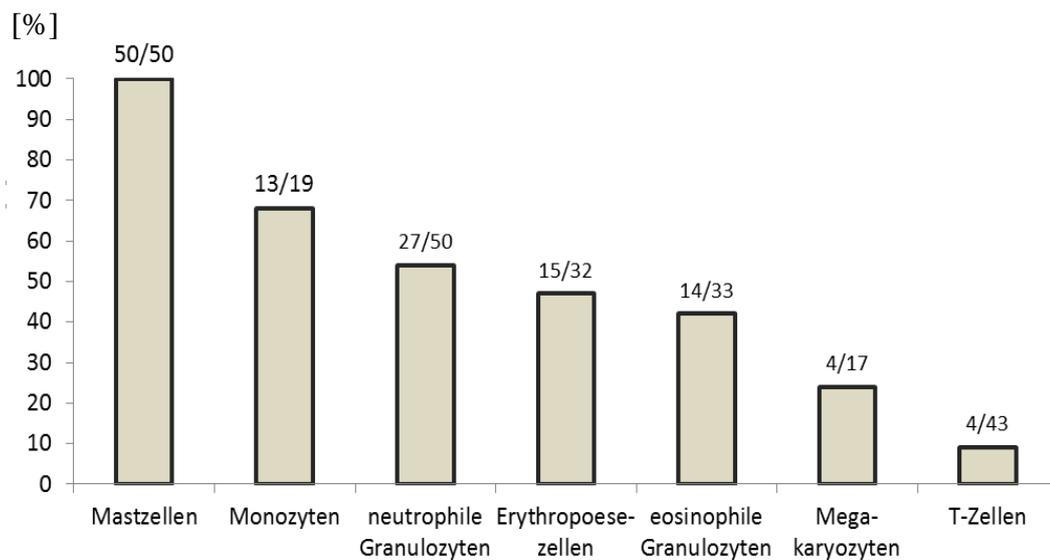
Fall	Diagnose	NG	EG	Epz	Mk	T-Zellen
49	ASM-AML-M7	wt	n.u.	n.u.	wt	wt
50	ISM-sAML	wt	n.u.	wt	wt	wt
$\Sigma=2$	SM-MDS	0/2	0/0	0/1	0/2	0/2

NG= neutrophile Granulozyten, EG= eosinophile Granulozyten, Epz= Erythroblasten, Mk= Megakaryozyten, wt= Wildtyp, n.u. = nicht untersucht, k.A. = keine Amplifikation.

3. Analyse mikrodissektierter nicht-Mastzellen

Die Amplifikationsrate der einzelnen Zellreihen war unterschiedlich, CD15-positive neutrophile Granulozyten (50/50) und CD14-positive Monozyten (19/19) ließen sich in allen Fällen (100%) amplifizieren, gefolgt von CD3-positiven T-Lymphozyten mit 98% (43/44), EPX-positiven eosinophilen Granulozyten (32/33, 97%), GlycophorinC-positiven Erythroblasten (33/37, 89%) und CD61-positiven Megakaryozyten (17/33, 52%). Eine *KIT* Codon 816 Mutation konnte prinzipiell in allen hämatopoetischen Zellreihen nachgewiesen werden. Am häufigsten waren *KIT*-Mutationen in Monozyten (CD14+, 13/19, 68%) nachweisbar, desweiteren in neutrophilen Granulozyten (CD15+, 27/50, 54%), in eosinophilen Granulozyten (EPX+, 15/32, 47%), in Erythroblasten (GlycoC+, 14/33, 42%), in Megakaryozyten (CD61+, 4/17, 24%) und in T-Lymphozyten (CD3+, 4/43, 9%) (Tab. 13).

Tabelle 13: Mutationsnachweis in den verschiedenen Zellreihen, x-Achse: Knochenmarkszellen, y-Achse: Mutationsfrequenz in Prozent, mit Fallzahlen.



Es bestand bei der Analyse der mikrodissektierten nicht-Mastzellen, weder eine Korrelation zwischen Mutationshäufigkeit und einem SM-Subtyp (Tab. 14), noch zwischen Mutationshäufigkeit und einem AHNMD-Subtyp (nicht gezeigt).

Tabelle 14: Mutationsfrequenz in nicht-Mastzellen in Abhängigkeit von der SM-Komponente.

SM-Subtyp (Fallzahl)	NG	M	EG	Epz	Mk	T-Zellen
(I)SM (17)	7/17 (41%)	4/6 (67%)	6/10 (60%)	5/13 (38%)	2/8 (25%)	3/15 (20%)
ASM (31)	19/31 (61%)	8/12 (67%)	8/21 (38%)	8/19 (42%)	2/9 (22%)	1/26 (4%)
MCL(2)	1/2 (50%)	1/1 (100%)	1/1 (100%)	1/1 (100%)	0/0	0/2
Σ= 50	27/50 (54%)	13/19 (68%)	15/32 (47%)	14/33 (42%)	4/17 (24%)	4/43 (9%)

NG= neutrophile Granulozyten, EG= eosinophile Granulozyten, Epz= Erythroblasten, Mk= Megakaryozyten.

In allen Subtypen der AHNMDs war in den Knochenmarkszellen die Häufigkeit der *KIT* Mutation sehr heterogen. In 23 von 50 Fällen (46%), in denen die CD15-positiven neutrophilen Granulozyten die Wildtypsequenz aufwiesen, konnten auch in keiner anderen Zellreihe *KIT*-Mutationen detektiert werden (Abb. 23). In den anderen 27 Fällen (54%) war eine *KIT* Codon 816 Mutation in den Neutrophilen Granulozyten (CD15+) nachweisbar, in 23 von 50 Fällen (46%) konnte die Mutation in mindestens zwei myeloischen Zellreihen nachgewiesen werden, meist waren eosinophile Granulozyten betroffen. In 15 von 50 Fällen gelang der Nachweis der Mutation in drei Zellreihen und in 9 von 50 Fällen sogar in vier Zellreihen (Tab. 15).

In zehn von 50 Fällen (20%) konnte die Mutation sowohl in eosinophilen Granulozyten (EPX+), als auch in Erythroblasten (GlycoC+) detektiert werden. In drei von 50 Fällen (6%) gelang der Nachweis der Mutation in Erythroblasten (GlycoC+), nicht aber in Eosinophilen (EPX+). In vier von 43 untersuchten (9%) Fällen konnte die Mutation auch in T-Lymphozyten (CD3+) nachgewiesen werden, einer davon war als ASM klassifiziert, die anderen drei Fälle waren unklassifiziert. Ein Fall (Fall 48, SM-MDS del5q) wies die *KIT* Mutation D816V in allen untersuchten myeloischen Zellreihen sowie in den T-Lymphozyten auf (Abb. 31).

Tabelle 15: Häufigkeit der *KIT* Codon 816 Mutationen in nicht-Mastzellen.

Zellreihen	Häufigkeit
in 1 Zellreihe	54% (27/50)
in 2 Zellreihen	46% (23/50)
in 3 Zellreihen	28% (15/50)
in 4 Zellreihen	18% (9/50)

4. Zusammenfassung der Ergebnisse

Die Ergebnisse der Arbeit können wie folgt zusammengefasst werden:

1. Eine *KIT* Codon 816 Mutation konnte in allen untersuchten SM-AHNMD Fällen in der Gesamt-DNA nachgewiesen werden.
2. In den meisten Fällen wurde die *KIT* D816V Mutation gefunden; ein Fall wies die Mutationsvariante D816Y auf.
3. Die Amplifikationsrate der mikrodisezierten Knochenmarkszellen fiel unterschiedlich aus: neutrophile Granulozyten, Monozyten > T-Lymphozyten > eosinophile Granulozyten > Erythroblasten > Megakaryozyten.
4. Der Mutationsnachweis im Codon 816 gelang in allen untersuchten hämatopoetischen Zellreihen (myeloische Reihe 27/50, 54%; lymphatische Reihe 4/43, 9%).
5. Die Analyse der Mutationsfrequenz ergab folgendes Bild:
 - a. Wenn die CD15-positiven neutrophilen Granulozyten die Wildtypsequenz aufwiesen, so waren auch alle anderen Zellreihen Wildtyp.
 - b. Die Mutationshäufigkeit korrelierte weder mit einem SM-Subtyp noch mit einem AHNMD-Subtyp.
 - c. Wenn CD15 positive Zellen mutiert waren, dann konnte die Mutation sehr häufig in einer weiteren myeloischen Zellreihe nachgewiesen werden.
 - d. In 18% der Fälle (9/50) konnte die Mutation in bis zu vier Zellreihen nachgewiesen werden.
 - e. Mutationshäufigkeit in nicht-Mastzellen: Monozyten > neutrophile Granulozyten > eosinophile Granulozyten > Erythroblasten > Megakaryozyten > T-Lymphozyten.

V. DISKUSSION

1. Diskussion der morphologischen Befunde

Das Untersuchungsmaterial in Form von formalinfixierten Knochenmarksbiopsien aus dem Beckenkamm von Patienten mit systemischer Mastozytose und assoziierter klonaler hämatologischer nicht-mastozytärer Neoplasie (SM-AHNMD) stammt aus dem Referenz- und Exzellenzzentrum für die Diagnostik von Mastozytosen am Pathologischen Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München. Die Etablierung von Referenz- und Exzellenzzentren für die Diagnostik und Therapie von Mastozytosen ist eine Initiative der *European Competence Network on Mastocytosis* (ECNM, www.ecnm.net). Basierend auf den Expertisen von Herrn Prof. Dr. med. Hans-Peter Horny und Prof. Dr. med. Karl Sotlar in der morphologischen und molekularbiologischen Diagnostik und Differenzialdiagnostik dieser Erkrankungen, konnte im Rahmen ihrer langjährigen referenzpathologischen Tätigkeit ein umfangreiches Archiv dieser relativ seltenen Erkrankungen aufgebaut werden. Das Archiv umfasst zurzeit ca. 1000 Fälle mit Mastozytosen.

Aus dem Archiv wurden für die Analyse im Rahmen dieser Studie 50 Fälle mit der Diagnose SM-AHNMD ausgewählt. Die Alters- und Geschlechterverteilung in dem analysierten Kollektiv entsprach dem aus der Literatur bekannten Verteilungsmuster mit einer Bevorzugung des männlichen Geschlechts (67%) und einem medianen Alter von 65 ± 9 Jahren (SOTLAR *et al.*, 2010; DAMAJ *et al.*, 2014; WANG *et al.*, 2013).

Die häufige Assoziation von systemischer Mastozytose (SM) mit anderen hämatologischen Neoplasien ist seit mehr als 30 Jahren bekannt (TRAVIS *et al.*, 1988; HORNY *et al.*, 1990). Sie ist insofern als einzigartig anzusehen, als dass ein ähnlich gehäuftes Auftreten zweier anderer definierter hämatologischer Neoplasien nicht bekannt ist. Die SM-AHNMD stellt allerdings keine homogene Erkrankung mit morphologisch klar definiertem Phänotyp dar, sondern eine sehr heterogene Gruppe von Erkrankungen, in welcher jeder WHO-definierte Subtyp der SM (Kap. II 3.1.) in Kombination mit einer anderen (nicht-mastozytären) hämatologischen Neoplasie auftritt (SWERDLOW *et al.*, 2008). Dabei handelt es sich zumeist um myeloische Neoplasien, welche ebenfalls nach der aktuellen WHO-Klassifikation definiert werden (SWERDLOW *et al.*, 2008).

Mit der Entdeckung der für SM charakteristischen Mutation *KIT* D816V und der Erkenntnis, dass diese und funktionell gleichbedeutende Mutationen im Codon 816 von *KIT* in weit mehr als 90% der Patienten mit SM nachweisbar sind, wurde der Grundstein für Analysen zur Frage einer klonalen Assoziation von SM und AHNMD gelegt

(NAGATA *et al.*, 1995; GARCIA-MONTERO *et al.*, 2006). Der Nachweis der Mutation *KIT* D816V in beiden Erkrankungskomponenten, SM und AHNMD, fungiert dabei als Klonalitätsmarker. In vorangegangenen Analysen konnte bisher keine *KIT* Mutation D816V in einer lymphatischen AHNMD nachgewiesen und damit eine klonale Assoziation gezeigt werden (SOTLAR *et al.*, 2010; KIM *et al.*, 2007; HAUSWIRTH *et al.*, TZANKOV *et al.*, 2008). Daher wurden für diese Studie ausschließlich Fälle mit myeloischen AHNMDs ausgewählt.

Für die histo- und zytomorphologische Diagnostik einer SM-AHNMD sind klinische und hämatologische Informationen zur Beurteilung der *B-* und *C-findings* unbedingt notwendig. Die diagnostische Herausforderung liegt in der Tatsache begründet, dass sowohl die SM-, wie auch die AHNMD-Komponente wechselseitig quantitativ sehr stark schwankende Infiltrationsgrade des Knochenmarks zeigen können und somit die jeweils andere Komponente im Extremfall komplett maskieren können (BERND *et al.*, 2004). Unter den Patienten der vorliegenden Studie schwankte der Infiltrationsgrad durch die SM-Komponente zwischen 5% und 95% und erschwerte so oftmals die Subtypisierung der AHNMD-Komponente. Gleichermäßen problematisch stellt sich die Beurteilung der hämatologischen Parameter dar, etwa einer Zytopenie. Diese kann Ausdruck einer dysplastischen Komponente der AHNMD sein oder aber durch die ausgedehnte Knochenmarksinfiltration einer SM bedingt sein. Die Zytopenie wäre somit als *C-finding* zu werten und die SM-Komponente müsste als aggressive systemische Mastrozytose (ASM) subtypisiert werden. Die Problematik in der Bewertung morphologischer und klinisch/hämatologischer Befunde äußert sich in der vorliegenden Studie in 14 Fällen in der Bewertung der AHNMD-Komponente als "unklassifizierbar" (1x MPN-Eo, 2x MPN-U, 11x MDS/MPN-U). In Bezug auf die Subtypisierung der SM-Komponente wurden bestehende Zytopenien bei drei Patienten mit AHNMDs aus der Gruppe der myeloproliferativen Neoplasien (MPN) (Fall 4, 5 und 7), sechs Patienten aus der Gruppe der myelodysplastischen/myeloproliferativen Neoplasien (MDS/MPN) (Fall 16, 17, 26, 27, 38 und 43), ein Patient aus der Gruppe der myelodysplastischen Syndrome (MDS) (Fall 47) und ein weiterer Patient aus der Gruppe der akuten myeloischen Leukämien (AML) (Fall 50) aufgrund einer nur geringen bis mäßigen Knochenmarksinfiltration durch die SM (10% bis 25%) nicht als *C-finding* interpretiert und somit nicht als ASM klassifiziert. Andererseits wurde in vier Fällen (Fall 2, 12, 32 und 37) auf dem Boden einer bis 50%-igen Knochenmarksinfiltration durch die SM-Komponente eine ASM auch ohne *C-finding* diagnostiziert. Mit den hier untersuchten 50 *KIT* Codon 816 Mutation-positiven SM-AHNMD Patienten mit myeloischer AHNMD liegt das größte bisher molekular analysierte Patientenkollektiv vor (SOTLAR *et al.*, 2010; DAMAJ *et al.*, 2014).

2. Diskussion der Methoden

2.1. PCR-Analysen an Gesamt-DNA

In Anbetracht der spezifischen Ziele dieser Arbeit, insbesondere der Bestimmung der Häufigkeit von *KIT* Codon 816 Mutationen in der AHNMD-Komponente von Patienten mit SM-AHNMD (spezifisches Ziel 1) und dem Nachweis dieser Mutationen in diversen hämatopoetischen Zellreihen (spezifisches Ziel 2), wurden für die vorliegende Studie nur Fälle mit *KIT* Codon 816 Mutationen, nahezu ausschließlich *KIT* D816V (49/50; 1 Fall mit *KIT* D816Y) ausgewählt. Das *KIT* Mutationsscreening im Codon 816 wurde mittels dreier unterschiedlich sensitiver PCR-Verfahren an Gesamt-DNA aus kompletten Gewebeschnitten durchgeführt (SOTLAR *et al.*, 2003, 2008). Nach konventioneller Amplifikation und Schmelzpunktanalyse konnten *KIT* Mutationen in 82% (41/50) der Fälle nachgewiesen werden. In drei Fällen gelang die DNA-Amplifikation aufgrund zu schlechter DNA-Qualität nicht. Zudem zeigten sechs Fälle ausschließlich Wildtyp-spezifische Signale in der Schmelzpunktanalyse. In fünf dieser Fälle konnte erwartungsgemäß auch keine Mutation in mikrodisezierten Zellreihen nachgewiesen werden, da vermutlich die *KIT* D816V-Allellast in der Gesamt-DNA relativ gering und auf die neoplastischen Mastzellen beschränkt war. Mittels LNA-basiertem PCR-*clamping* zeigte sich erwartungsgemäß eine gesteigerte Sensitivität von 92% (46/50). Drei Fälle waren, wie schon in der konventionellen PCR, nicht amplifizierbar. In einem vierten Fall (Fall 8, Tab. Anhang 1) ist der fehlende Nachweis der Mutation *KIT* D816V eindeutig durch die geringe Allellast zu erklären. Hier betrug der Infiltrationsgrad des Knochenmarks lediglich 5% und in allen per Mikrodisektion untersuchten Zellreihen fanden sich ausschließlich Wildtyp-spezifische Signale. Mittels LNA *semi-nested* PCR, der sensitivsten Screening-Methode, waren Mutationen in allen 49 untersuchten Fällen nachweisbar. In einem Fall (Fall 23, Tab. Anhang 1) stand für diese Untersuchung nicht mehr genügend Material zur Verfügung. Die Mutation *KIT* D816V war hier allerdings sowohl nach konventioneller Amplifikation, wie auch nach LNA-*single* PCR nachweisbar. Insgesamt zeigt sich auch in der vorgelegten Studie eine bereits aus zurückliegenden Untersuchungen an anderen Patientenkollektiven bekannte Korrelation der *KIT* D816V Allellast mit der zum Mutationsnachweis notwendigen Sensitivität der eingesetzten Methode (SOTLAR *et al.*, 2010).

2.2. Immunhistochemische Doppelfärbungen

Aufbauend auf den bisherigen Analysen unserer Arbeitsgruppe an mikrodisezierten Zellen bei Patienten mit SM wurden in der vorliegenden Studie ausschließlich Zellen aus immunhistochemischen Doppelmarkierungen analysiert. Die eingesetzte Technik der Mikrodisektion von Einzelzellen mittels *Laser Pressure Catapulting* ist insbesondere

auch an Gewebeschnitten von Paraffinblöcken, dem Standard-Untersuchungsmaterial der modernen Histopathologie, anwendbar. Aufgrund der DNA-Degradierung durch die Formalinfixierung und die EDTA-Entkalkung der Knochenmarksbiopsien sind zwischen 100 und 250 Zellkerne notwendig, um eine Amplifikationseffizienz von > 80% PCR-Produkten zu generieren und damit molekulare Mutationsanalysen durchführen zu können. Bei der Markierung einer solchen Anzahl von Zellen und dem anschließenden automatisierten Herauskatapultieren der Zellen aus ihrer Umgebung per Laser-Impuls kann es passieren, dass benachbarte (nicht immunhistochemisch markierte) Zellen mit aus dem Gewebeschnitt katapultiert werden. Handelt es sich bei diesen Zellen zufälligerweise um *KIT* D816V-positive Mastzellen, etwa in einem Fall mit 70%-iger Knochenmarksinfiltration durch eine SM, kann diese "Kontamination" zu einem falsch-positiven Ergebnis führen. Daher wurden in der vorliegenden Studie erstmals ausschließlich Zellen aus immunhistochemischen Doppelmarkierungen katapultiert. Die Doppelmarkierungen (u.a. CD15/MCT, CD14/MCC, CD61/MCT, GlycoC/MCT, CD3/MCT) dienen insbesondere zur Abgrenzung der Mastzellen von anderen zu analysierenden Zellreihen.

Eine molekulare Analyse aller Zellreihen konnte aufgrund des teilweise limitierten Untersuchungsmaterials nicht in allen Fällen durchgeführt werden. Teilweise war auch die Anzahl der immunhistochemisch gefärbten Zellen, insbesondere mittels anti-CD14, so gering, dass nicht ausreichend viele Zellen mikrodisektiert werden konnten.

2.3. Analysen mikrodisektierter Zellen

Mutationsanalysen an unterschiedlichen Zellreihen wurden erstmals von Garcia-Montero und Mitarbeiter bei 13 Patienten mit SM-AHNMD beschrieben (GARCIA-MONTERO *et al.*, 2006). An nativen durchflusszytometrisch sortierten Zellen aus Knochenmarksaspiraten detektierte die spanische Forschungsgruppe *KIT* Codon 816 Mutationen in eosinophilen Granulozyten bei 67% (6/9), in Monozyten bei 63% (5/8), in neutrophilen Granulozyten bei 57% (4/7) und in Lymphozyten bei 40% (2/5) der untersuchten Patienten. Derartige Analysen sind allerdings nur prospektiv und kurze Zeit nach Knochenmarksaspiration möglich. Retrospektive Analysen an in Paraffin eingebettetem Gewebe, wie in der vorliegenden Studie wurden außerhalb unserer Arbeitsgruppe nur in Einzelfällen durchgeführt.

Aufgrund der oben beschriebenen Degradierung der DNA ist trotz Analyse von bis zu 250 Zellkernen pro Reaktionsgefäß bei der Amplifikation des mikrodisektierten Zellmaterials eine zwei-Stufen PCR (*semi-nested* PCR) zur Steigerung der Sensitivität notwendig (SOTLAR *et al.*, 2010, 2008). Dennoch wurden lediglich Amplifikationsraten zwischen 98% (45/46) bei T-Lymphozyten und 52% (17/33) bei Megakaryozyten

erreicht. Letztgenannte Zellen boten, obwohl auch in der konventionellen Morphologie leicht zu identifizieren, häufig das Phänomen, dass sich ihre oft sehr großen Kerne nicht durch die üblichen Laser-Impulse komplett aus dem Gewebe katapultieren ließen. Oft wurden lediglich Fragmente aus dem Kern herauskatapultiert, deren DNA-Gehalt vermutlich nicht für die Amplifikation der DNA ausreichte. Die Amplifikationsraten der übrigen untersuchten Zellreihen lagen für CD15-positive neutrophile Granulozyten (50/50) und für CD14-positive Monozyten (19/19) bei 100% und für GlycophorinC-positive Erythroblasten bei 97% (32/33). Damit standen für alle zu untersuchenden Zellreihen – die Megakaryozyten mit Einschränkung – ausreichend viele Amplifikate für eine anschließende Mutationsanalytik mittels Schmelzpunktbestimmung zur Verfügung.

Unabhängig von der jeweiligen Diagnose waren bei den in dieser Studie untersuchten 50 Patienten mit SM-AHNMD *KIT* Codon 816 Mutationen in allen untersuchten Zellreihen, inklusive der T-Lymphozyten nachweisbar. Bedingt durch die zum Teil limitierte Verfügbarkeit des Untersuchungsmaterials und die zum Teil eingeschränkte Amplifizierbarkeit mikrodissektierter Zellen, wurden nicht in jedem Fall alle Zellreihen untersucht (Tab. Anhang 2). In der CD15-positiven Zellreihe (neutrophile Granulozytopoese), welche in allen Fällen untersucht werden konnte, waren *KIT* Mutationen in 54% (27/50) nachweisbar. Ein qualitativ nahezu identisches Ergebnis erbrachte auch die Analyse CD14-positiver Monozyten. Insgesamt ließen sich hier in 68% (13/19) der Fälle *KIT* Mutationen nachweisen, diese jedoch ausschließlich in Fällen, in welchen auch CD15-positive Zellen die Mutation aufwiesen (Tab. Anhang 2). Ein gleichartiger Befund zeigte sich auch bei der Analyse mittels eosinophiler Peroxidase markierter eosinophiler Granulozyten, die *KIT* D816V Mutation zeigte sich hier in 47% (15/32) der untersuchten Fälle, ebenfalls wieder ausschließlich in Fällen, in welchen *KIT* D816V auch in CD15-positiven Zellen nachweisbar war. Die Frequenz des Mutationsnachweises in den genannten Zellreihen bewegte sich damit etwa im Bereich der von Garcia-Montero und Mitarbeiter genannten und oben beschriebenen Werte, wenngleich dort lediglich 13 Patienten untersucht wurden und natives Material analysiert werden konnte (GARCIA-MONTERO *et al.*, 2006).

In der vorliegenden Studie wurden darüber hinaus erstmals auch Erythroblasten und Megakaryozyten analysiert. Dabei waren insbesondere in Erythroblasten *KIT* Codon 816 Mutationen in einem relativ hohen Prozentsatz von 42% (14/33) der Fälle nachweisbar, wiederum ausschließlich in Fällen mit Nachweis der Mutation auch in CD15-positiven neutrophilen Granulozyten. In deutlich weniger Fällen (4/17, 24%) waren *KIT* Mutationen in Megakaryozyten nachweisbar. Dieses Ergebnis ist möglicherweise methodisch bedingt zu niedrig ausgefallen, da die Amplifikation der DNA aus Megakaryozytenkernen, wie oben beschrieben, in insgesamt 16 Fällen misslang. Dennoch

war auch in Megakaryozyten die *KIT* Mutation nur in solchen Fällen nachweisbar, in welchen sie auch in CD15-positiven neutrophilen Granulozyten gezeigt werden konnte. Deutlich seltener als von Garcia-Montero und Mitarbeiter beschrieben (40%), gelang der Nachweis von *KIT* Codon 816 Mutationen dagegen in T-Lymphozyten, mit lediglich 9% (4/43) (GARCIA-MONTERO *et al.*, 2006). Auch hier waren ausschließlich Fälle betroffen, in welchen die Mutation auch in CD15-positiven Zellen nachweisbar war.

Zusammenfassend zeigt sich ein deutlicher Unterschied in der Häufigkeitsverteilung von *KIT* D816V (und D816Y) zwischen Zellreihen der Myelopoese (bis 54%) einerseits und der (T-) Lymphopoese (9%) andererseits. Dieses Ergebnis ist auf dem Boden der bekannten frühen Differenzierung der Hämatopoese in (multipotente) myeloische und lymphatische Stammzellen nicht verwunderlich, zeigt aber dennoch, dass auch in einer Gruppe von myeloischen Neoplasien, wie den SM-AHNMD, Mutationen zumindest in einem (kleinen) Teil der Fälle offenbar in einer noch nicht weiter differenzierten Stammzelle auftreten können. Damit kann theoretisch auch eine *KIT* D816V-positiv lymphatische AHNMD nicht endgültig ausgeschlossen werden, wengleich bislang kein derartiger Fall bekannt ist (SOTLAR *et al.*, 2010; KIM *et al.*, 2007; HAUSWIRTH *et al.*, 2008; TZANKOV *et al.*, 2008). Weiterhin lässt sich aus den oben beschriebenen Ergebnissen schließen, dass ein signifikanter Teil der SM-AHNMD auf dem Boden eines frühen (omni-, pluri-, oder bipotenten) myeloischen Progenitors entstanden sein muss: In 46% (23/50) der Fälle waren *KIT* Mutationen in mindestens zwei myeloischen Zellreihen, in 28% (15/50) der Fälle in drei myeloischen Reihen und in 18% (9/50) der Fälle in vier myeloischen Reihen nachweisbar (Tab.15). Als (molekularer) Marker für eine Beteiligung von nicht-Mastzellen am *KIT* D816V-positiven Klon erweisen sich CD15-positiv neutrophile Granulozyten, denn in keinem Fall wurde die *KIT* Mutation in anderen Zellreihe nachgewiesen, wenn sie in neutrophilen Granulozyten fehlte. Im Gegensatz zu (CD14-positiven) Monozyten sind Neutrophile darüber hinaus praktisch immer in ausreichender Zahl für eine Analyse mikrodissektierter Zellen verfügbar.

5. Häufigkeit von *KIT* D816V in der AHNMD-Komponente

Der Nachweis von *KIT* D816V in meist mehreren myeloischen Zellreihen in der Gruppe der heterogenen myeloischen Neoplasien SM-AHNMD unterstreicht die grundsätzliche WHO-Definition myeloischer Neoplasien als "Stammzellerkrankung" mit auch morphologisch erkennbarer Beteiligung meist mehrerer myeloischer Zellreihen. Hieraus ist zu folgern, dass in der molekularen Analyse verschiedener Zellreihen bei SM-AHNMD die Frage nach deren Zugehörigkeit zum neoplastischen Klon der AHNMD in der Regel nicht zu klären ist. Aus pragmatischen Gesichtspunkten und unter Berücksichtigung der oben beschriebenen Indikatorfunktion von CD15-positiven neutrophilen Granulozyten für eine Beteiligung von nicht-Mastzellen am *KIT* D816V-

positiven neoplastischen Klon, wurde der Nachweis von *KIT* Codon 816 Mutationen in diesen Zellen gleichgesetzt mit dem Nachweis der Mutation in der AHNMD-Komponente der Erkrankung. Damit ist in dem SM-AHNMD Kollektiv dieser Studie die *KIT* Mutation D816V – in einem Fall auch *KIT* D816Y – in 54% der Fälle (27/50) in der AHNMD-Komponente der Erkrankung nachweisbar. Dieser Wert liegt über der in einer vorangegangenen Analyse an einem weiteren Patientenkollektiv gefundenen Häufigkeit von 46% (17/37) in myeloischen AHNMDs (SOTLAR *et al.*, 2010). Da in beiden Studien dieselbe Technik benutzt wurde, ist als Ursache für die höhere Mutationsfrequenz in der AHNMD-Komponente eine andersartige Zusammensetzung des Kollektivs anzunehmen (SOTLAR *et al.*, 2010). Bei Patienten mit AHNMDs aus der jeweils kleinen Gruppe der MDS ergaben sich vergleichbare Häufigkeiten für den Nachweis von *KIT* D816V in der AHNMD-Komponente: Aktuell findet sich die Mutation in 40% der Fälle (2/5), verglichen mit 50% (2/4) in der Voruntersuchung (SOTLAR *et al.*, 2010). Insbesondere in dieser Studie stammen die AHNMD-Komponenten am häufigsten aus der Gruppe der MDS/MPN, vor allem chronisch myelomonozytäre Leukämie (CMML) (n=24). Auch in dieser Studie fand sich eine auffallend häufige klonale Assoziation zwischen den beiden unterschiedlichen Krankheitskomponenten SM und CMML. Diese liegt mit 67% (16/24) jedoch deutlich unter dem zuvor ermittelten Wert von 89% (8/9). Für diese unterschiedlichen Häufigkeiten könnte zum einen die geringe Fallzahl und zum anderen die Tatsache, dass in der Voruntersuchung keine immunhistochemische Doppelmarkierung benutzt wurde, eine Rolle spielen. Zusammenfassend zeigt eine besonders häufige klonale Assoziation zwischen SM und CMML, dass beide Erkrankungen häufig einen gemeinsamen Progenitor besitzen könnten.

6. Korrelation der Multilinen-Beteiligung von *KIT* D816V mit dem SM-Subtyp

Die Verteilung der SM-Subtypen zeigte in der vorliegenden Studie in 31 Fällen (62%) eine ASM, in 17 Fällen (34%) eine (indolente) SM und in 2 Fällen (4%) eine MCL. Unter den beiden Patienten mit MCL – beide mit assoziierter CMML – zeigte ein Patient die *KIT* Mutation D816V auch in nicht-Mastzellen. Eine Multilinen-Beteiligung, bzw. ein *KIT* D816V-Nachweis in AHNMD Zellen, fand sich bei Patienten mit ASM in 61% der Fälle (19/31) und bei Patienten mit (indolenter) SM immerhin in 41% der Fälle (7/17). Somit ist für die Bedeutung des SM-Subtyps bei der Frage einer Beteiligung der AHNMD-Komponente am *KIT* D816V-positiven Klon allenfalls ein Trend, jedoch keine auffällige Diskriminierung erkennbar.

7. Bedeutung von non-*KIT* Mutationen

Im Zuge der rasanten technologischen Entwicklung von Hochdurchsatzverfahren zur Sequenzierung großer Mengen von Genen und ganzer Genome von Patienten mit hämatologischen Neoplasien, sind in den letzten Jahren erhebliche Erkenntnisgewinne entstanden. So wurden für einzelne Entitäten "neue" typische Mutationen entdeckt, ähnlich wie JAK2 V617F für bestimmte MPNs, *KIT* D816V für Mastrozytosen und BCR-ABL für die chronisch myeloische Leukämie (CML) (SWERDLOW *et al.*, 2008). Hier sind insbesondere die Entdeckungen von CSF3R Mutationen bei chronisch neutrophiler Leukämie (CNL; MAXSON *et al.*, 2013), Calreticulin-Mutationen bei JAK2 und MPL-negativer essentieller Thrombozythämie (ET) und primärer Myelofibrose (PMF) (NANGALIA *et al.*, 2013) und TET2 sowie SRSF2 Mutationen bei CMML zu nennen (MEGGENDORFER *et al.*, 2010). Doch auch für die Gruppe der MDS und letztlich auch die Mastrozytosen, insbesondere jene mit AHNMD, ist deutlich geworden, dass oft mehrere Mutationen vorliegen und dass die absolute Anzahl von Mutationen, insbesondere von sogenannten *driver mutations* von erheblicher prognostischer und auch therapeutischer Bedeutung ist (CAZZOLA *et al.*, 2013; SCHWAAB *et al.*, 2013). Dementsprechend ist auch im untersuchten Patientenkollektiv in einer erheblichen Anzahl von Fällen vom Vorliegen zusätzlicher Mutationen auszugehen. Wie hier für *KIT* D816V gezeigt, werden auch diese "non-*KIT* Mutationen" eine vermutlich variable Verteilung in beiden Krankheitskomponenten zeigen. Die Adressierung dieser Fragestellung wird Gegenstand weiterer molekularbiologischer Studien an dem hier beschriebenen Kollektiv sein.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Systemische Mastozytosen werden laut aktueller WHO Klassifikation den myeloproliferativen Neoplasien zugerechnet. In mehr als 90% der Fälle ist die aktivierende Punktmutation *KIT* D816V nachweisbar. Ein Subtyp dieser heterogenen Erkrankungen ist die systemische Mastozytose und assoziierter klonaler hämatologischer nicht-mastozytärer Neoplasie (SM-AHNMD). In der vorliegenden Studie wurden 50 *KIT* D816V/Y-positive Patienten mit myeloischen AHNMDs analysiert. Speziell wurde durch Analyse unterschiedlicher mikrodissektierter Zellreihen geklärt, (1) wie häufig *KIT* Mutationen in der AHNMD-Komponente der Erkrankung vorkommen, (2) in welchen hämopoetischen Zellreihen die Mutationen nachweisbar sind, (3) ob eine Korrelation des Mutationsnachweises mit dem AHNMD-Subtyp vorliegt und (4) ob eine Korrelation mit dem SM-Subtyp vorliegt. Die molekularen Analysen wurden an immunhistochemisch identifizierten, per *Laser Pressure Catapulting* einzeln mikrodisspektierten und jeweils zu zirka 1000 gepoolten Zellen durchgeführt. Eine Genotypisierung der *c-kit hot-spot* Region wurde mittels Schmelzpunktanalyse mit spezifischen Hybridisierungs sonden an *semi-nested* PCR generierten Amplikons durchgeführt. Zur spezifischen Identifikation von neutrophilen Granulozyten, Monozyten, eosinophilen Granulozyten, Erythroblasten, Megakaryozyten und T-Lymphozyten und deren Abgrenzung zu *KIT* D816V-positiven Mastzellen wurden immunhistochemische Doppelmarkierungen etabliert. In den durchgeführten Analysen wurden *KIT* Codon 816 Mutationen in 54% (27/50) der Fälle in den untersuchten nicht-mastozytären Zellreihen gefunden, die somit eine Beteiligung der AHNMD-Komponente anzeigen. Neutrophile Granulozyten erwiesen sich dabei als Markerzellreihe für eine Beteiligung von auch nicht-mastozytären Zellreihen am *KIT* D816V-positiven neoplastischen Klon. *KIT* Mutationen konnten in allen untersuchten Zellreihen nachgewiesen werden. In fast der Hälfte der Fälle waren, neben Mastzellen, zwei weitere myeloische Zellreihen betroffen. Daher ist die SM-AHNMD häufig als biphänotypische Erkrankung mit einem gemeinsamen frühen myeloischen Progenitor anzusehen. In einzelnen Fällen, mit Nachweis der *KIT* Mutation in T-Lymphozyten (4/54), ist sogar von einer gemeinsamen bipotenten Stammzelle auszugehen. Das häufige Auftreten von *KIT* D816V in AHNMDs vom Typ der CMML (67%, 16/24), weist hier auf eine besonders enge klonale Assoziation und einen gemeinsamen Progenitor hin. Zukünftige Studien müssen die pathophysiologische, aber auch prognostische und therapeutische Bedeutung von *KIT* und „non-*KIT* Mutationen“ klären.

VII. SUMMARY

According to the WHO systemic mastocytosis (SM) is classified as a myeloproliferative neoplasm. Remarkably more than 90% of SM patients harbour an activating mutation in the c-kit gene, mostly D816V. One SM-subtype is SM-AHNMD, systemic mastocytosis with an associated haematological non-mast cell lineage disease. In the current study 50 consecutive *KIT* D816V/Y-positive patients with myeloid AHNMDs were investigated. Analysing different microdissected haematopoietic cell lineages, we addressed the following questions: (1) the frequency at which *KIT* mutations are detectable in the AHNMD component, (2) identification of the various haematopoietic cell lineages carrying *KIT* mutations, (3) correlation of the *KIT* mutational status with AHNMD subtype and (4) SM-subtype. For molecular analyses, different haematopoietic cell lineages were immunostained and microdissected by the technique of laser pressure catapulting. Pooled isolated cells were genotyped by melting point analyses with specific hybridisation probes after amplification of the c-kit codon 816 hot-spot region by semi-nested PCR. Multiple immunohistochemical double-stainings were established to discriminate mast cells from other haematopoietic cell lineages, including neutrophils, monocytes, eosinophils, erythroblasts, megakaryocytes, and T-lymphocytes. In the present study *KIT* codon 816 mutations in non-mast cell lineages were detected in 54% (27/50) of cases, indicating a strong clonal relationship between SM and the AHNMD component. Intriguingly neutrophils revealed as a marker for a contribution of non mast cell lineages to the *KIT* D816V-positive neoplastic clone. *KIT* mutations were found in all examined haematopoietic cell lineages. In almost half of the cases, at least two additional cell lineages, beside mast cells, were *KIT* D816V-positive. Thus, SM-AHNMD seems to be a biphenotypic disease with a common early myeloid progenitor. In some cases *KIT* mutations could even be detected in T-lymphocytes, suggesting the presence of a common bipotent haematopoietic stem cell. The high frequency of *KIT* D816V in neoplastic myelomonocytic cells in SM-CMML indicates a strong clonal association and may point to a common precursor between SM and CMML in these patients. Further studies should investigate the prognostic and therapeutic relevance of *KIT* and „non-*KIT* mutations”.

VIII. LITERATURVERZEICHNIS

Akin C, Brockow K, D'Ambrosio C, Kirshenbaum AS, Ma Y, Longley BJ et al. Effects of tyrosine kinase inhibitor STI571 on human mast cells bearing wild-type or mutated c-kit. *Exp Hematol* 2003; 31(8): 686-92.

Austen KF. Systemic mastocytosis. *N Engl J Med* 1992; 326(9): 639-40.

Baghestanian M, Bankl H, Sillaber C, Beil WJ, Radaszkiewicz T, Füreder W, et al. A case of malignant mastocytosis with circulating mast cell precursors: biologic and phenotypic characterization of the malignant clone. *Leukemia* 1996; 10(1): 159-66.

Berezowska S, Flaig MJ, Ruëff F, Walz C, Haferlach T, Krokowski M, et al. Adult-onset mastocytosis in the skin is highly suggestive of systemic mastocytosis. *Mod Pathol* 2014; 27(1): 19-29.

Bernd HW, Sotlar K, Lorenzen J, Osieka R, Fabry U, Valent P, et al. Acute myeloid leukaemia with t(8;21) associated with "occult" mastocytosis. Report of an unusual case and review of the literature. *J Clin Pathol* 2004; 57(3): 324-8.

Brockow K, Akin C, Huber M, Scott LM, Schwartz LB, Metcalfe DD. Levels of mast-cell growth factors in plasma and in suction skin blister fluid in adults with mastocytosis: correlation with dermal mast-cell numbers and mast-cell tryptase. *J Allergy Clin Immunol* 2002; 109(1): 82-8.

Brockow K, Behrendt H, Ring J. Diagnose und Klassifikation der Mastozytose. *Allergologie* 2009; 6: 224-232.

Butterfield JH, Weiler D, Dewald G, Gleich GJ. Establishment of an immature mast cell line from a patient with mast cell leukemia. *Leukemia Research* 1988; 12(4): 345-55.

Castells MC, Irani AM, Schwartz LB. Evaluation of human peripheral blood leukocytes for mast cell tryptase. *J Immunol* 1987; 138(7): 2184-9.

Cazzola M, Della Porta MG, Malcovati L. The genetic basis of myelodysplasia and its clinical relevance. *Blood* 2013; 122(25): 4021-34.

Damaj G, Joris M, Chandesris O, Hanssens K, Soucie E, Canioni D, et al. ASXL1 but Not TET2 Mutations Adversely Impact Overall Survival of Patients Suffering Systemic Mastocytosis with Associated Clonal Hematologic Non-Mast-Cell Diseases. *PLoS One* 2014; 9(1): e85362.

Féger F, Ribadeau Dumas A, Leriche L, Valent P, Arock M. Kit and c-kit mutations in mastocytosis: a short overview with special reference to novel molecular and diagnostic concepts. *Int Arch Allergy Immunol* 2002; 127(2): 110-4.

Galli SJ, Nakae S, Tsai M. Mast cells in the development of adaptive immune responses. *Nat Immunol* 2005; 6: 135-42.

Galli SJ, Tsai M. Mast cells: versatile regulators of inflammation, tissue remodeling, host defense and homeostasis. *J Dermatol Sci* 2008; 49(1): 7-19.

Garcia-Montero AC, Jara-Acevedo M, Teodosio C, Sanchez ML, Nunez R, Prados A, et al. 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* 2006; 108(7): 2366-72.

Growney JD, Clark JJ, Adelsberger J, Stone R, Fabbro D, Griffin JD, et al. Activation mutations of human c-KIT resistant to imatinib mesylate are sensitive to the tyrosine kinase inhibitor PKC412. *Blood* 2005; 106(2): 721-4.

Hahn KA, Ogilvie G, Rusk T, Devauchelle P, Leblanc A, Legendre A, et al. Masitinib is safe and effective for the treatment of canine mast cell tumors. *J Vet Intern Med* 2008; 22(6): 1301-9.

Halaban R, Tyrrell L, Longley J, Yarden Y, Rubin J. Pigmentation and proliferation of human melanocytes and the effects of melanocyte-stimulating hormone and ultraviolet B light. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1994; 680: 290-301.

Harris NL, Jaffe ES, Diebold J, Flandrin G, Muller-Hermelink HK, Vardiman J, et al. The World Health Organization classification of neoplasms of the hematopoietic and lymphoid tissues: report of the Clinical Advisory Committee meeting Airlie House, Virginia, November, 1997. *Hematol J* 2000; 1 (1): 53-66.

Hauswirth AW, Födinger M, Fritz M, Müllauer L, Simonitsch-Klupp I, Streubel B, et al. Indolent systemic mastocytosis associated with atypical small lymphocytic lymphoma: a rare form of concomitant lymphoproliferative disease. *HumPathol* 2008; 39(6): 917-24.

Horny HP, Parwaresch MR, Lennert K. Bone marrow findings in systemic mastocytosis. *Hum Pathol* 1985; 16(8): 808-14.

Horny HP, Ruck M, Wehrmann M, Kaiserling E. Blood findings in generalized mastocytosis: evidence of frequent simultaneous occurrence of myeloproliferative disorders. *Br J Haematol* 1990; 76(2): 186-93.

Horny HP, Sillaber C, Menke D, Kaiserling E, Wehrmann M, Stehberger B, et al. Diagnostic value of immunostaining for tryptase in patients with mastocytosis. *Am J Surg Pathol* 1998; 22(9): 1132-40.

Horny HP, Sotlar K, Valent P. Mastocytosis: state of the art. *Pathobiology* 2007; 74(2): 121-32.

Horny HP, Sotlar K, Valent P, Hartmann K. Mastocytosis: a disease of the hematopoietic stem cell. *Dtsch Arztebl Int* 2008; 105 (40): 686-92.

Huizinga JD, Thuneberg L, Kluppel M, Malysz J, Mikkelsen HB, Bernstein A. W/kit gene required for interstitial cells of Cajal and for intestinal pacemaker activity. *Nature* 1995; 373: 347-349.

- Irani AM, Bradford TR, Kepley CL, Schechter NM, Schwartz LB. Detection of MCT and MCTC types of human mast cells by immunohistochemistry using new monoclonal anti-tryptase and anti-chymase antibodies. *J Histochem Cytochem* 1989; 37(10): 1509-15.
- Jordan JH, Walchshofer S, Jurecka W, Mosberger I, Sperr WR, Wolff K, et al. Immunohistochemical properties of bone marrow mast cells in systemic mastocytosis: evidence for expression of CD2, CD117/Kit, and bcl-x(L). *Hum Pathol* 2001; 32(5): 545-52.
- Kaur H, Arora A, Wengel J, Maiti S. Thermodynamic, counterion, and hydration effects for the incorporation of locked nucleic acid nucleotides into DNA duplexes. *Biochemistry* 2006; 45(23): 7347-55.
- Kim Y, Weiss LM, Chen YY, Pullarkat V. Distinct clonal origins of systemic mastocytosis and associated B-cell lymphoma. *Leuk Res* 2007; 31(12): 1749-54.
- 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* 1999; 94(7): 2333-42.
- Krishnaswamy G, Ajitawi O, Chi DS. The human mast cell: an overview. *Methods Mol Biol* 2006; 315: 13-34.
- Lambert F, Heimann P, Herens C, Chariot A, Bours V. A case of FIP1L1-PDGFR α -positive chronic eosinophilic leukemia with a rare FIP1L1 breakpoint. *J Mol Diagn* 2007; 9(3): 414-419.
- Lawrence ID, Warner JA, Cohan VL, Hubbard WC, Kagey-Sobotka A, Lichtenstein LM. Purification and characterization of human skin mast cells. Evidence for human mast cell heterogeneity. *J Immunol* 1987; 139(9): 3062-9.
- Lennert K, Parwaresch MR. Mast cells and mast cell neoplasia: a review. *Histopathology* 1979; 3 (5): 39-65.
- Letard S, Yang Y, Hanssens K, Palmérini F, Leventhal PS, Guéry S, et al. Gain-of-function mutations in the extracellular domain of KIT are common in canine mast cell tumors. *Mol Cancer Res* 2008; 6(7): 1137-45.
- Lim KH, Tefferi A, Lasho TL, Finke C, Patnaik M, Butterfield JH, et al. Systemic mastocytosis in 342 consecutive adults: survival studies and prognostic factors. *Blood* 2009; 113 (23): 5727-36.
- Lombardo LJ, Lee FY, Chen P, Norris D, Barrish JC, Behnia K, et al. Discovery of N-(2-chloro-6-methyl-phenyl)-2-(6-(4-(2-hydroxyethyl)-piperazin-1-yl)-2-methylpyrimidin-4-ylamino)thiazole-5-carboxamide (BMS-354825), a dual Src/Abl kinase inhibitor with potent antitumor activity in preclinical assays. *J Med Chem* 2004; 47(27): 6658-61.
- London CA, Galli SJ, Yuuki T, Hu ZQ, Helfand SC, Geissler EN. Spontaneous canine mast cell tumors express tandem duplications in the proto-oncogene c-kit. *Exp Hematol* 1999; 27: 689-697.

Longley BJ Jr, Metcalfe DD, Tharp M, Wang X, Tyrrell L, Lu SZ, et al. Activating and dominant inactivating c-KIT catalytic domain mutations in distinct clinical forms of human mastocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96(4): 1609-14.

Mangasser-Stephan K, Tag C, Reiser A, Gressner AM. Rapid genotyping of hemochromatosis gene mutations on the LightCycler with fluorescent hybridization probes. *Clin Chem* 1999; 45(10): 1875-8.

Maxson JE, Gotlib J, Pollyea DA, Fleischman AG, Agarwal A, Eide CA, et al. Oncogenic CSF3R mutations in chronic neutrophilic leukemia and atypical CML. *N Engl J Med* 2013; 368(19): 1781-90.

Meggendorfer M, Roller A, Haferlach T, Eder C, Dicker F, Grossmann V, et al. SRSF2 mutations in 275 cases with chronic myelomonocytic leukemia (CMML). *Blood* 2012; 120(15): 3080-8.

Metcalfe DD. The treatment of mastocytosis: an overview. *J Invest Dermatol*. 1991; 96(3 Suppl): 55-6.

Metcalfe DD, Baram D, Mekori YA. Mast cells. *Physiol Rev* 1997; 77(4): 1033-79.

Metcalfe DD. Regulation of normal and neoplastic human mast cell development in mastocytosis. *Transactions of the American Clinical and Climatological Association* 2005; 116: 185–204.

Metcalfe DD. Mast cells and mastocytosis. *Blood* 2008; 112 (4): 946-56.

Nagata H, Worobec AS, Oh CK, Chowdhury BA, Tannenbaum S, Suzuki Y, et al. Identification of a point mutation in the catalytic domain of the protooncogene c-kit in peripheral blood mononuclear cells of patients who have mastocytosis with an associated hematologic disorder. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995; 92(23): 10560-4.

Nangalia J, Massie CE, Baxter EJ, Nice FL, Gundem G, Wedge DC, et al. Somatic CALR mutations in myeloproliferative neoplasms with nonmutated JAK2. *N Engl J Med* 2013; 369(25): 2391-405.

Nelson RW, Couto CG. Mastzelltumoren. In: *Innere Medizin der Kleintiere* 5. Aufl.: 2010: 1231-1235.

Olafsson JH, Roupe G, Enerback L. Dermal mast cells in mastocytosis: fixation, distribution and quantitation. *Acta Derm Venereol*. 1986; 66: 16-22.

Orfao A, Garcia-Montero AC, Sanchez L, Escribano L; REMA. Recent advances in the understanding of mastocytosis: the role of KIT mutations. *Br J Haematol*. 2007; 138(1): 12-30.

Orum H, Nielsen PE, Egholm M, Berg RH, Buchardt O, Stanley C. Single base pair mutation analysis by PNA directed PCR clamping. *Nucleic Acids Res* 1993; 21: 5332–6.

- Orkin SH, Zon LI. Hematopoiesis: an evolving paradigm for stem cell biology, *Cell* 1008; 132: 631–644.
- Pardanani A, Lim KH, Lasho TL, Finke C, McClure RF, Li CY, et al. Prognostically relevant breakdown of 123 patients with systemic mastocytosis associated with other myeloid malignancies. *Blood* 2009; 114(18): 3769-72.
- Pardanani A. Systemic mastocytosis in adults: 2012 Update on diagnosis, risk stratification, and management. *Am J Hematol.* 2012; 87(4): 401-11.
- Parker RI. Hematologic aspects of mastocytosis. II. management of hematologic disorders in association with systemic mast cell disease. *J Invest Dermatol* 1991; 96: 52–4.
- Przepiorka D, Giralt S, Khouri I, Champlin R, Bueso-Ramos C. Allogeneic marrow transplantation for myeloproliferative disorders other than chronic myelogenous leukemia: review of forty cases. *Am J Hematol* 1998; 57(1): 24-8.
- Prussin C, Metcalfe DD. IgE, mast cells, basophils, and eosinophils. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 111(2): 486–94.
- Pullarkat VA, Bueso-Ramos C, Lai R, Kroft S, Wilson CS, Pullarkat ST, et al. Systemic mastocytosis with associated clonal hematological non-mast-cell lineage disease: analysis of clinicopathologic features and activating c-kit mutations. *Am J Hematol* 2003; 73(1): 12-7.
- Pullarkat ST, Pullarkat V, Kroft SH, Wilson CS, Ahsanuddin AN, Mann KP, et al. Systemic mastocytosis associated with t(8;21)(q22;q22) acute myeloid leukemia. *J Hematopathol* 2009; 2(1): 27–33.
- Ronnov-Jessen D, Lovgreen-Nielsen P, Horn T. Persistence of systemic mastocytosis after allogeneic bone marrow transplantation in spite of complete remission of the associated myelodysplastic syndrome. *Bone Marrow Transplant* 1991; 8: 413–5.
- Sagher F, Even-Paz Z. Incidence of mastocytosis. In: *Mastocytosis and the mast cells.* 1967: 14-7.
- Schindler T, Bornmann W, Pellicena P, Miller WT, Clarkson B, Kuriyan J. Structural mechanism for STI-571 inhibition of abelson tyrosine kinase. *Science* 2000; 289(5486): 1938-42.
- Schütze K, Lahr G. Identification of expressed genes by laser-mediated manipulation of single cells. *Nat Biotechnol* 1998; 16(8): 737-42.
- Schwaab J, Schnittger S, Sotlar K, Walz C, Fabarius A, Pffirmann M, et al. Comprehensive mutational profiling in advanced systemic mastocytosis. *Blood* 2013; 122(14): 2460-6.
- Schwartz LB, Foley JV, Austen KF, Soter NA, Shepard R, Murphy GF. Localization of tryptase to human cutaneous mast cells and keratinocytes by immunofluorescence and

immunoperoxidase cytochemistry with monoclonal antitryptase antibody. *J Allergy Clin Immunol* 1985; 76: 182-8.

Schwartz LB, Sakai K, Bradford TR, Ren S, Zweiman B, Worobec AS, et al. The alpha form of human tryptase is the predominant type present in blood at baseline in normal subjects and is elevated in those with systemic mastocytosis. *J Clin Invest* 1995; 96(6): 2702-10.

Simmons PJ, Aylett GW, Niutta S, To LB, Juttner CA, Ashman LK. c-kit is expressed by primitive human hematopoietic cells that give rise to colony-forming cells in stroma-dependent or cytokine-supplemented culture. *Experimental Hematology* 1994; 22: 157-65.

Sotlar K, Marafioti T, Griesser H, Theil J, Aepinus C, Jaussi R, et al. Detection of c-kit mutation Asp 816 to Val in microdissected bone marrow infiltrates in a case of systemic mastocytosis associated with chronic myelomonocytic leukaemia. *Mol Pathol* 2000; 53(4): 188-93.

Sotlar K, Escribano L, Landt O, Möhrle S, Herrero S, Torrelo A, et al. One-step detection of c-kit point mutations using peptide nucleic acid-mediated polymerase chain reaction clamping and hybridization probes. *Am J Pathol* 2003; 162(3): 737-46.

Sotlar K, Bache A, Stellmacher F, Bültmann B, Valent P, Horny HP. Systemic mastocytosis associated with chronic idiopathic myelofibrosis: a distinct subtype of systemic mastocytosis associated with a [corrected] clonal hematological non-mast [corrected] cell lineage disorder carrying the activating point mutations KITD816V and JAK2V617F. *J Mol Diagn* 2008; 10(1): 58-66.

Sotlar K, Colak S, Födinger M, Valent P, Horny HP. Nachweismethoden von c-kit-Mutationen bei Mastozytosen. *Allergologie* 2009; 233-40.

Sotlar K, Colak S, Bache A, Berezowska S, Krokowski M, Bültmann B, et al. Variable presence of KITD816V in clonal haematological non-mast cell lineage diseases associated with systemic mastocytosis (SM-AHNMD). *J Pathol* 2010; 220(5): 586-95.

Sotlar K, Cerny-Reiterer S, Petat-Dutter K, Hessel H, Berezowska S, Müllauer L, et al. Aberrant expression of CD30 in neoplastic mast cells in high-grade mastocytosis. *Mod Pathol* 2011; 24(4): 585-95.

Sotlar K, Valent P, Horny HP. Mastocytosis and eosinophilic leukemia: diagnostics and classification. *Pathologe* 2012; 33(6): 539-52.

Sperr WR, Walchshofer S, Horny HP, Födinger M, Simonitsch I, Fritsche-Polanz R, et al. Valent P. Systemic mastocytosis associated with acute myeloid leukaemia: report of two cases and detection of the c-kit mutation Asp-816 to Val. *Br J Haematol* 1998; 103(3): 740-9.

Sperr WR, Horny HP, Lechner K, Valent P. Clinical and biologic diversity of leukemias occurring in patients with mastocytosis. *Leuk Lymphoma* 2000; 37(5-6): 473-86.

Strohmeier T, Reese D, Press M, Ackermann R, Hartmann M, Slamon D. Expression of the c-kit proto-oncogene and its ligand stem cell factor (SCF) in normal and malignant human testicular tissue. *Journal of Urology* 1995; 153: 511–5.

Stoecker MM, Wang E. Systemic mastocytosis with associated clonal hematologic nonmast cell lineage disease: a clinicopathologic review. *Arch Pathol Lab Med* 2012; 136(7): 832-8.

Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, et al. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues 4. Auflage: 2008.

Tahir M, Anwar M, Raziq F. Utility of Immunological Marker CD14 in Identifying Monocytic Component in Acute Leukaemia. *JPMI* 2004; 18(4): 553-7.

Thienemann F, Henz BM, Babina M. Regulation of mast cell characteristics by cytokines: divergent effects of interleukin-4 on immature mast cell lines versus mature human skin mast cells. *Arch Dermatol Res* 2004; 296(3): 134-8.

Travis WD, Li CY, Yam LT, Bergstralh EJ, Swee RG. Significance of systemic mast cell disease with associated hematologic disorders. *Cancer* 1988; 62(5): 965-72.

Tzankov A, Sotlar K, Muhlematter D, Theocharides A, Went P, Jotterand M, et al. Dirnhofer S. Systemic mastocytosis with associated myeloproliferative disease and precursor B lymphoblastic leukaemia with t(13;13)(q12;q22) involving FLT3. *J Clin Pathol* 2008; 61(8): 958-61.

Ustun C, Corless CL, Savage N, Fiskus W, Manaloor E, Heinrich MC, et al. Chemotherapy and dasatinib induce long-term hematologic and molecular remission in systemic mastocytosis with acute myeloid leukemia with KIT D816V. *Leuk Res* 2009; 33(5): 735-41.

Valent P, Horny HP, Escribano L, Longley BJ, Li CY, Schwartz LB, et al. Diagnostic criteria and classification of mastocytosis: a consensus proposal. *Leukemia Research* 2001; 25: 603–625.

Valent P, Akin C, Sperr WR, Mayerhofer M, Födinger M, Fritsche-Polanz R, et al. Mastocytosis: pathology, genetics, and current options for therapy. *Leuk Lymphoma* 2005; 46(1): 35-48.

Valent P, Akin C, Escribano L, Födinger M, Hartmann K, Brockow K, et al. Standards and standardization in mastocytosis: consensus statements on diagnostics, treatment recommendations and response criteria. *Eur J Clin Invest* 2007; 37(6): 435-53.

Valent P, Sotlar K, Sperr WR, Escribano L, Yavuz S, Reiter A, et al. Refined diagnostic criteria and classification of mast cell leukemia (MCL) and myelomastocytic leukemia (MML): a consensus proposal. *Annals of Oncology* 2014, in press.

von Bubnoff N, Gorantla SH, Kancha RK, Lordick F, Peschel C, Duyster J. The systemic mastocytosis-specific activating cKit mutation D816V can be inhibited by the tyrosine kinase inhibitor AMN107. *Leukemia* 2005; 19(9): 1670-1.

Wang SA, Hutchinson L, Tang G, Chen SS, Miron PM, Huh YO, et al. Systemic mastocytosis with associated clonal hematological non-mast cell lineage disease: clinical significance and comparison of chromosomal abnormalities in SM and AHNMD components. *Am J Hematol* 2013; 88(3): 219-24.

Wittwer CT, Ririe KM, Andrew RV, David DA, Gundry RA, Balis UJ. The LightCycler: a microvolume multisample fluorimeter with rapid temperature control. *Biotechniques* 1997; 22(1): 176-81.

Yamada O, Kobayashi M, Sugisaki O, Ishii N, Ito K, Kuroki S, et al. Imatinib elicited a favorable response in a dog with a mast cell tumor carrying a c-kit c.1523A>T mutation via suppression of constitutive KIT activation. *Vet Immunol Immunopathol* 2011; 142(1-2): 101-6.

Yang F, Tran TA, Carlson JA, Hsi ED, Ross CW, Arber DA. Paraffin section immunophenotype of cutaneous and extracutaneous mast cell disease: comparison to other hematopoietic neoplasms. *Am J Surg Pathol* 2000; 24: 703-709.

Yarden Y, Kuang WJ, Yang-Feng T, Coussens L, Munemitsu S, Dull TJ, et al. Human proto-oncogene c-kit: a new cell surface receptor tyrosine kinase for an unidentified ligand. *EMBO J* 1987; 6(11): 3341-51.

IX. ANHANG

Tabelle Anhang 1: Detaillierte Patientendaten, Laborparameter und Molekularbefunde

Nr	Diagnose	Sex	Alter (Jahre)	Hämatologische Parameter						Differentialblutbild			Klinische Parameter C-findings	Kit Codon 816 Mutationen		
				MC (%/OT)	Hb (g/dl)	Hkt (%)	WBC (Tsd/µl)	P (Tsd/µl)	RBC (Mio/µl)	NG (10 ⁹ /l)	EG (10 ⁹ /l)	M (10 ⁹ /l)		Gesamt DNA 1*/2#/3\$	MR	T-Zellen
1	ASM-CEL	m	55	60	8,6	26	3,0	13	n.u.	0,9	1,3	0,1	C,H,S,M	-/+/+	-	-
2	ASM-CEL	f	38	50	13	38	6,6	279	4,3	3,5	1,3	0,3	-	k.A./k.A./+	-	-
3	ASM-CEL	m	65	30	7,5	23,3	15	198	2,7	6,3	6,6	0,3	C	+/+/+	+	-
4	SM-CEL	m	75	10	6,8	27	41	79	2,0	8,6	27,1	2,1	C	-/+/+	-	-
5	SM-CEL	m	74	10	10	30,7	8,1	56	3,5	3,1	3,6	0,3	C	+/+/+	+	-
6	ASM-MPN-Eo	m	64	60	5,7	20,4	13,9	95	3,2	8,5	1,8	1,7	C	+/+/+	+	-
7	SM-MPN-U	m	77	25	10,8	33,5	105,1	43	3,6	2,1	2,1	2,1	C	+/+/+	+	+
8	SM-MPN-U	m	64	5	16	n.u.	5,2	439	n.u.	n.u.	0,1	0,2	n.u.	-/-/+	-	-
9	ASM-CMML	m	58	70-80	8,8	28	10,9	60	n.u.	5,0	0,7	1,0	C	+/+/+	+	-
10	ASM-CMML-1	m	60	50	11,3	34	9,0	80	n.u.	4,7	2,0	1,2	C	+/+/+	+	-
11	ASM-CMML-1	f	59	50	11,3	34	7,9	81	n.u.	5,0	1,0	1,2	C	k.A./k.A./+	+	-
12	ASM-CMML-1	f	60	30	10,1	31	29,4	158	n.u.	19,7	0,9	3,9	n.u.	+/+/+	+	-
13	ASM-CMML-1	m	70	80	12,7	41	10,2	67	5,3	7,2	0,2	4,4	C	+/+/+	+	-
14	ASM-CMML-1	f	69	50	9,9	32	9,6	126	3,1	4,5	0,1	1,4	C	⊕/⊕/⊕	⊕	⊕
15	ASM-CMML-1	m	72	40	9,2	29	17,1	86	3,3	3,1	8,2	2,6	C	+/+/+	+	-
16	SM-CMML-1	f	66	5	12,2	39	31,4	99	4,3	2,2	0,3	2,5	C	k.A./k.A./+	+	+
17	SM-CMML-1	m	75	10-15	12,1	36	6,4	86	4,3	4,0	0	1,4	C	+/+/+	-	-
18	SM-CMML-1	m	56	90	11,2	33,6	9,3	93	4,1	5,3	0,3	2,1	C	+/+/+	+	-
19	ASM-CMML-2	f	72	65	13,0	39,2	14,4	170	4,4	8,5	0,8	4,1	H,M	+/+/+	+	-
20	ASM-CMML-1	f	71	95	8,9	27,7	13,9	46	3,0	0,4	0,1	2,4	C	+/+/+	-	-
21	ASM-CMML-1	m	59	65	5,0	29	9,5	86	3,1	6,0	0,4	1,2	C,H,S	+/+/+	+	-
22	aMCL-CMML-1	m	52	60-70	5,2	25	12,7	59	2,7	6,3	0,9	2,0	C	+/+/+	+	-
23	ASM-CMML-1	m	71	30	11,3	35	5,3	48	3,9	2,3	0,3	1,2	C	+/+n.u.	-	-
24	aMCL-CMML-2	f	76	50	8,5	28	57,3	95	2,6	14,7	n.u.	28,0	C	-/+/+	-	-
25	ASM-CMML-1	f	76	30	9,6	29	2,9	163	n.u.	0,2	0,1	1,9	C	+/+/+	-	-
26	SM-CMML-2	m	54	10	10,4	29,5	6,4	75	3,5	3,8	0	1,4	C	+/+/+	-	-
27	SM-CMML-1	m	79	20	9,8	29,7	42,4	79	3,4	30,5	0,4	7,6	C	+/+/+	-	-
28	SM-CMML-1	m	61	70	15,9	47,3	24,9	640	5,8	19	0,4	2,4	-	+/+/+	-	-

29	ASM-CMML-1	m	71	15	8,3	27,9	21,6	53	3,0	11,6	3,7	1,1	C,H,S,M	+/+/+	+	-
30	ASM-CMML-1	m	72	25	11,2	n.u.	8,4	82	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	C	+/+/+	+	-
31	ISM-CMML-1	m	69	15-20	12,3	n.u.	12,5	100	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	+/+/+	+	-
32	ASM-CMML-1	f	64	25-30	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	+/+/+	+	-
33	ASM-MDS/MPN-U	f	68	70-80	9,3	28	6,8	95	2,7	0,9	2,2	0,6	C,H,M	+/+/+	-	-
34	ASM-MDS/MPN-U	m	69	30	10,3	32	5,0	88	3,5	2,3	0,8	1,0	C	+/+/+	-	-
35	ASM-MDS/MPN-U	m	71	35	8,2	26	3,5	114	2,8	2,0	0,1	0,8	C,S	+/+/+	+	-
36	ASM-MDS/MPN-U	f	73	65	8,2	25	4,8	27	2,8	1,6	1,8	0,5	C	+/+/+	-	-
37	ASM-MDS/MPN-U	m	64	30	11,5	33	3,6	110	3,3	1,4	0,1	0,9	-	+/+/+	-	-
38	SM-MDS/MPN-U	m	72	20	9,8	32	25,3	317	n.u.	16,7	5,6	0,5	C	+/+/+	+	-
39	ASM-MDS/MPN-U	f	41	55	9,8	28,9	20,4	177	n.u.	8,6	0,4	0,4	C	+/+/+	+	-
40	SM-MDS/MPN-U	n.b.	59	70	7,8	38	17,6	90	3,9	7,2	0,2	0,9	C,H	+/+/+	+	-
41	ASM-MDS/MPN-U	m	70	20	6,3	32	15,6	64	3,4	12,5	0,8	0,2	C	+/+/+	-	-
42	ASM-MDS/MPN-U	f	67	60	10,7	32,2	5,1	80,1	n.u.	2,9	0	0,9	C	-+/+	+	-
43	SM-MDS/MPN-U	m	46	5-10	10,2	33,1	4,1	57	4,2	2,4	0,2	0,6	C	+/+/+	-	-
44	ASM-RCMD	n.b.	65	60	8,4	26	3,6	25	2,6	2,3	0	0,2	C	+/+/+	+	-
45	ASM-RARS	f	68	95	8,2	25	18,1	95	4,0	n.u.	0,9	3,9	C	+/+/+	-	-
46	ASM-RCMD	m	71	75	11,1	33,9	2,5	99	4,0	0,6	0,3	0,4	C	+/+/+	-	-
47	SM-RCMD	f	51	10	9	27	0,8	74	2,6	0,5	0,1	0,1	C	+/+/+	-	-
48	SM-MDS del 5q	m	75	10-20	15,4	n.u.	10,9	102	n.u.	n.u.	0,1	0,5	n.u.	+/+/+	+	+
49	ASM-AML-M7	m	70	25	8,3	24	1,5	29	2,8	0,7	0	0,2	C	-+/+	-	-
50	SM-sAML	m	67	3-5	9,8	29	0,5	18	3,4	0,2	0	0	C	+/+/+	-	-
Σ= 50	SM-AHNMD	32/16	65	41,5	10,0	30,9	14,7	112,1	3,5	5,9	1,7	2,0	42	41/46/49	27	4

ISM= Indolente SM, ASM= Aggressive SM, MCL= Mastzellenleukämie, CEL= Chronisch eosinophile Leukämie, MPN-Eo= Eosinophilie-assoziierte myeloproliferative Erkrankung, MPN-U= Unklassifizierte Myeloproliferative Neoplasie, CMML= Chronisch myelomonozytäre Leukämie, MPN/MDS-U= Unklassifizierte Myeloproliferative/Myelodysplastische Neoplasie, RCMD= Refraktäre Zytopenie mit multilineärer Dysplasie mit und ohne Ringsideroblasten, RARS= Refraktäre Zytopenie mit Ringsideroblasten, MDS del 5q= Myelodysplastisches Syndrom mit Deletion des Chromosoms 5q, AML-M7= Akute megakaryoblastäre Leukämie, sAML= sekundäre akute myeloische Leukämie, MC= Mastzellen, Hb= Hämoglobin, Hkt= Hämatokrit, WBC= Leukozyten, P= Thrombozyten, RBC= Erythrozyten, NG= Neutrophile Granulozyten, EG= Eosinophile Granulozyten, M= Monozyten, MR= myeloische Reihen, C-findings: C= Knochenmarkszytopenie, H= palpable Lebervergrößerung mit Leberfunktionsstörung, Aszites und/oder portaler Hypertension, S= palpable Milzvergrößerung mit Milzüberfunktion (Hypersplenismus), M= Malabsorption mit Hypoalbuminämie und Gewichtsverlust, 1^{*}= konventionelle PCR, 2[#]= LNA-single PCR, 3[§]= LNA semi-nested PCR, + = D816V, ⊕ = D816Y, - = Wildtyp, n.u.= nicht untersucht, n.b.= nicht bekannt.

Tabelle Anhang 2: Übersicht der Ergebnisse der Mikrodissektion.

Fall	Diagnose	MR						LR
		GMP			MEP			
		MZ	NG	M	EG	Epz	Mk	
48	SM-MDS del 5q	D816V	D816V	n.u.	D816V	D816V	D816V	D816V
14	ASM-CMML-1	D816Y	D816Y	D816Y	wt	D816Y	D816Y	D816Y
16	SM-CMML-1	D816V	D816V	D816V	D816V	D816V	n.u.	D816V
7	SM-MPN-U	D816V	D816V	D816V	n.u.	n.u.	n.u.	D816V
38	SM-MDS/MPN-U	D816V	D816V	n.u.	D816V	D816V	D816V	wt
30	ASM-CMML-1	D816V	D816V	n.u.	D816V	D816V	D816V	wt
12	ASM-CMML-1	D816V	D816V	n.u.	D816V	D816V	k.A.	wt
15	ASM-CMML-1	D816V	D816V	D816V	D816V	D816V	k.A.	wt
19	ASM-CMML-1	D816V	D816V	D816V	D816V	D816V	n.u.	wt
22	aMCL-CMML-1	D816V	D816V	D816V	D816V	D816V	n.u.	wt
31	ISM-CMML-1	D816V	D816V	D816V	D816V	D816V	k.A.	wt
5	SM-CEL	D816V	D816V	n.u.	D816V	D816V	k.A.	wt
13	ASM-CMML-1	D816V	D816V	n.u.	wt	D816V	k.A.	wt
32	ASM-CMML-1	D816V	D816V	D816V	wt	D816V	k.A.	wt
34	ASM-MDS/MPN-U	D816V	D816V	n.u.	n.u.	D816V	n.u.	wt
11	ASM-CMML-1	D816V	D816V	D816V	D816V	wt	n.u.	wt
18	SM-CMML-1	D816V	D816V	D816V	D816V	n.u.	k.A.	wt
29	ASM-CMML-1	D816V	D816V	n.u.	D816V	n.u.	wt	wt
39	ASM-MDS/MPN-U	D816V	D816V	n.u.	D816V	wt	wt	wt
3	ASM-CEL	D816V	D816V	n.u.	D816V	wt	n.u.	wt
9	ASM-CMML-1	D816V	D816V	D816V	n.u.	wt	k.A.	wt
10	ASM-CMML-1	D816V	D816V	D816V	wt	wt	k.A.	wt
21	ASM-CMML-1	D816V	D816V	D816V	wt	wt	k.A.	wt
42	ASM-CMML-1	D816V	D816V	n.u.	k.A.	k.A.	n.u.	k.A.
41	ASM-MDS/MPN-U	D816V	D816V	n.u.	n.u.	n.u.	k.A.	wt
6	ASM-MPN-Eo	D816V	D816V	n.u.	wt	wt	wt	wt
44	ASM-RCMD	D816V	D816V	n.u.	wt	k.A.	k.A.	wt
26	SM-CMML-2	D816V	wt	wt	wt	wt	wt	wt
27	SM-CMML-1	D816V	wt	wt	wt	k.A.	k.A.	wt
33	ASM-MDS/MPN-U	D816V	wt	wt	wt	wt	k.A.	wt
20	ASM-CMML-1	D816V	wt	wt	n.u.	n.u.	n.u.	wt
25	ASM-CMML-1	D816V	wt	wt	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.
35	ASM-MDS/MPN-U	D816V	wt	wt	n.u.	n.u.	n.u.	wt
1	ASM-CEL	D816V	wt	n.u.	wt	wt	wt	wt
2	ASM-CEL	D816V	wt	n.u.	wt	wt	wt	wt
4	SM-CEL	D816V	wt	n.u.	wt	wt	wt	wt
8	SM-MPN-U	D816V	wt	n.u.	wt	wt	wt	wt
36	ASM-MDS/MPN-U	D816V	wt	n.u.	wt	wt	wt	wt
37	ASM-MDS/MPN-U	D816V	wt	n.u.	wt	n.u.	n.u.	wt
45	ASM-RARS	D816V	wt	n.u.	wt	n.u.	n.u.	n.u.
50	SM-sAML	D816V	wt	n.u.	n.u.	wt	wt	wt
17	SM-CMML-1	D816V	wt	n.u.	n.u.	wt	wt	wt

28	SM-CMML-1	D816V	wt	n.u.	n.u.	wt	wt	wt
43	SM-MDS/MPN-U	D816V	wt	n.u.	n.u.	wt	n.u.	wt
47	SM-RCMD	D816V	wt	n.u.	n.u.	wt	k.A.	n.u.
49	ASM-AML-M7	D816V	wt	n.u.	n.u.	n.u.	wt	wt
24	aMCL-CMML-2	D816V	wt	n.u.	n.u.	k.A.	k.A.	wt
23	ASM-CMML-1	D816V	wt	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.
40	SM-MDS/MPN-U	D816V	wt	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.
46	ASM-RCMD	D816V	wt	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.
Σ=50	SM-AHNMD	50/50	27/50	13/19	15/32	14/33	4/17	4/43

SM= Systemische Mastozytose; ISM= Indolente SM, ASM= Aggressive SM, MCL= Mastzellenleukämie, CEL= Chronisch eosinophile Leukämie, MPN-Eo= Eosinophilie-assoziierte myeloproliferative Erkrankung, MPN-U= Unklassifizierte Myeloproliferative Neoplasie, CMML= Chronisch myelomonozytäre Leukämie, MPN/MDS-U= Unklassifizierte Myeloproliferative/Myelodysplastische Neoplasie, RCMD= Refraktäre Zytopenie mit multilineärer Dysplasie mit und ohne Ringsideroblasten, RARS= Refraktäre Zytopenie mit Ringsideroblasten, MDS del 5q= Myelodysplastisches Syndrom mit Deletion des Chromosoms 5q, AML-M7= Akute megakaryoblastäre Leukämie, sAML= sekundäre akute myeloische Leukämie, MR= myeloische Reihe, LR= lymphatische Reihe, GMP= Granulozyten-Monozyten Vorläuferzelle, MEP= Megakaryozyten-Erythrozyten Vorläuferzelle, MZ= Mastzellen, NG= neutrophile Granulozyten, M= Monozyten, EG= eosinophile Granulozyten, Epz= Erythroblasten, Mk= Megakaryozyten, wt= Wildtyp, n.u. = nicht untersucht, k.A. = keine Amplifikation.

X. DANKSAGUNG

Meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. vet. med. Walter Hermanns danke ich für die Betreuung und die Möglichkeit der Dissertation an der tiermedizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München.

Herrn Prof. Dr. med. Thomas Kirchner danke ich für die Möglichkeit, diese Dissertation an seinem Institut in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. med. Karl Sotlar durchführen zu können.

Herrn Prof. Dr. med. Karl Sotlar danke ich vor allem für die gute Betreuung. Auch wenn Ihnen die Arbeit bis zum Hals stand, hatten Sie immer ein offenes Ohr für mich.

Außerdem danke ich Herrn Prof. Dr. med Hans-Peter Horny für die hilfreichen Diskussionen, die Unterstützung bei der Diagnosestellung und bei allen sonstigen fachlichen Fragen.

Bei Andrea Sendelhofert und Anja Heier möchte ich mich besonders für die Einarbeitung in der Immunhistochmie und die großartige Unterstützung beim Anfertigen der immunhistochemischen Färbungen bedanken.

Ganz besonderen Dank schulde ich meinen Kollegen, Karina Petat-Dutter und Daniel Hofmann für die vorbildliche Zusammenarbeit und fachliche Unterstützung im Laboralltag. Auch in noch so ausweglosen Situationen standen mir beide zu jeder Zeit mit Rat und Tat zur Seite.

Zum Schluss noch ein Dankeschön an meine Eltern, für ihre Unterstützung beim Studium und vielen anderen Lebenslagen und meinem Lebenspartner Emanuel Rognoni für die guten Tipps bezüglich des „Flows“ der Arbeit und vielen wissenschaftlichen Diskussionen.