

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

Genetische Instabilität bei myeloischen Neoplasien

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doctor scientiarum humanarum (Dr. sc. hum.)
der
Medizinischen Fakultät Mannheim
der Ruprecht-Karls-Universität
zu
Heidelberg

vorgelegt von
Nicole Naumann

aus
Dresden
2017

Dekan: Herr Prof. Dr. med. Sergij Goerd

Referent: Frau apl. Prof. Dr. rer. nat. Alice Fabarius

Für meine

Eltern

und Großeltern Ursula und Dimiter Swatew

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis.....	III
1. Einleitung	1
1.1 Myeloische Neoplasien	1
1.2 Mastzellen.....	2
1.2.1 Geschichte der Mastzellen.....	2
1.2.2 Entwicklung, Lokalisation und Funktion von Mastzellen.....	3
1.2.3 CD-Antikörper und Färbeverhalten	4
1.3 Rezeptortyrosinkinase CD117/KIT	5
1.3.1 Struktur und Signaltransduktion von KIT	5
1.3.2 Mutationen in <i>KIT</i>	6
1.4 Mastozytose	8
1.4.1 WHO Klassifikation	8
1.4.2 Klinik der systemischen Mastozytosen.....	9
1.4.3 Prognose.....	10
1.4.4 Therapie	10
1.5 Zytogenetik.....	11
1.6 Molekulargenetik	13
1.7 Fragestellungen	15
2. Material und Methoden	17
2.1 Material.....	17
2.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	17
2.1.2 Chemikalien.....	18
2.1.3 Enzyme	18
2.1.4 KIT Systeme.....	19
2.1.5 Software	19
2.1.6 FISH Sonden	19
2.1.7 PCR Sonden.....	19
2.1.8 Puffer und Lösungen.....	20
2.1.9 Synthetische Oligonukleotide (Primer).....	21
2.1.10 Patientenproben	21
2.2 Methoden.....	22
2.2.1 Leukozytenisolation aus PB und KM.....	22
2.2.2 Isolierung mononukleärer Zellen (MNC) aus Knochenmark.....	22
2.2.3 DNA-Isolation mittels QIAcube.....	23
2.2.4 RNA-Isolation	24

2.2.5 Qualitätskontrolle von DNA und RNA.....	25
2.2.6 cDNA Synthese.....	25
2.2.7 Qualitative Polymerase Kettenreaktion (PCR).....	26
2.2.8 Quantitative Real Time PCR (qRT-PCR)	28
2.2.9 Screening von möglichen Zusatzmutationen	29
2.2.10 Agarosegelelektrophorese	30
2.2.11 Sequenzierung nach Sanger	30
2.2.12 Kryokonservierung.....	31
2.2.13 Auftauen der Zellen	31
2.2.14 Bestimmen der Lebendzellzahl	31
2.2.15 CFU-GM Assay	31
2.2.16 Amplifikation von Kolonie-DNA.....	32
2.2.17 Zytocentrifugation	32
2.2.18 FISH	33
2.2.19 Zytogenetik.....	34
2.2.20 Giemsa-Färbung	35
3. Ergebnisse	36
3.1 Patientencharakteristika	36
3.1.1 Erstellen des Karyotyps.....	39
3.1.2 Auftreten von Zusatzmutationen	41
3.1.3 Detaillierte Patientenübersicht von 83 Patienten mit fortgeschrittener SM	42
3.1.4 Mutationskombinationen	44
3.1.5 Klinische und laborchemische Parameter	45
3.1.6 Einteilung des Karyotyps in „geringes Risiko“ und „hohes Risiko“	48
3.1.7 Aberranter Karyotyp und Krankheitsverlauf (n=16)	49
3.1.8 Aberranter Karyotyp (n=16).....	51
3.1.9 Kaplan-Meier Überlebenskurven.....	53
3.2 Kolonien von hämatopoetischen Zellen	55
3.2.1 Detektion von Mutationen in Kolonien	55
3.2.2 Detektion chromosomaler Aberrationen in Kolonien.....	57
3.2.3 Gemeinsames Vorkommen von Mutationen und chromosomalen Aberrationen in Kolonien	59
3.2.4 Mutationshierarchie.....	60
4. Diskussion	63
5. Zusammenfassung	77
6. Literaturverzeichnis	79
7. Anhang.....	95
8. Lebenslauf.....	97
9. Danksagung	98

Abkürzungsverzeichnis

AHN	assoziierte hämatologische Neoplasie
AML	akute myeloische Leukämie
AS	Aminosäure
ASM	aggressive systemische Mastozytose
ASXL1	additional sex combs like 1
CEL	chronische Eosinophilenleukämie
CFU-GM	„colony forming unit – granulocyte-macrophage“
CLL	chronische lymphatische Leukämie
CML	chronische myeloische Leukämie
CMML	chronische myelomonozytäre Leukämie
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
HES	hypereosinophiles Syndrom
IFN	Interferon
ISCN	International System for Human Cytogenomic Nomenclature
ISM	indolente systemische Mastozytose
JAK2	Januskinase 2
JM	Juxtamembran
KIT	Stammzellfaktor-Rezeptor KIT
KM	Knochenmark
MCL	Mastzelleukämie
MDS	myelodysplastische Syndrome
MF	Myelofibrose
MNC	mononukleäre Zellen
MPN	myeloproliferative Neoplasien
MPNu	unklassifizierte myeloproliferative Neoplasien
NPM1	Nucleophosmin 1
PB	peripheres Blut
PCR	Polymerasekettenreaktion
PV	Polycythaemia Vera
RUNX1	runt related transcription factor 1
SCF	Stammzellfaktor
SM	systemische Mastozytose
SSM	schwelende systemische Mastozytose
SZT	Stammzelltransplantation
TET2	tet methylcytosine dioxygenase 2
TK	Tyrosinkinase
TP53	tumor protein p53
WHO	World Health Organisation

1. Einleitung

Mit dem Satz „Die Medizin hat eine große Zukunft hinter sich.“ bringt der Schweizer Politologe und Gesundheitsökonom Gerhard Kocher die Wichtigkeit von stets wachsendem Verständnis für molekulare, pathologische Prozesse zur Erforschung von Krankheiten auf den Punkt. Auch hämatologische Erkrankungen sind in den vergangenen Jahren und Jahrzehnten immer besser verstanden worden. Bis heute konnten etliche Entitäten identifiziert und auch klassifiziert werden, dennoch gibt es enorme Unterschiede in diagnostischer Eindeutigkeit und im Therapieansprechen. Ausschließlich die immer fortwährende Erforschung genetischer Komponenten, wie die Identifizierung und Charakterisierung pathologischer Mutationen auf DNA- und Protein-Ebene, oder die Detektion von Abnormalitäten auf chromosomaler Ebene, ermöglichen ein besseres Verständnis klinisch überlappender Krankheitsbilder und erlauben das Einsetzen zielgerichteter Therapien.

1.1 Myeloische Neoplasien

Seit der *World Health Organisation* (WHO) Klassifikation von 2008 umfasst der Überbegriff der myeloischen Neoplasien verschiedene hämatologische Entitäten. Darunter fallen die myeloproliferativen Neoplasien (MPN), die akuten myeloischen Leukämien (AML), myelodysplastische Syndrome (MDS), myelodysplastisch/myeloproliferative Neoplasien (MDS/MPN) und die myeloischen und lymphatischen Neoplasien mit Eosinophilie und Abnormalitäten von *PDGFRA*, *PDGFRB* und *FGFR1* (MLN-eo) (Swerdlow et al., 2008).

Die bisher als MPN geltende Mastozytose, die in dieser Arbeit näher beleuchtet werden soll, reiht sich, aufgrund neuester Erkenntnisse über die Rolle bestimmter genetischer Faktoren auf die Prognose betroffener Patienten, seit der jüngsten WHO Klassifikation von 2016 als eine eigenständige Entität in die Gruppen der myeloischen Neoplasien ein (Abb. 1; Arber et al., 2016). Trotz des wachsenden Verständnisses über molekulare Veränderungen bei der Mastozytose konnte bisher nur wenig über die Rolle von zytogenetischen Abnormalitäten gezeigt werden.

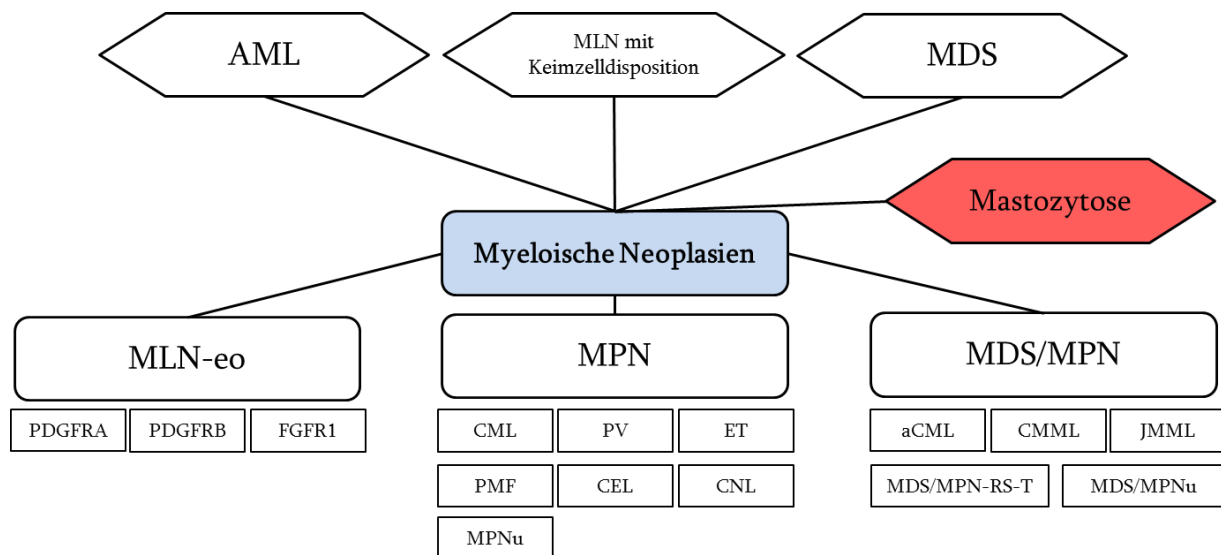


Abb. 1: Erkrankungen der myeloischen Neoplasien nach den Richtlinien der WHO 2016. Abkürzungen: AML, akute myeloische Leukämie; MLN, myeloische und lymphatische Neoplasie; MDS, myelodysplastische Syndrome; MLN-eo, myeloische und lymphatische Neoplasie mit Eosinophilie; MPN, myeloproliferative Neoplasie; CML, chronische myeloische Leukämie; PV, Polycythaemia Vera; ET, essentielle Thrombozythämie; PMF, primäre Myelofibrose; CEL, chronische Eosinophilenleukämie; CNL, chronische Neutrophilenleukämie; MPNu, unklassifizierte myeloproliferative Neoplasie; aCML, atypische chronische myeloische Leukämie; CMML, chronische myelomonozytäre Leukämie; JMML, juvenile myelomonozytäre Leukämie; MDS/MPN-RS-T, myelodysplastische/myeloproliferative Neoplasie mit Ringsideroblasten und Thrombozytose; WHO, World Health Organisation.

1.2 Mastzellen

Mastzellen sind 10-15 µm große, runde und langlebige Zellen, die neben einem ovalen bis runden Zellkern auch zahlreiche zytoplasmatische Granula beinhalten. Diese Granula enthalten eine Vielzahl von Mediatoren wie etwa Histamin, Heparin, Tryptase, verschiedene Zytokine sowie Lipidmediatoren wie Prostaglandine und Leukotriene, die im Zuge einer Mastzellaktivierung in die Peripherie sezerniert werden (Jorpes, 1939; Marshall, 2004; Riley, 1953).

1.2.1 Geschichte der Mastzellen

1869 beschrieben die Ärzte Edward Nettleship und Waren Tay eine Hauterkrankung, die sie „*Urticaria pigmentosa*“ nannten. Die Erkrankung ging mit pigmentierten makulopapulösen Effloreszenzen einher und wies einen roten Dermographismus auf (Nettleship und Tay, 1869).

Fast 10 Jahre später beschrieb Paul Ehrlich in seinem Werk „Beiträge zur Theorie und Praxis der histologischen Färbung“ zum ersten Mal die Mastzelle (Ehrlich, 1879).

Daraufhin konnten in Hauteffloreszenzen von Patienten mit *Urticaria pigmentosa* Anhäufungen von Mastzellen gefunden werden. Jahrzehnte hielt man die Akkumulation von Mastzellen (genannt „Mastozytose“) für eine rein dermatologische Erkrankung. Erst im Jahre 1949 konnte eine systemische Form der Mastozytose unter Beteiligung viszeraler Organe beschrieben werden (Ellis, 1949).

1.2.2 Entwicklung, Lokalisation und Funktion von Mastzellen

Mastzellen gehören zur myelomonozytären Zelllinie und entwickeln sich, wie alle myeloischen Zellen, aus pluripotenten, CD34-positiven (CD34⁺), hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark (KM) (Kirshenbaum et al., 1991, 1999). Die noch nicht komplett ausdifferenzierten Vorläufer der Mastzellen verlassen frühzeitig das KM, um ihre endgültige Differenzierung zur reifen Mastzelle im Zielgewebe zu vervollständigen. Für diese Entwicklung sind verschiedene Wachstumsfaktoren wie Zytokine, Interleukine, sowie der „*Nerve Growth Factor*“ (NGF), das Interferon (IFN)- γ , der „*Transforming Growth Factor*“ (TGF)- β und der „*Granulocyte/Macrophage Colony Stimulating Factor*“ (GM-CSF), aber vor allem auch der „*Stem Cell Factor*“ (SCF) notwendig (Escribano et al., 2006; Okayama and Kawakami, 2006). SCF bindet den Rezeptor CD117/KIT, dem in fast jeder Phase der Mastzellentwicklung eine bedeutende Rolle zuteil kommt (Grabbe et al., 1994b). Reife Mastzellen findet man in allen Bindegeweben, vor allem in serös ausgekleideten Körperhöhlen und äußeren Grenzflächen des Organismus. Deshalb findet man Mastzellen in relativ großer Anzahl in den Schleimhäuten von Auge, Nase und Gastrointestinaltrakt, in den Alveolarwänden der Lunge und in der Haut (Grabbe et al., 1994a). Dagegen findet man unter physiologischen Bedingungen nur wenige Mastzellen in Organen wie der Milz, der Niere oder der Leber (Beil et al., 2000). Durch die vielfältige Synthese aktiver Substanzen sind Mastzellen an zahlreichen immunologischen Prozessen beteiligt. Sie spielen eine wichtige Rolle bei der erworbenen sowie der angeborenen Immunantwort (de Vries et al., 2011; Galli et al., 2011).

So sind Mastzellen beispielsweise die primären Effektorzellen bei IgE-vermittelten entzündlichen Reaktionen, haben Einfluss auf die Entwicklung dendritischer Zellen und helfen durch die Freisetzung der Mediatoren bei der Bekämpfung von Bakterien und Parasiten (Pennock & Grecis, 2006).

1.2.3 CD-Antikörper und Färbeverhalten

Alle Blutzellen tragen „*Cluster of Differentiation*“, kurz CD-Antigene auf ihrer Oberfläche, die mehr oder weniger spezifisch für den jeweiligen Zelltyp exprimiert werden. Diese Antigene sind hauptsächlich membrangebundene Glykoproteine, die entweder als Rezeptor fungieren oder bei denen enzymatische Funktionen nachgewiesen wurden. CD-Antigene können für immunphänotypische Färbungen verwendet werden. Neben Standardfärbemethoden wie mit Eosin, Giemsa und Toluidinblau, oder Spezialfärbungen mit Naphtol-AS-D-Chlorazetatesterase (CE), kann deshalb auch eine immunhistochemische Markierung mit Antikörpern durchgeführt werden, um eine Mastzell-spezifische Färbung zu erhalten (Horny et al., 1998). Hierbei können beispielsweise Antikörper gegen die Mastzelltryptase eingesetzt werden.

Die CD-Antigene der Mastzellen unterscheiden sich nur geringfügig von denen basophiler Leukozyten, weshalb auch eine Färbung gegen den Mastzell-spezifischen CD117 Rezeptor zur Unterscheidung beitragen kann. Zur Markierung atypischer Mastzellen können zudem Antikörper gegen CD25 verwendet werden (Tab. 1).

Tab. 1: Oberflächenantigene auf normalen Mastzellen, atypischen Mastzellen und basophilen Leukozyten

CD Antigen	CD117	CD2	CD25	CD68	Histamin	Tryptase	Chymase
normale Mastzellen	+	-	-	+	+	+	+/-
atypische Mastzellen	+	+	+	+	+	+	+/-
basophile Leukozyten	-	-	+	+/-	+	+/-	-

1.3 Rezeptortyrosinkinase CD117/KIT

Die Aktivierung von KIT durch seinen Liganden SCF ist essentiell für die Mastzellproliferation, die Migration der Mastzellen ins Gewebe, sowie deren Differenzierung aus CD34⁺ Progenitorzellen (Linnekin, 1999; Qiu et al., 1988; Valent et al., 1992; Yee et al. 1994). KIT gehört zu den Typ-III-Rezeptortyrosinkinasen, zu denen unter anderem auch die Rezeptoren PDGFRA und PDGFRB gehören (Yarden and Ullrich, 1988). Gemeinsamkeiten der verschiedenen Rezeptoren innerhalb der Typ-III-Gruppe liegen zum einen in der Fähigkeit, extrazelluläre, wachstumsregulierende Signale über die Zellmembran zu transduzieren, zum anderen im strukturell ähnlichen Aufbau.

1.3.1 Struktur und Signaltransduktion von KIT

Auf dem langen Arm von Chromosom 4 (4q12) ist das Proto-Onkogen *KIT* lokalisiert, welches für den KIT-Rezeptor kodiert (Yarden et al., 1987). Das Translationsprodukt besteht aus 976 Aminosäuren (AS) und 21 Exons, was einer Größe von 145kDa entspricht (Giebel et al., 1992). Ein Rezeptormonomer besteht im Wesentlichen aus drei Teilen, einem *N*-terminalen extrazellulären Bereich, einer Transmembrandomäne und einem *C*-terminalen intrazellulären Teil.

Der extrazelluläre Teil besteht aus fünf Immunglobulin-ähnlichen Domänen, von denen die ersten drei für die Bindung von SCF verantwortlich sind (Papayannopoulou et al., 1991). Die vierte und fünfte Domäne helfen bei der Dimerisierung der Monomere bei Aktivierung des Rezeptors (Lemmon et al., 1997, Omura et al., 1997). Die 23 AS lange Transmembrandomäne verankert den Rezeptor durch ihren hohen Anteil hydrophober AS fest in der Membran.

Der intrazelluläre Teil von KIT besteht aus einer Juxtamembrandomäne (JM), an die eine Vielzahl von Signalproteinen binden und die für die Autoinhibition in Abwesenheit eines externen Liganden verantwortlich ist (Mol et al., 2004), gefolgt von einer durch ein Kinaseinsert zweigeteilten Tyrosinkinasedomäne (TK), die für die Signaltransduktion von großer Bedeutung ist (Thommes et al., 1999).

Bindet SCF jeweils den extrazellulären Bereich zweier Rezeptormonomere kommt es zur Dimerisierung des Rezeptors. Dies führt zu einer Konformationsänderung des Rezeptors und damit zur Autophosphorylierung der Tyrosinreste an den TK-Domänen (Kazlauskas et al., 1991). SCF wirkt dabei als chemotaktischer Mediator und Wachstumsfaktor, wodurch verschiedene intrinsische Pathways in Gang gesetzt werden. Durch die Bindung von Signal- und Adapterproteinen an die TK-Domänen selbst, aber auch an das Kinaseinsert, werden beispielsweise der „*Mitogen-Activated Protein Kinase*“ (MAPK) Signalweg, oder der „*Signal Transducer and Activator of Transcription*“ (STAT) Signalweg aktiviert (Roskoski, 2005). Involvierte Proteine sind dabei zB. die PI3-Kinase, die mit ihrer p85 Untereinheit an das Kinaseinsert bindet (Lev et al., 1992), die Adapterproteine Grb2 und Grb7, die am C-terminalen Teil der TK binden (Thommes et al., 1999) oder auch die TK Januskinase 2 (JAK2) selbst, die trotz ihrer eigenen enzymatischen Aktivität an KIT bindet, um eine schnelle Signalweiterleitung zum Zellkern mit anschließender Proliferation zu bewirken (Abb. 2) (Weiler et al., 1996).

1.3.2 Mutationen in *KIT*

Die ersten somatischen Mutationen im *KIT*-Gen wurden in der Mastzelleukämie Zelllinie HMC-1 gefunden. Bei diesen handelte es sich um die beiden Mutationen D816V und V560G (Buttner et al., 1998; Furitsu et al., 1993). Heute weiß man, dass speziell die Mutation D816V bei mehr als 80 % der Patienten mit SM detektierbar ist (Garcia-Montero et al., 2006; Sotlar et al., 2000). Durch die hohe Inzidenz ist diese Mutation heute sehr gut untersucht. Die Substitution der Base Adenin gegen Thymin an Position 7176 der genomischen DNA im *KIT*-Gen führt zu einem Aminosäureaustausch von Asparagin gegen Valin im Codon 816 (D816→V).

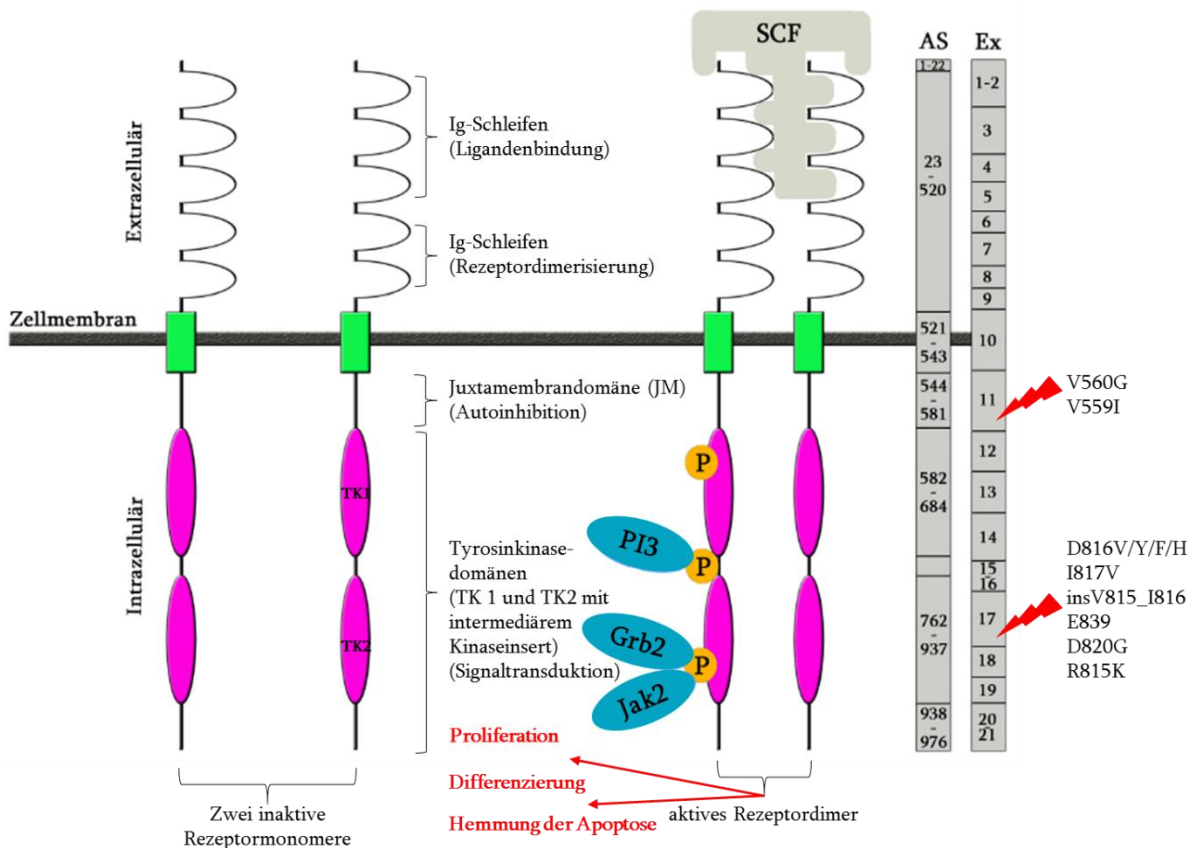


Abb. 2: Struktureller Aufbau, Aktivierung und Wirkmechanismus des KIT Rezeptors. Zwei inaktive Rezeptormonomere sind links dargestellt. Ein durch die Bindung des Liganden SCF aktiviertes Rezeptormonomer ist rechts dargestellt. Gezeigt sind außerdem die fünf extrazellulären Immunglobulin-Schleifen sowie die intrazellulären Domänen JM und TK1/2. An dem aktivierten Rezeptordimer finden sich phosphorylierte Tyrosinreste (P), an die z.B. Signal- und Adapterproteine binden und ihrerseits aktiviert werden (z.B. PI3, Grb2 und Jak2). Diese wiederum aktivieren verschiedene intrinsische Signalwege, die auf Genexpressionsebene beispielsweise Proliferation, Differenzierung und ein Hemmen der Apoptose beeinflussen können. Ganz rechts sind die codierenden Aminosäuren (AS), sowie die jeweiligen Exons (Ex) dargestellt. Mit roten Blitzern sind diejenigen Regionen gekennzeichnet, an denen bisher bekannte somatische Mutationen bei SM-Patienten lokalisiert sind. Die genauen Mutationen sind hinter dem roten Blitz benannt. Abkürzungen: JM, Juxtamembrandomäne; TK1/TK2, Tyrosinkinasedomänen 1 und 2; PI3, Phosphoinositid-3-Kinase; SCF, stem cell factor; Jak2, Janus Kinase 2; Grb2, growth factor receptor bound protein 2; SM, systemische Mastozytose.

Durch diese Punktmutation im aktiven Zentrum der TK kommt es zu einer SCF-unabhängigen Dimerisierung der KIT-Monomere, und damit zur konstitutionellen Aktivierung des Rezeptors. Die Folge ist eine unkontrollierte Proliferation von Mastzellen (Furitsu et al., 1993). Neben der D816V-Mutation konnten noch weitere *KIT*-Mutationen identifiziert werden, die sehr selten, aber ebenso mit einer konstitutiven Aktivierung von KIT assoziiert sind (Abb. 1) (Garcia-Montero et al., 2006; Longley et al., 1999; Nakagomi and Hirota, 2007; Pignon et al., 1997; Sotlar et al., 2003).

1.4 Mastozytose

Unter dem Überbegriff „Mastozytose“ fasst man eine Gruppe heterogener und seltener Erkrankungen zusammen, die mit einer pathologisch vermehrten Mastzellproliferation in verschiedenen Geweben, sowie mit variablen klinischen Manifestationen einhergehen (Horny et al., 1985, Sperr et al., 2012). Prinzipiell können zwei Gruppen unterschieden werden: eine nur auf die Haut beschränkte, kutane Form und systemische Varianten. Die systemische Mastozytose zählt mit einer Inzidenz von ca. 4-10 Neuerkrankungen pro eine Million Einwohner pro Jahr zu den sehr seltenen hämatologischen Neoplasien (Hartmann und Henz, 2001; Valent, 2013) und umfasst indolente und aggressive Verlaufsformen (Lennert und Parwaresch, 1979).

1.4.1 WHO Klassifikation

Tabelle 2 zeigt die Einordnung der verschiedenen Mastozytosen nach der aktuell gültigen WHO Klassifikation von 2016 (Arber et al., 2016). Wesentliche Veränderungen der Klassifikation innerhalb der Mastzellerkrankungen haben seit der vorangegangenen WHO Klassifikation von 2008 nicht stattgefunden.

Tab. 2: WHO Klassifikation der Mastzellerkrankungen

1. Kutane Mastozytose (CM)

2. Systemische Mastozytose
 - a. Indolente systemische Mastozytose (ISM)
 - b. Schwelende systemische Mastozytose (SSM)
 - c. Systemische Mastozytose mit assoziierter hämatologischer Neoplasie (SM-AHN)
 - d. Aggressive systemische Mastozytose (ASM)
 - e. Mastzelleukämie (MCL)

3. Mastzellsarkom (MCS)

1.4.2 Klinik der systemischen Mastozytosen

In Tabelle 3 sind die aktuell gültigen Diagnosekriterien für die systemischen Mastozytosen zusammengefasst. Ist entweder das Haupt- und ein Nebenkriterium, oder sind mindestens drei Nebenkriterien erfüllt, kann die Diagnose SM gestellt werden (Swerdlow et al., 2008).

Tab. 3: WHO Diagnosekriterien der systemischen Mastozytose

Hauptkriterium	Histologischer Nachweis multifokaler, dichter Mastzellinfiltrate im KM oder in einem extramedullären Organsystem (≥ 15 Mastzellen in Aggregaten)
Nebenkriterien	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Nachweis von über 25 % spindelförmiger, atypischer oder unreifer Mastzellen ▪ Nachweis der <i>KIT</i> D816V-Mutation ▪ CD25 und/oder CD2 Expression der Mastzellen ▪ Dauerhaft erhöhte Serumtryptase ($> 20\text{ng/ml}$)

Die ISM ist mit ca. 65 % aller Fälle die am häufigsten diagnostizierte systemische Mastzellerkrankung (Horny et al., 2007).

Patienten mit ISM leiden oft an anaphylaktischen Reaktion, Diarrhoen, Osteoporose, Nahrungsmittelunverträglichkeiten, Schmerzen und anfallsweise auftretenden Hautrötungen. Ursache dafür ist die stetige Freisetzung der Mastzellmediatoren aus den aktivierten Mastzellen.

Liegen mindestens zwei von drei der sogenannten „*B-findings*“ (grenzwertig gutartig) wie zB.:

- a) Mastzell-Knochenmarkinfiltration über 30 % und/oder Serumtryptase über 200 ng/ml
- b) Hinweise für Myelodysplasie oder Myeloproliferation im KM
- c) Organomegalie und/oder Lymphadenopathie

vor, kann eine SSM diagnostiziert werden (Valent et al., 2010).

Typische AHN bei der SM-AHN sind myeloisch differenziert und nur selten lymphatisch. Häufige Formen sind beispielsweise die SM mit assoziiertem myelodysplastischen Syndrom (SM-MDS), mit chronischer myelomonozytärer Leukämie (SM-CMML) und mit myeloproliferativer Neoplasie (SM-MPN) (Damaj et al., 2014; Valent et al., 2001). Patienten mit SM-AHN haben oftmals signifikante Blutbildveränderungen wie z.B. Eosinophilie oder Monozytose.

Für die Diagnose einer ASM muss zumindest ein sogenanntes „*C-finding*“ zutreffen. Dazu zählen Zytopenie(n), Leberfunktionsstörungen mit erhöhten Leberwerten und/oder Bilirubin, portale Hypertension, Aszites, Hypoalbuminämie, Osteolysen, Malabsorption mit Gewichtsverlust sowie Splenomegalie (Valent et al., 2010).

Die MCL ist die seltenste Form der SM und definiert sich durch mehr als 20 % atypischer Mastzellen der kernhaltigen Zellen im Knochenmarkausstrich. Findet man dazu ≥ 10 % Mastzellen im Blutausrich handelt es sich um eine leukämische MCL (Valent et al., 2014).

1.4.3 Prognose

Die Prognose der SM hängt stark vom vorliegenden Subtyp ab. Patienten mit ISM und SSM haben die günstigste Prognose, die mit der Überlebenswahrscheinlichkeit einer gesunden Normalbevölkerungsgruppe gleichzusetzten ist (Valent et al., 2001).

Der Krankheitsverlauf bei Patienten mit fortgeschrittenen Verlaufsformen wie ASM und SM-AHN ist deutlich aggressiver, wobei die Prognose der SM-AHN signifikant von der zugrundeliegenden AHN abhängig ist. Die MCL ist mit der schlechtesten Prognose von oftmals nur wenigen Monaten Überlebenszeit assoziiert (Valent et al., 2007).

1.4.4 Therapie

Durch das komplexe klinische Erscheinungsbild der SM sind die Therapien individuell und stark von der klinischen Symptomatik und dem Subtyp abhängig. Die einzusetzenden Therapien reichen von „*watch and wait*“ über die Chemotherapie bis hin zur allogenen Stammzelltransplantation (SZT).

Für die Therapie aggressiver Verlaufsformen können zytoreduktive Substanzen verabreicht werden. Beispielsweise kann eine Therapie mit Cladribin und Interferon- α das Mastzellwachstum inhibieren (Hauswirth et al., 2004; Tefferi et al., 2008). Kürzlich konnte gezeigt werden, dass der Tyrosinkinaseinhibitor PKC412/Midostaurin das Überleben von Patienten mit fortgeschrittener SM verbessert kann (Gotlib et al., 2016). Durch das Fehlen prospektiver Studien ist zumindest PKC412 trotz seiner Wirksamkeit bisher noch nicht für Patienten mit SM zugelassen, befindet sich aber im Zulassungsverfahren. Komplette klinische und histopathologische Remissionen sind sehr selten, weshalb nach Mehrlinientherapie oder Therapieversagen nur eine allogene SZT als Heilungsoption dient (Ustun et al., 2014).

1.5 Zytogenetik

Die konventionelle Zytogenetik ist ein fest etablierter Standard für die Diagnostik und Verlaufskontrolle verschiedener hämatologischer Entitäten.

Die Erstellung des Karyotyps dient dem Nachweis oder Ausschluss einer Erkrankung mit bekannten rekurrenten chromosomalen Veränderungen, der Erhebung von Prognoseparametern und auch der Remissionskontrolle unter Therapie (Schoch et al. 2003). Färbt man Chromosomen mit dem Farbstoff „Giemsa“, erhält man ein lichtmikroskopisch auswertbares und chromosomenspezifisches Bänderungsmuster. Anhand der Bänderung konnte eine Internationale Standard-Chromosomen-Nomenklatur, kurz ISCN (*International System for Human Cytogenomic Nomenclature*), festgelegt werden, die die Einteilung der Chromosomen in 22 Autosomenpaare (Chromosome 1-22) und ein Paar geschlechtsspezifischer Gonosomen (X,Y) erlaubt (Abb. 3).

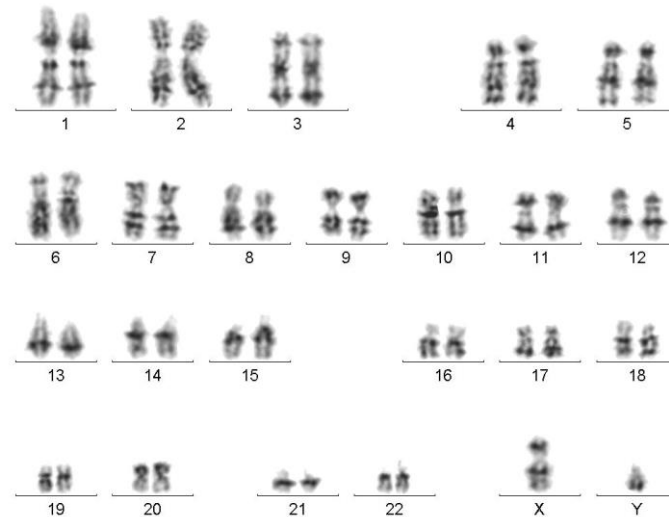


Abb. 3: Normaler männlicher Karyotyp. Das Karyogramm setzt sich aus 22 Autosomenpaaren (1-22) sowie einem X und einem Y Chromosom (Gonosomen) zusammen.

Ein einzelnes Chromosom kann grob in vier Bereiche untergliedert werden, einen kurzen „p-Arm“, und einen langen „q-Arm“, die durch das Zentromer voneinander getrennt werden. Ausgehend vom Zentromer befindet sich am Ende eines jeden Armes ein Telomer (Abb. 4).

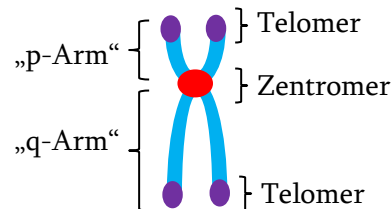


Abb. 4: Schematische Darstellung eines Chromosoms. Die beiden „Arme“ „p“ und „q“ (blau) werden vom Zentromer getrennt (rot). Ausgehend vom Zentromer befindet sich am Ende eines jeden Armes eine Telomerregion (violett).

Generell sind zwei verschiedene Chromosomenanomalien zu unterscheiden, die numerischen und die strukturellen Chromosomenaberrationen. Numerische Aberrationen beschreiben den Zugewinn oder den Verlust eines oder mehrerer vollständiger Chromosomen. Der Verlust eines Chromosoms wird als „Monosomie“ bezeichnet, der Zugewinn eines Chromosoms als „Trisomie“.

Strukturelle Aberrationen sind z.B. Translokationen (die unbalanciert oder balanciert vorliegen können, je nachdem ob chromosomales Material verloren gegangen ist oder nicht), Inversionen, Insertionen und Deletionen.

Alle chromosomalen Veränderungen werden in einer Nomenklatur, der ISCN zusammengefasst. Die diagnostische und prognostische Wichtigkeit einer zytogenetischen Analyse vor Therapiebeginn konnte für viele Krankheitsentitäten gezeigt werden. Entsprechend wurden für die Definition bestimmter hämatologischer Erkrankungen spezifische chromosomale Aberrationen in die WHO-Klassifizierung aufgenommen. Spezifische Chromosomenaberrationen stellen so oftmals einen unabhängigen Prognosefaktor dar.

Die erste für eine Tumorerkrankung spezifisch erkannte Chromosomenanomalie fand man bei Patienten mit chronischer myeloischer Leukämie (CML). Eine reziproke Translokation zwischen den Chromosomen 9 und 22 führt zu einem pathologischen *BCR-ABL1* Fusionsgen, das sehr gut therapierbar ist (Rowley, 1973). Eine große Relevanz spezifischer zytogenetischer Veränderungen konnte außerdem für die AML gezeigt werden (Betz und Hess, 2010; Mrozek et al., 2004; Tallman et al., 2007).

Für die SM sind bisher keine spezifischen zytogenetischen Veränderungen bekannt.

1.6 Molekulargenetik

Die D816V-Mutation im *KIT*-Gen (oder andere, seltenere Mutationen im *KIT*-Gen) kann bei >80 % der Patienten mit SM nachgewiesen werden. Innerhalb der letzten Jahre konnten speziell bei Patienten mit fortgeschrittener SM weitere Mutationen in anderen Genen, allen voraus in *TET2*, *SRSF2*, *ASXL1* und *RUNX1* detektiert und prognostisch eingeordnet werden (Jawhar et al., 2015, 2016; Schwaab et al., 2013).

Während Mutationen in *TET2* scheinbar keinen Einfluss auf das Überleben der SM-Patienten haben, konnten Mutationen in *SRSF2*, *ASXL1* und *RUNX1* (S/A/R Genpanel) mit einer schlechten Prognose assoziiert werden (Damaj et al., 2014; Gelsi-Boyer et al., 2012; Hanssens et al., 2014; Jawhar et al., 2016; Soucie et al., 2012).

60 - 70 % der Patienten mit fortgeschrittener SM sind multimutiert, haben also neben der *KIT*-Mutation eine oder mehrere solcher Zusatzaberrationen (Jawhar et al., 2015; Schwaab et al., 2013).

Einige dieser Mutationen, darunter in *JAK2*, *CBL*, *RAS* aber auch in *TET2* und *S/A/R* konnten bereits in Patienten mit MDS, MPN und MDS/MPN identifiziert werden und waren auch dort, analog zur SM, oftmals mit einer schlechten Prognose assoziiert (Guglielmelli et al., 2014; Haferlach et al., 2014; Meggendorfer et al., 2012; Tefferi et al., 2014).

Der durch das gleichnamige Gen codierte *SRSF2* gehört zur Gruppe der SR-Proteine, die eine wichtige Rolle beim alternativen Spleißen innehaben (Manley und Tacke 1996). Im Wesentlichen besitzt *SRSF2* zwei funktionell wichtige Domänen, eine *N*-terminale RNA-Bindungsdomäne und eine *C*-terminale Serin/Arginin reiche (RS)-Domäne, die für die Bindung weiterer Proteine, die am Spleißvorgang beteiligt sind, verantwortlich ist (Wu & Maniatis, 1993). Zwischen diesen Domänen liegt die *Hotspot* Mutationstelle p.P95, die als rekurrente Mutation bei Patienten mit fortgeschrittener SM beschrieben ist (Hanssens et al., 2014) und als prognostisch schlecht eingeordnet werden konnte (Jawhar et al., 2016).

Anders als bei *SRSF2* findet man bei myeloischen Neoplasien im *ASXL1*-Gen keine bestimmte Hotspot-Mutation. Relevante Mutationen in *ASXL1* sind über das gesamte Gen verteilt, wobei dennoch die meisten im jeweils letzten codierenden Exon lokalisiert sind (Abdel-Wahab et al., 2011). *ASXL1* codiert für einen Helix-Turn-Helix-Transkriptionsfaktor, und zählt damit zu den DNA-bindenden Kernproteinen. Mutationen in solchen Genen können zu einer veränderten Genexpression, und damit zu atypischen Phänotypen führen. Pathologische Mutationen in *ASXL1* konnten bisher sowohl in MPN als auch speziell bei der SM nachgewiesen werden (Carbuccia et al., 2009, Schwaab et al, 2013) und sind ebenso wie *SRSF2* mit einer schlechten Prognose assoziiert (Damaj et al., 2014; Jawhar et al., 2016; Traina et al., 2012).

Analog zu *ASXL1* gehört auch *RUNX1* zur Gruppe der Transkriptionsfaktor-codierenden Gene, die besonders für die Regulation der Transkription hämatologischer Gene wichtig sind (Cameron et al., 1994; Hsiang et al., 1993). *RUNX1* gehört zur Familie der CBF Proteine und besitzt eine *N*-terminale DNA-Bindungsdomäne und eine *C*-terminale Transaktivierungsdomäne zur Bindung aktivierender Cofaktoren und Repressoren (Ito, 1999).

In hämatologischen Erkrankungen konnten in beiden Domänen pathologische Mutationen identifiziert werden.

Bei akuten Leukämien, wie beispielsweise der AML, kommt es dabei besonders häufig zu Translokationen unter Bildung eines *RUNX1*-Fusionsgens (Peterson und Zhang, 2004). Weiterhin konnten im *RUNX1*-Gen verschiedener hämatologischer Entitäten, darunter bei SM-Patienten, einige pathologische Punktmutationen sowie Deletionen detektiert werden (Jawhar et al., 2015). Meist handelt es sich dabei um inaktivierende Mutationen, die letztendlich zu einer Deregulierung von Differenzierungs- und Proliferationssignalwegen führen (Blyth et al., 2005). Auch *RUNX1*-Mutationen sind weitestgehend mit einem prognostisch schlechten *Outcome* assoziiert.

1.7 Fragestellungen

Die erfolgreiche Therapie verschiedener hämatologischer Krankheitsentitäten basiert auf der Identifizierung molekularer und chromosomaler Marker. Beispielsweise kann die CML durch den Einsatz von Tyrosinkinaseinhibitoren, die speziell das *BCR-ABL1* Fusionsgen inaktivieren, sehr gut therapiert werden.

Innerhalb der letzten Jahre ist durch die Validierung prognostisch wichtiger molekularer Mutationen eine Stratifizierung bei Patienten mit SM zumindest teilweise möglich geworden. So werden zurzeit neben der Knochenmarkshistologie vor allem klinische Parameter und der molekulare Mutationsstatus zur Risikostratifizierung von SM-Patienten herangezogen. Während eine initiale zytogenetische Analyse bei einigen hämatologischen Entitäten ebenfalls eine wichtige diagnostische und prognostische Rolle einnimmt, spielt der Karyotyp bei SM-Patienten bisher eher eine untergeordnete Rolle. Wenige Daten liegen bisher in der Literatur vor. Die vorliegende Arbeit sollte Antworten auf folgende Fragen liefern:

- 1) Gibt es ein zytogenetisches Muster bei SM-Patienten?
- 2) Gerade Patienten mit fortgeschrittener SM zeigen oftmals einen aggressiven Krankheitsverlauf und sind mit einem dementsprechend schlechten *Outcome* assoziiert. Es sollte evaluiert werden, inwiefern Patienten mit verschiedenen SM-Subtypen im Krankheitsverlauf einen Progress oder eine Transformation erleiden.
- 3) Bei diesen Patienten sollte untersucht werden, ob es zu chromosomalen Veränderungen im Sinne einer Karyotypevolution kommt und ob die alleinige Veränderung des Karyotyps bei stabilem Mutationsstatus einen Hinweis auf eine Progression oder mögliche Transformation in eine AML oder in eine MCL liefern könnte. Ebenfalls sollte geklärt werden, ob die Zytogenetik bei SM-Patienten als prognostischer Marker dienen kann und Patienten mit bestimmten zytogenetischen Veränderungen als Hochrisiko-Patienten definiert werden können.
- 4) Weiterhin sollte die klonale Evolution von *KIT* D816V positiven SM-Patienten mit aberrantem Karyotyp und mindestens einer zusätzlichen Mutation untersucht werden. Unter anderen konnte unsere Arbeitsgruppe zeigen, dass die *KIT* D816V-Mutation bei Patienten mit SM-AHN sowohl im SM, als auch im AHN Kompartiment zu finden ist. Demnach liegt die Vermutung nahe, dass beide Erkrankungen einen gemeinsamen klonalen Ursprung haben. Im Rahmen dieser Arbeit sollte analysiert werden, ob auch zytogenetische Veränderungen zusammen mit *KIT* D816V und anderen Zusatzmutationen im selben Klon vorliegen, oder ob diese Aberrationen in unabhängigen Klonen zu finden sind.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Geräte und Verbrauchsmaterialien	Firma	Firmensitz
Biofuge™	Heraeus	Hanau, D
Brutschrank BB 6220	Heraeus	Hanau, D
Centrifuge 5404 R	Eppendorf	Hamburg, D
Centrifuge 5804 R	Eppendorf	Hamburg, D
Cytospin™ - System	Heraeus	Hanau, D
Deckgläser für Objektträger	Marienfeld GmbH & Co.KG	Königshofen, D
Digital Vortex Mixer	VWR International GmbH	Darmstadt, D
Fluoreszenzmikroskop: Axioskop 2	Zeiss	Oberkochen, D
Gelelektrophorese-Kammer	VWR International GmbH	Darmstadt, D
Heizblock (Thermomixer compact)	Eppendorf	Hamburg, D
Kamera am Mikroskop (Cool Cube)	MetaSystems	Altlussheim, D
Laborfuge 400e	Heraeus	Hanau, D
LaminAir® Werkbank LB-48C	Heraeus	Hanau, D
Leucosep™ Röhrchen	Greiner Bio-One GmbH	Frickenhausen, D
LightCycler® 1.0 und 1.5	Roche Diagnostics	Mannheim, D
LightCycler® Carousel Zentrifuge	Roche Diagnostics	Mannheim, D
Maxwell® 16 LEV	Promega	Mannheim, D
Mikroskop DMLS	Leica	Bensheim, D
Mikroskop JenavalOpton ID02	Zeiss	Oberkochen, D
Molecular Imager® ChemiDoc™	BioRad Laboratories GmbH	München, D
Nanodrop® ND-1000	NanoDrop®	Wilmington, USA
Neubauer-Zählkammer	Brand GmbH	Wertheim, D
Objektträger 3-Well, beschichtet	Thermo Fisher Scientific, Inc.	Waltham, USA
pH-Meter (PB-11)	Sartorius	Göttingen, D
Pipettierhilfe (Pipetus®)	Hirschmann-Laborgeräte	Eberstadt, D
Power Supply, Model 200/2.0	BioRad Laboratories GmbH	München, D
QIAcube	Qiagen	Hilden, D
Sterilwerkbank Herasafe KS	Thermo Fisher Scientific, Inc.	Waltham, USA
Thermocycler Mastercycler®	Eppendorf AG	Hamburg, D
(Fein-) Waagen	Sartorius	Göttingen, D
Wärmeofen	Biometra GmbH	Göttingen, D
Wasserbad (SW20C)	Julabo Labortechnik GmbH	Seelbach, D
Werkbank (Hera safe sterile)	Heraeus	Hanau, D
Zentrifuge Mini star	VWR International GmbH	Darmstadt, D
Zentrifugeneinsätze	Heraeus	Hanau, D

2.1.2 Chemikalien

Chemikalie	Firma	Firmensitz
Agarose	Biozym	Oldendorf, D
Ammoniumbicarbonat	Sigma-Aldrich	Gelenau, D
Ammoniumchlorid	Sigma-Aldrich	Gelenau, D
Chloroform (100 %)	Merck Chemicals GmbH	Darmstadt, D
Colcemid (10 µg/ml)	Thermo Fisher Scientific, Inc.	Darmstadt, D
Eindeckmedium mit DAPI	Vector Laboratories	Burlingame, USA
ddH ₂ O (Aqua ad iniectabilia)	B. Braun	Melsungen, D
DEPC	Sigma-Aldrich	Gelenau, D
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma-Aldrich	Gelenau, D
EDTA	Sigma-Aldrich	Gelenau, D
Essigsäure (100 %)	Merck Biosciences KGaA	Darmstadt, D
Ethanol absolut	VWR International GmbH	Darmstadt, D
Ficoll-Paque™ Premium	GE Healthcare Europe	Freiburg, D
Fötales Kälberserum (FKS)	Thermo Fisher Scientific, Inc.	Darmstadt, D
Giemsa	Merck Biosciences KGaA	Darmstadt, D
GIT (Guanidine thiocyanate)	Sigma-Aldrich	Gelenau, D
H-Lauroylsarkosine	Sigma-Aldrich	Gelenau, D
Kaliumchlorid-Lösung (KCl)	Sigma-Aldrich	Gelenau, D
L-Glutamin (200 mM)	Thermo Fisher Scientific, Inc.	Darmstadt, D
Methanol	Merck Biosciences KGaA	Darmstadt, D
MethoCult™	Stemcell Technologies	Köln, D
Natriumcitrat	Sigma-Aldrich	Gelenau, D
PBS-Tabletten	Sigma-Aldrich	Gelenau, D
Penicillin/Streptomycin	Thermo Fisher Scientific, Inc.	Darmstadt, D
RNasin®	Promega	Mannheim, D
RPMI-1640	Sigma-Aldrich	Gelenau, D
rubber cement (Klebstoff)	Marabu	Tamm, D
SSC Puffer 20x	Sigma-Aldrich	Gelenau, D
β-Mercaptoethanol	Merck Biosciences KGaA	Darmstadt, D
SYBR® Safe	Thermo Fisher Scientific, Inc.	Darmstadt, D
Thioglycerol	Promega	Mannheim, D
TRIzol®, gebrauchsfertig	Thermo Fisher Scientific, Inc.	Darmstadt, D
Tween® 20	Sigma-Aldrich	Gelenau, D
Uracil-DNA Glycosylase (UGD)	Roche Diagnostics	Mannheim, D

2.1.3 Enzyme

Enzym	Firma	Firmensitz
Reverse Transkriptase	Thermo Fisher Scientific, Inc.	Darmstadt, D
Taq DNA Polymerase, (5 U/µL)	Thermo Fisher Scientific, Inc.	Darmstadt, D

2.1.4 KIT Systeme

KIT System	Firma	Firmensitz
dNTP Mix	Thermo Fisher Scientific, Inc.	Darmstadt, D
LightCycler® Faststart plus KIT	Roche Diagnostics	Mannheim, D
Maxwell® 16 LEV	Promega	Mannheim, D
simplyRNA Blood KIT	Promega	Mannheim, D
M-MLV Reverse Transcriptase	Thermo Fisher Scientific, Inc.	Darmstadt, D
Primer random p(dN) ₆	Roche Diagnostics	Mannheim, D
QIAcamp DNA Mini KIT	Qiagen	Hilden, D
REPLI-g® Mini KIT	Qiagen	Hilden, D

2.1.5 Software

Software	Firma	Firmensitz
LightCycler™ Systems	Roche Diagnostics	Mannheim, D
Microsoft® Office™ 2010, 2016	Microsoft	Washington, USA
SPSS Statistics 23	IBM	Armonk, USA
GraphPad Prism 6	GraphPad Software, Inc.	La Jolla, USA
Ikaros	MetaSystems	Altlussheim, D
Isis	MetaSystems	Altlussheim, D
Adobe® Photoshop® 7.0	Adobe Systems Inc.	Delaware, USA
Software ImageLab™ 3.0.1	BioRad Laboratories GmbH	München, D

2.1.6 FISH Sonden

Sonde	Firma	Firmensitz
XL 5q33	MetaSystems	Altlussheim, D
XL t(8;14)	MetaSystems	Altlussheim, D

2.1.7 PCR Sonden

Sonden	Sequenz von 5' bis 3'
CK18FL	AAGTGGATGGCACCTGAAAGCATTTC-Fluorescein
CK18LC	LC-RED-640-ACTGTGTATACACGTTTGAAAGTGACGTCTGG-P

Hersteller: Sigma Aldrich (Gelenau, Deutschland) oder Eurofins Scientific SE (Luxemburg, Luxemburg)

2.1.8 Puffer und Lösungen

Puffer / Lösung	Zusammensetzung
100 Basenpaar Marker	200 µl DNA Molecular Weight Marker XIV – 100 bp ladder 440 µl ddH ₂ O 250 µl Ladepuffer 1 10 µl 0,5 M EDTA; pH 8 100 µl 10x RXN Buffer
10x Lysispuffer	82,91 g NH ₄ CL [1,55 M] 7,91 g NH ₄ HCO ₃ [0,1 M] 2 ml EDTA pH 8 [0,5M]
10x TBE-Puffer (Trisborat-EDTA)	216 g Trizma Base 108 g Boriacid 80 ml EDTA pH 8, 0,5 M 2 l ddH ₂ O
1x TBE-Puffer	500 ml 10x TBE-Puffer 5 l ddH ₂ O
cDNA-Mix	5X First Strand Buffer [250 mM Tris-HCl (pH 8.3)], 375 mM KCl, 15 mM Magnesium Chlorid 100 mM DTT 200 U/µl M-MLV 200 µg/ml P(dN) ₆ Primer 1,9 mM dNTP-Mix 1,4 x 10 ⁴ U/ml M-MLC Reverse Transkriptase 1400 U/ml RNasin
GIT- Homogenisierungspuffer	1 Flasche GIT 4 M 13,2 ml Na-Citrat pH 7; 1 M [25 nM] 5 ml EDTA pH 8; 0,5 M [5 nM] 25,6 ml N-Lauroylsarkosine 10 % 287,5 ml ddH ₂ O
Ladepuffer 1	5 ml Aqua iniectabilia 5 ml Glycerin 1 Spatelspitze Bromphenolblau
Ladepuffer 2	125 mg Bromphenolblau 7,5 g Ficoll-Paque® 50 ml ddH ₂ O
p(dN) ₆ -Stocklösung	50 Units p(dN) ₆ 549,5 µl H ₂ O 0,5 µl 1M KCl
Phosphatpuffer	11,4 g Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O 4,9 g KH ₂ PO ₄

2.1.9 Synthetische Oligonukleotide (Primer)

Primer	Sequenz von 5' - 3'
A-SRSF2-RA2	CTGTGGTGTGAGTCCGGTT
ASXL1e12F1	AGGTCAGATCACCCAGTCAGTT
ASXL1e12R1	TAGCCCATCTGTGAGTCCAAGTGT
B-SRSF2 for	GCGTCGGCGACGTGTACAT
CK16F4	TGGCTTTCCTCGCCTCCAAG
CK17FM	TTGTGATTTTGGTCTAGCCAGGGT
CK20R	ATCTGCATCCCAGCAAGTCTTC
C-SRSF2 rev	GGACTCTTCGATCGCGACCT
Jak2-inn1-for	GCATTTGGTTTTAAATTATGGAGTATATG
Jak2-inn2-rev	GTTTTACTTACTCTCGTCTCCACAAAA
Jak2-out-for	TCCTCAGAACGTTGATGGCAG
Jak2-out-rev	ATTGCTTTCCTTTTTTCAACAAGAT
KIT 2F	CAGCCAGAAATATCCTCCTTACT
KIT1Bmod	CAGGATTTACATTATGAAAATCACAGG
NPM1-F2	GAAGAATTGCTTCCGGATGACT
NPM-R	TGGACAACATTTATCAAACACGGTAG
NRAS-F	CTCGCCAATTAACCCTGATTACTG
NRAS-R	CACCTCTATGGTGGGATCATATTC
RUNX1-F2	CATTGCTATTCCTCTGCAACC
RUNX1-R2	CCATGAAACGTGTTTCAAGC
TET2-F11-12	GCAACTTGCTCAGCAAAGGTACT
TET2-F7-8	GACCAATGTCAGAACACCTCAA
TET2-R11-13	TGCTGCCAGACTCAAGATTTAAAA
TET2-R7-8	TTGATTTTGAATACTGATTTTCACCA
TP53-F1	ACTGTACCACCATCCACTACAAC
TP53-R1	GGAGAGGAGCTGGTGTGTTGTTG

2.1.10 Patientenproben

Alle Analysen wurden aus KM oder peripherem Blut (PB) von 109 Patienten mit gesicherter SM durchgeführt. Die Diagnose wurde anhand histologischer und molekularbiologischer Untersuchungen entsprechend den aktuell gültigen WHO-Kriterien (WHO 2016) gestellt. In die vorliegende Arbeit wurden sowohl Patienten aus der III. Medizinischen Klinik der Universitätsmedizin Mannheim, als auch Patienten von externen Einsendern eingeschlossen. Alle Patienten haben ihr schriftliches Einverständnis im Rahmen des „Deutschen Registers für Erkrankungen der Eosinophilen und Mastzellen“ erteilt.

Das Probenmaterial für Analysen aus DNA oder cDNA sowie für die Untersuchungen an vitalen Zellen, stammte entweder aus asserviertem Restmaterial, oder wurde im Rahmen von Erstdiagnosen oder Verlaufsproben während dieser Arbeit bezogen.

2.2 Methoden

2.2.1 Leukozytenisolation aus PB und KM

Um im späteren Verlauf RNA und DNA aus dem Vollblut oder KM gewinnen zu können, mussten zunächst die Leukozyten isoliert werden. Die Leukozytenisolation aus EDTA-PB oder Heparin-KM beruht auf dem Prinzip der Erythrozytenlyse. Ca. 10 ml PB bzw. KM wurden dafür mit kaltem 1x Lysispuffer versetzt (auffüllen auf 45 ml). Die Erythrozyten platzen aufgrund des starken osmotischen Drucks, der durch den Flüssigkeitseinstrom in die Zelle erfolgt. Die Morphologie der Leukozyten kann dagegen optimal konserviert werden, da deren Membran reicher an transmembranen Proteinen ist, und sie intrazellulär ein stärkeres Zytoskelett besitzen. Um eine optimale Lyse zu erreichen, wurde nach Zugabe des Lysispuffer 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz 10 min bei 1200 rpm und 4 °C zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde (ohne 10 minütige Inkubation) solange wiederholt, bis das Pellet weiß, und der Überstand rot-durchsichtig ($\hat{=}$ hämolysierte Erythrozyten) war. Danach wurde das Leukozytenpellet in 25 ml 1 x PBS gewaschen und nochmals für 5 min bei 1200 rpm und 4 °C zentrifugiert. Im Anschluss wurde der Überstand verworfen, das Zellpellet kurz über Kopf getrocknet, und bis zur weiteren Verarbeitung auf Eis gestellt.

2.2.2 Isolierung mononukleärer Zellen (MNC) aus Knochenmark

Für die Kultivierung vitaler Zellen wurden MNC (Lymphozyten, Monozyten, Blasten) aus KM von Patienten mit fortgeschrittener SM isoliert. Für die Isolation der MNC wurde die Methode der Dichtegradientenzentrifugation mittels Ficoll verwendet. Ficoll-Paque sind synthetische Polymere aus Saccharose, die eine bestimmte Dichte (1,077 g/ml) und Viskosität haben.

Wird das KM langsam über eine Schicht Ficoll geschichtet und anschließend zentrifugiert, sedimentieren Erythrozyten aufgrund ihrer höheren Dichte (höher als MNC) durch die Ficollschicht auf den Boden des Gefäßes. Granulozyten befinden sich nach der Zentrifugation zwischen den Erythrozyten und der Ficollschicht. Zellen mit geringer Dichte lagern sich oberhalb der Ficollschicht ab, wobei MNC und Thrombozyten einen Interphase-Ring in Mitten anderer KM-Bestandteile (Plasma) bilden. Für die Separation der MNC wurden Leucosep Röhren verwendet, in denen sich eine poröse Membran aus Polyethylen befindet. 15 ml Ficoll-Paque™ wurde auf das Septum des Röhrens pipettiert und bei 2000 rpm für 1 min zentrifugiert, wobei das Ficoll unter die Trennscheibe diffundiert. Das KM wurde auf 30 ml mit sterilem PBS aufgefüllt und das Gemisch anschließend auf das Leucosep Röhren geschichtet und bei 2300 rpm für 10 min ohne Bremse zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde die Interphase Schicht mit PBS gewaschen (1200 rpm; 10 min) und eventuell noch vorhandene Erythrozyten nach Zugabe von 10 ml Lysispuffer beseitigt. Nach erneutem Waschen mit 30 ml PBS wurden die MNC je nach Verwendungszweck entweder vital eingefroren, oder zur Kultivierung in MethoCult™ aufgenommen (für CFU-GM Assay).

2.2.3 DNA-Isolation mittels QIAcube

Für die DNA-Isolation wurden 1×10^7 Zellen im Anschluss an die Blutauflbereitung von Punkt 2.2.1 in 400 μ l GIT/ β -Mercaptoethanol-Puffer aufgenommen. Mit Hilfe einer Spritze (2 ml; Kanüle 0,9 x 40 mm) wurden die Zellen anschließend durch mehrfaches Einziehen und Auslassen mechanisch aufgeschlossen. Die so vorbereiteten Proben wurden, gemeinsam mit allen zur Extraktion notwendigen Chemikalien aus dem „QIAamp DNA Blood Mini KIT“ von Qiagen, entsprechend den Herstelleranweisungen, in den QIAcube gestellt. Dieser übernimmt automatisiert die notwendigen Schritte zur DNA-Isolation. Begonnen mit der Lyse, folgte im Anschluss die Bindung der DNA an eine geeignete Aufreinigungsmatrix und verschiedene Waschschrirte. Zum Schluss erfolgte die Elution der hochreinen Nukleinsäuren in frische Eppendorf Gefäße.

2.2.4 RNA-Isolation

RNA-Isolation mittels Maxwell®

Für die RNA-Isolation mittels Maxwell wurden 2×10^7 Zellen aus der Blutaufbereitung von Punkt 2.2.1 in 200 µl Homogenisierungspuffer (verbrauchsfertig aus Maxwell® 16 LEV simplyRNA Blood KIT unter Zugabe von 600 µl 1-Thioglycerol) aufgenommen und 30 s gevortext. Mit Hilfe einer Spritze (2 ml; Kanüle 0,9 x 40 mm) wurden die Zellen anschließend durch mehrfaches Einziehen und Auslassen mechanisch aufgeschlossen. Zu jeder Probe wurden zusätzlich 200 µl Lysispuffer und 25 µl Proteinase K (im KIT enthalten) pipettiert, anschließend wieder gevortext und 10 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Die Beladung des Maxwell® Geräts erfolgte entsprechend den Herstelleranweisungen. Die RNA-Isolierung im Gerät erfolgte über ein automatisiertes Nukleinsäure-Extraktionssystem, welches mit paramagnetischen Partikeln arbeitet. Das Prinzip basiert auf der sequentiellen Bindung und Freisetzung paramagnetischer Partikel in den Wells der Reagenzkartusche.

RNA-Isolation mittels TRIzol®

Anschließend an Punkt 2.2.1 wurde das aus 1×10^7 Zellen bestehende Zellpellet mit 1 ml TRIzol® homogenisiert. Die nun folgende RNA-Isolation mittels TRIzol® basiert auf dem Prinzip der Phasentrennung, bei dem sich verschiedene Zellbestandteile wie DNA, RNA oder Proteine in unterschiedlichen Schichten der Phenol-Chloroform-Guanidinisoithiocyanat Lösung wiederfinden. Die RNA-Isolierung mit TRIzol® beruht also auf der unterschiedlichen Löslichkeit aller sich in der Zelle befindlichen Komponenten. Das im TRIzol® enthaltene Guanidinisoithiocyanat lysiert die Zellen und inaktiviert gleichzeitig störende Enzyme, wie zum Beispiel RNasen. Das Phenol sorgt dafür, dass Proteine und DNA in Lösung gehen. Nach der Zentrifugation mit Chloroform erhält man typische Phasen, die mit dem Auge gut zu erkennen sind. Die Proben wurden zu Beginn für 10 min bei 37 °C geschüttelt. Anschließend wurden 200 µl Chloroform zu den Proben gegeben, gevortext und zentrifugiert.

Während sich Proteine nach der Zentrifugation in der unteren, organischen Phase befinden, ist die RNA in der oberen, wässrigen Phase zu finden. In der dazwischenliegenden Interphase befindet sich die DNA. Der Überstand (wässrige Phase) wurde nun in ein neues Gefäß überführt und die organische Phase entsorgt. Durch erneute Zugabe von 200 µl Chloroform wurde dieser Schritt noch einmal wiederholt. Im Anschluss wurde die RNA gefällt, wofür 0,5 ml eiskaltes EtOH (100 %) zugegeben wurde. Nach gründlichem Mischen wurde die Probe bei -20 °C für 30 min inkubiert und anschließend zentrifugiert. Das entstandene Pellet (RNA) wurde nun mit 1 ml EtOH (75 %) gewaschen. Nach dem Trocknen der RNA wurde diese in RNase freiem Aqua bidest gelöst und bei 4 °C gelagert, wobei darauf geachtet werden muss, dass das RNA-Pellet vor dem Lösen nicht komplett austrocknet.

2.2.5 Qualitätskontrolle von DNA und RNA

Die Qualität isolierter DNA aus dem QIAcube, sowie isolierter RNA aus dem Maxwell® Gerät oder der TRIzol-Aufarbeitung wurde mit Hilfe des Nanodrop® ND-1000 gemessen. Der Nanodrop® ist ein Photospektrometer (Messung der optischen Dichte, OD), welches in der Lage ist, die Konzentration von DNA und RNA bei bestimmten Wellenlängen (260 nm, 280 nm) zu messen, und deren Reinheit anzuzeigen.

Zu Beginn des Messvorganges wurde eine Blindprobe (Wasser) gemessen, um einen Nullwert festzulegen. Unter Verwendung des Programmes ND 1000 3.3 wurden die Proben am PC gemessen. Für eine 100 %-ige Reinheit der RNA gilt $OD_{260}/OD_{280} = 2,0$. Werte zwischen 1,8 und 2,2 wurden mit ausreichender Reinheit beziffert. Werte unter 1,8 zeigen Verunreinigungen mit Proteinen oder Phenol an. Bei DNA-Messungen zeigt ein Wert zwischen 1,6 und 1,8 eine reine Probe ohne Verunreinigungen an.

2.2.6 cDNA Synthese

Unmittelbar nach der RNA-Extraktion wurde eine cDNA Synthese durchgeführt, wobei die einzelsträngige RNA durch reverse Transkription in cDNA („komplementäre DNA“) umgeschrieben wurde.

Dafür wurde die RNA primär 10 min bei 65 °C inkubiert und anschließend 3 min auf Eis gelagert. Danach folgte die Zugabe von 21 µl „cDNA-Mix“ (s. 2.1.8) und eine 2-stündige Inkubation des Reaktionsgemisches bei 37 °C. Nach 2 h wurde die Reaktion bei 65 °C für 5 min gestoppt und die fertige cDNA entweder bei -20 °C zur Lagerung eingefroren, oder direkt weiterverarbeitet.

2.2.7 Qualitative Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die PCR dient der exponentiellen Vervielfältigung von spezifischem genetischen Material *in vitro*. Ist die Basensequenz einer DNA oder cDNA bekannt, ist es möglich, spezifische kurze Oligonukleotide (Primer) flankierend um einen gewünschten Sequenzbereich zu generieren. Binden die Primer komplementär an die spezifischen DNA-Abschnitte, werden sie durch Anheften von Nukleotiden durch eine DNA-Polymerase verlängert. Grob untergliedert sich eine PCR-Reaktion in drei Schritte, die sich stetig wiederholen. Im ersten Schritt wird die DNA denaturiert (ca. 95 °C), sodass sich der DNA-Doppelstrang in zwei Einzelstränge auftrennt. Dadurch liegen diejenigen Regionen frei, an die sequenzspezifische Primer binden können. Im zweiten Schritt, dem „*Primer-Annealing*“ binden Vorwärts- und Rückwärtsprimer an die als Matrize dienende DNA. Die für das *Primer-Annealing* benötigte Temperatur liegt je nach Beschaffenheit der einzelnen Primer zwischen 45 und 65 °C (A/T = 2 °C; C/G = 4 °C). Im dritten und letzten Schritt wird die Temperatur auf 72 °C erhöht, um das Binden der Taq-Polymerase an das 3'OH-Ende der Primer, und damit den Einbau der verschiedenen Desoxynukleotide (dATP, dTTP, dGTP, dCTP) komplementär zur Matrize zu erlauben. Dieser Schritt wird als „*Elongation*“ bezeichnet und sorgt für die Amplifikation des gewünschten DNA-Abschnitts. Während einer PCR werden diese drei Schritte 25 bis 30-mal wiederholt, um eine ausreichende Menge an DNA zu generieren. Für die vorliegende Arbeit wurden DNA-Abschnitte in den Genen *KIT*, *TET2*, *ASXL1*, *RUNX1*, *NRAS*, *TP53*, *JAK2* und *NPM1* qualitativ amplifiziert, um im Anschluss patientenspezifische Mutationen in diesen Genen nachzuweisen (Tab. 4).

Tab. 4: Lokalisierung von Mutationen in verschiedenen Genen

Gen	(c)DNA-Ebene	Proteinebene	Primer F	Primer R
<i>KIT</i>	c.2447A>T	p.Asp816Val	KIT2F	KIT1Bmod
<i>ASXL1</i>	c.1900_1922del	p.Glu635Argfs*15	ASXL1-F1	ASXL1-R1
<i>ASXL1</i>	c.1934dupG	p.Gly646Trpfs*12	ASXL1-F1	ASXL1-R1
<i>TET2</i>	c.3025C>T	p.Gln1009*	TET2-F11-12	TET2-R11-12
<i>TET2</i>	c.1776delT	p.Gln593Asnfs*8	TET2-F7-8	TET2-R7-8
<i>RUNX1</i>	c.285_286dupGG	p.Asp96Glyfs*11	RUNX1-F2	RUNX1-R2
<i>TP53</i>	c.809T>C	p.Phe270Ser	TP53-F1	TP53-R1
<i>NRAS</i>	c.34G>A	p.Gly12Ser	NRAS-F	NRAS-R
<i>NPM1</i>	c.864_867insCCTG	p.Trp288Cysfs*11	NPM1-F2	NPM1-R
<i>SRSF2</i>	c.284C>A	p.Pro95His	B-SRSF2-for	A-SRSF2-RA2 C-SRSF2 rev
<i>JAK2</i>	c.1849G>T	p.Val617Phe	Jak2-out-for Jak2-inn1-for	Jak2-out-rev Jak2-inn2-rev

Abkürzungen: F, vorwärts (forward); R, rückwärts (reverse).

Der PCR Nachweis von Mutationen in *SRSF2* und *JAK2* erfolgte über eine allelspezifische PCR. Die Zusammensetzung des Standard-PCR Ansatzes, sowie das PCR-Programm sind in Tabelle 5 zusammengefasst.

Tab. 5: Komponenten und PCR-Programm qualitativer PCRs

Komponente (Konzentration)	PCR-Programm
5 µl 10x Puffer	1. 2 min 95 °C Denaturierung
3 µl MgCl ₂ [50 mM]	2. 30 s 95 °C Denaturierung
1 µl dNTPs [25 mM je dNTP]	3. 30 s Primer spezifisches Annealing mit einer Temperatur von 55-60°C
0,5 µl Taq-Polymerase [5 U/µl]	4. 2 min Elongation
0,5 µl je Primer [10 µM]	5. 10 min finale Elongation
2 µl Template	6. Halten auf 4 °C für Lagerung über Nacht
Endvolumen 50 µl (fehlendes Volumen mit H ₂ O ausgeglichen)	Die Schritte 2 bis 4 werden 25–30-mal wiederholt.

2.2.8 Quantitative Real Time PCR (qRT-PCR)

Auch bei der qRT-PCR wird Template-DNA/cDNA über die Schritte Denaturierung, *Primer-Annealing* und Elongation vervielfältigt (s. 2.2.7). Anders als bei der qualitativen PCR ermöglicht die qRT-PCR jedoch zusätzlich die Quantifizierung der gewonnenen DNA-Kopien über Fluoreszenz-markierte Sonden, die sequenzspezifisch an einen Sequenzbereich zwischen den Primern binden. Die qRT-PCR wurde in der vorliegenden Arbeit für die Quantifizierung der *KIT* D816V-Mutation genutzt. Die Methode beruht auf der Messung von Fluoreszenzsignalen während eines jeden PCR-Zyklus, wobei die Fluoreszenz proportional mit der Menge der PCR-Produkte zunimmt. Für die Quantifizierung wurde cDNA aus der Maxwell- oder Trizolaufarbeitung verwendet. Für die absolute Quantifizierung der *KIT* D816V-Mutation wurde eine Plasmid-Verdünnungsreihe in den Verdünnungstufen 2×10^6 , 2×10^5 , 2×10^4 , 2×10^3 , 2×10^2 , 2×10^1 Kopien genutzt, wodurch noch 40 mutationstragende Moleküle nachgewiesen werden können. Das dafür eingesetzte lineare Plasmid (pCR[®]2.1-TOPO) enthält ein ca. 800 bp großes Insert, das die Exons 15-18 des *KIT*-Gens, einschließlich der D816V-Mutation trägt. Die für die Quantifizierung im LightCycler[®] (Roche) eingesetzten Reaktionsgemische sowie das verwendete PCR-Programm sind in Tabelle 6 und 7 aufgeführt. Der Wildtyp-Ansatz (WT) und der D816V-Ansatz wurden in verschiedenen Reaktionsgefäßen durchgeführt.

Tab. 6: Komponenten und PCR-Programm der quantitativen *KIT* PCR zur Amplifikation des WT

Komponenten pro Probe (Konzentration)	PCR- Programm
10 µl H ₂ O	1. 10 min 95 °C Denaturierung
1 µl Primer CK16F4 [10 µM]	2. 10 s 95 °C Denaturierung
1 µl Primer CK20R1 [10 µM]	3. 10 s 60 °C Primer Annealing
1 µl UGD [2 U/µl]	4. 26 s 72 °C Elongation
4 µl Mastermix (dNTPs, Taq-Polymerase, Puffer) aus LC Faststart Plus KIT	5. 30 s 40 °C Cool down
0,57 µl Sondenmix aus CK18FL und CK18LC [je 20 pmol/µl]	Die Schritte 2 bis 4 werden 45-mal wiederholt.

Tab. 7: Komponenten und PCR-Programm der qRT-PCR für die Amplifikation der D816V-Mutation

Komponente pro Probe (Konzentration)	PCR- Programm
10 µl H ₂ O	1. 10 min 95 °C Denaturierung
1 µl Primer CK-MLC [10 µM]	2. 10 s 95 °C Denaturierung
1 µl Primer CK20R1 [10 µM]	3. 10 s 60 °C Primer Annealing
1 µl UGD [2 U/µl]	4. 26 s 72 °C Elongation
4 µl Mastermix (dNTP, Taq-Polymerase, Puffer) aus LC Faststart Plus KIT	5. 30 s 40 °C Cool down
0,57 µl Sondenmix aus CK18FL und CK18LC [je 20 pmol/µl]	Die Schritte 2 bis 4 werden 45-mal wiederholt.

Die Auswertung der Daten des LightCyclers® erfolgte mit Hilfe der Software LightCycler™ Systems von Roche. Für die Relativierung der quantifizierten Daten wurde der *KIT*D816V/*KIT* WT Quotient gebildet (Erben et al., 2014).

2.2.9 Screening von möglichen Zusatzmutationen

Präsentierte sich ein Patient mit einer fortgeschrittenen SM oder bestand zusätzlich zur SM der Verdacht auf eine AHN, wurde das KM oder PB des Patienten neben einer *KIT*-Mutation auch auf das Vorliegen verschiedener Zusatzmutationen untersucht. Für verschiedene AHN-Entitäten kommen dabei eine Reihe verschiedener Mutationen in Frage, die in mehr oder weniger individuellen Gen-Panels zusammengefasst sind.

Das routinemäßige Screening für Mutationen in den 20 Genen *JAK2*, *MPL*, *CALR*, *TET2*, *IDH1/2*, *DNMT3A*, *ASXL1*, *EZH2*, *CBL*, *SF3B1*, *SRSF2*, *U2AF1*, *RUNX1*, *K/NRAS*, *NPM1*, *MLL*, *TP53* und *ETNK1* wurde vom Münchner Leukämielabor (MLL, München, Deutschland) unter Verwendung verschiedener molekulargenetischer Methoden durchgeführt.

2.2.10 Agarosegelelektrophorese

Um PCR-Produkte im Anschluss an eine qualitative PCR sichtbar zu machen wurden 10 µl des PCR-Produktes, nach Zugabe von 3 µl Ladebuffer, auf ein 2 %-iges Agarosegel (enthält den DNA Farbstoff SYBR® Safe) aufgetragen. Der Gellauf erfolgte in einer Kammer, in der das Gel vollständig mit 1 x TBE-Puffer bedeckt wurde. Als Standardmarker diente der 100-Basenpaarmarker (s. 2.1.8). Nach Anlegen einer Spannung von 70-80 V trennten sich die PCR-Produkte innerhalb von 45 min der Größe nach auf. Die Detektion der spezifisch großen PCR-Fragmente erfolgte mit Hilfe des „Molecular Imager ChemiDoc™ XRS+“. Die entsprechende Software „Image Lab™“ diente der Visualisierung, um die Größe der PCR-Produkte im Vergleich mit dem Basenpaarmarker abzuschätzen.

2.2.11 Sequenzierung nach Sanger

Wurden die gewünschten PCR-Amplifikate mit Hilfe des Agarosegels nachgewiesen, konnte das PCR-Produkt sequenziert werden. Dabei wurden die gleichen Primer verwendet, die auch für die PCR-Reaktion eingesetzt wurden. Die Sequenzierung nach Sanger basiert auf einer Kettenabbruchsynthesereaktion. Durch den Einbau von fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleotiden (ddNTPs) kommt es zu einem Synthesestopp der Polymerase während der Synthese des komplementären DNA-Stranges. Diese Synthese wird getrennt für Vorwärts- und Rückwärtsreaktion durchgeführt. Die Sequenzierung der PCR-Produkte wurde von der Firma Sequiserve GmbH in Vaterstetten durchgeführt.

Die erhaltenen Sequenzen wurden mit Hilfe der Elektropherogramme und verschiedenen Datenbanken wie „*Ensembl genome browser 86*“ (<http://www.ensembl.org/index.html>) oder „*Nucleotide BLAST*“ (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch) ausgewertet.

2.2.12 Kryokonservierung

Für die Kultivierung von Zellen zu einem späteren Zeitpunkt wurden die nach der Dichtegradientenzentrifugation gewonnenen MNC vital asserviert. Dafür wurden 2–5 x 10⁷ Zellen in 0,5 ml RPMI 1640 (ohne Zusätze) mit 0,5 ml Einfriermedium (FKS, RPMI 1640 und DMSO im Verhältnis 3:1:1) je Kryoröhrchen konserviert. Die Kryoröhrchen wurden über Nacht in einem Einfrierbehälter mit Isopropanol bei -20 °C langsam runtergekühlt und eingefroren. Für eine Langzeitlagerung wurden die Kryoröhrchen in flüssigem Stickstoff bei -196 °C eingefroren.

2.2.13 Auftauen der Zellen

In flüssigem Stickstoff asservierte Zellen wurden im 37 °C warmen Wasserbad aufgetaut. Anschließend wurde die Zellsuspension (1 ml) in ein 50 ml Falcon überführt. Nach tröpfchenweiser Zufuhr von 15 ml kaltem RPMI-1640 wurden die Zellen bei 1200 rpm für 6 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 0,5 ml kaltem RPMI-1640 resuspendiert.

2.2.14 Bestimmen der Lebendzellzahl

Um die Lebendzellzahl der Zellen direkt nach der Dichtegradientenzentrifugation oder nach dem Auftauen der Zellen ermitteln zu können, wurden 10 µl Zellsuspension mit 990 µl Trypanblau (entspricht einer 1:100 Verdünnung) vermischt. Anschließend wurden 10 µl dieser Suspension in einer Neubauer-Zählkammer unter dem Mikroskop ausgezählt. Lebende Zellen blieben farblos während sich tote Zellen blau färbten und nicht mitgezählt wurden. Die Lebendzellzahl pro ml wurde wie folgt berechnet: Anzahl ungefärbter, lebender Zellen in 16 kleinen Quadraten x 100 (Verdünnungsfaktor) x 10⁴.

2.2.15 CFU-GM Assay

CFU-GM (CFU, colony-forming-unit) sind bipotente hämatopoetische Vorläuferzellen aus denen sich durch Differenzierung sowohl Myeloblasten (CFU-G) als auch Monoblasten (CFU-M) entwickeln können.

Aus Myeloblasten entwickeln sich im Rahmen der Granulopoese die Granulozyten, aus Monoblasten im Rahmen der Monopoese die Monozyten. Für die *in vitro* Kultivierung von CFU-GM wurde semisolides Methocellulose-Medium verwendet (MethoCult™; 100 ng/ml). Es wurden 1×10^5 MNC in 1 ml MethoCult™ in einer Petrischale (35 mm) ausgesät und diese für ca. 14 Tage bei 37 °C und 5 % CO₂ Gehalt im Brutschrank kultiviert. Pro Patient wurden 10 Petrischalen angesetzt. Nach ca. zwei Wochen hatten sich aus den einzelnen CFU-GM Granulozyten- u. Makrophagen-haltige Kolonien gebildet, die aus ca. 200–500 einzelnen Zellen bestanden und mittels einer Glaspipette aus dem semisoliden MethoCult™ geerntet werden konnten. Dafür wurden in 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße jeweils 0,1 ml PBS vorgelegt, und jede einzelne Kolonie in ein einzelnes Gefäß hinzugegeben. Anschließend wurden die Zellsuspension im Verhältnis 1:5 (20 µl und 80 µl) in zwei neue 1,5 ml Eppendorf-Gefäße aufgeteilt.

2.2.16 Amplifikation von Kolonie-DNA

Um aus den 40–100 Zellen (20 µl Kolonie-Aliquot) genügend DNA für anschließende PCR-Analysen zu erhalten, wurde die DNA Gesamt-Genom amplifiziert. Dafür wurde das REPLI-g® Mini KIT der Firma Qiagen verwendet.

Im KIT enthalten sind: ein Lysispuffer (um die DNA zu extrahieren), ein Denaturierungspuffer (um die DNA zu denaturieren), sowie „*random primer*“, neutralisierende Puffer, dNTPs und eine DNA Polymerase. Die Amplifikationsphase bei 30 °C dauerte 10 h.

2.2.17 Zytozentrifugation

Das 80 µl Kolonie-Aliquot (entspricht ca. 160–400 Zellen) wurde für die anschließende „*Fluoreszenz in situ Hybridisierung*“ (FISH) auf einen teflonbeschichteten Objektträger aufzentrifugiert. Dafür wurde die Zytospin Kammer mit je zwei Kolonie-Aliquots pro Vertiefung befüllt. Anschließend wurde für 10 min bei 1000 rpm zentrifugiert.

Durch die Zentrifugation wurden die Zellen auf den Objektträger aufgebracht und konnten anschließend gefärbt werden. Nach der Zentrifugation wurde die verbleibende Flüssigkeit verworfen und die Vorrichtung vorsichtig auseinander gebaut. Die Objektträger wurden nun in eine feuchte Kammer gelegt. Auf jede Kolonie wurde ein Tropfen Methanol pipettiert und die Zellen so für 30 min auf dem Objektträger fixiert. Anschließend wurde das Methanol abgekippt und die Objektträger in ddH₂O geschwenkt. Nach dem Lufttrocknen der Objektträger waren die Präparate ca. 6 Wochen für die folgenden *FISH*-Analysen haltbar.

2.2.18 FISH

Mit Hilfe einer *FISH*-Analyse konnten Chromosomenaberrationen unter Verwendung Fluoreszenz-markierter DNA-Sonden, die spezifisch an bestimmte DNA-Sequenzen auf den Chromosomen binden, nachgewiesen werden. Für die vorliegende Arbeit wurde die Sonde XL t(8;14) genutzt, um eine Trisomie 8 nachzuweisen, sowie die Sonde XL 5q33 für den Nachweis einer Deletion 5q. Ausgangsmaterial für die *FISH* innerhalb dieser Arbeit waren einzelne Kolonien, die aus dem CFU-GM Assay hervorgegangen sind und durch Zytozentrifugation auf Objektträgern fixiert wurden.

Vorbereitende Schritte konzentrierten sich auf zwei Tage. Am ersten Tag fand die Denaturierung der Proben, sowie die Hybridisierung der Sonden statt. Dafür wurden 10 µl der jeweiligen Sonde auf die Kolonie pipettiert, mit einem Deckglas bedeckt und dieses mit „Rubber cement“ abgedichtet. Danach wurde der präparierte Objektträger für 2 min auf einem 75 °C warmen Heizblock inkubiert (Denaturierung). Die Hybridisierung der Sonden an die DNA erfolgte über Nacht in einem Heizofen bei 37 °C.

Am zweiten Tag folgten verschiedene Waschschrte und das Eindecken der Objektträger. Zu Beginn wurden das Deckglas und der Leim vorsichtig mit einem Skalpell entfernt und die Objektträger anschließend für 2 min in eine mit 0,4 x SSC gefüllte Küvette bei 72 °C im Wasserbad inkubiert. Das SSC hatte einen pH-Wert zwischen 7 und 7,5, um unspezifischen Bindungen der Sonde vorzubeugen. Direkt im Anschluss wurden die Objektträger 30 s bei Raumtemperatur in 2 x SSC Tween20 inkubiert.

Ein dritter und letzter Waschschrift erfolgte in einer Küvette gefüllt mit ddH₂O für 2 min, um eine Kristallbildung zu vermeiden. Im Anschluss wurden die Objektträger an der Luft getrocknet. Abschließend folgte das Eindecken der Objektträger mit 10 µl Dapi pro Kolonie und einem Deckglas. Bis zur Auswertung am Fluoreszenzmikroskopie wurden die Objektträger im Dunkeln bei 4 °C aufbewahrt.

2.2.19 Zytogenetik

Für die Chromosomenpräparation wurden, je nach Leukozytenzahl, 1 - 3 ml KM in 10 ml RPMI-1640 Medium mit Zusätzen (2 % L-Glutamin (200 nM), 10 % FKS und 1 % Penicillin/Streptomycin) gegeben und 24 h bei 37 °C im Brutschrank kultiviert. Nach 24 h wurde den Kulturen 0,6 - 0,7 µg des Zellgiftes Colcemid zugegeben, und das Gemisch im Anschluss für weitere 0,5 - 2 h bei 37 °C inkubiert. Colcemid ist ein giftiges Alkaloid der Herbstzeitlosen (*Colchicum autumnale*). Es wirkt als Spindelgift, indem es durch die Depolymerisation von Mikrotubuli den Aufbau der Mitosespindel blockiert und so die Trennung der Metaphasechromosomen verhindert. Nach der Inkubation wurden die Ansätze bei 1200 rpm für 10 min zentrifugiert, um die Zellen vom Medium zu trennen. Anschließend wurde die obere Mediumschicht abgenommen und verworfen. Den sedimentierten Zellen wurden ca. 10 ml einer warmen hypotonen Kaliumchlorid-Lösung (KCl, 0,075 mol/l) zugegeben. Durch die KCl-Lösung quollen die Zellen in der folgenden 16-minütigen Inkubationsphase im Wasserbad bei 37 °C auf. Nach erneutem Zentrifugieren (bei 1000 rpm) und Verwerfen des Überstandes wurde dem Zellpellet tröpfchenweise ein Fixativ, bestehend aus einem Methanol/Eisessig Gemisch (3:1), zugegeben (auf 12 ml aufgefüllt). Anschließend wurden die Zellen für ca. 1 h bei Raumtemperatur fixiert. Darauf folgten mindestens zwei weitere Waschschriffe mit Fixativ (1200 rpm, 10 min), bis die Lösung klar war. Nach dem letzten Waschschrift wurde das Zellpellet je nach Zelldichte in 0,5-2 ml Fixativ aufgenommen und die Zellsuspension auf einen mit Ethanol (100 %) gereinigten Objektträger aus einer Höhe von ca. 30–50 cm aufgetropft.

Durch den Aufprall der zuvor aufgequollenen Zellen platzen diese auf dem Objektträger und die nun freiliegenden Metaphasechromosomen fixierten auf dem Objektträger. Nach dem Trocknen der Objektträger bei Raumtemperatur wurden diese für 12 - 16 h in einer Küvette mit 2 x SSC Puffer, im 60 °C warmen Wasserbad inkubiert.

2.2.20 Giemsa-Färbung

Für die Färbung der auf den Objektträgern fixierten Chromosomen wurden 100 ml einer 1:9 Verdünnung von Phosphatpuffer in ddH₂O hergestellt und mit 8 ml Giemsa-Färbelösung vermischt.

Anschließend wurden die Objektträger für 2–3 min in dieser Lösung gefärbt. Danach wurden die Objektträger gründlich mit ddH₂O gespült und luftgetrocknet. Die Chromosomenanalyse erfolgte im Phasenkontrast mit dem Plan Neofluar x 100/1.30 Öl Objektiv des Axioskop 2 von Zeiss (Fluoreszenzmikroskop). Die Bestimmung des Karyotyps erfolgte gemäß der ISCN 2016.

3. Ergebnisse

3.1 Patientencharakteristika

Im Rahmen unseres Registers für „Erkrankungen der Eosinophilen und Mastzellen“ konnten 109 Patienten mit SM herausgefiltert werden, bei denen initial und/oder im Verlauf ihrer Erkrankung zytogenetische Analysen durchgeführt wurden.

Von diesen 109 Patienten wurden 24 % (26/109) mit indolenten SM-Verlaufsformen diagnostiziert und 76 % (83/109) mit einer fortgeschrittenen SM. Dabei litten 4 % der Patienten mit einer fortgeschrittenen SM (3/83) an einer ASM, 10 % (8/83) an einer MCL und insgesamt hatten 87 % (72/83) neben der SM noch eine weitere AHN. Die AHN-Subtypen gliederten sich in die mit 36 % (26/72) am häufigsten vorkommende CMML, gefolgt von MDS/MPNu mit einer Häufigkeit von 24 % (17/72), über MDS (11 %, 8/72), CEL/HES (10 %, 7/72), AML (13 %, 9/72) und MF (4 %, 3/72) sowie den sehr selten vorkommenden assoziierten Erkrankungen CLL und PV mit jeweils 1 % (1/72).

Bei den 109 Patienten konnten neben Mutationen in *KIT* (*KIT* D816V, n=102, 94 %; *KIT* D816H, n=2, 2 %; keine *KIT* Mutation, n=5, 5 %) insgesamt 133 weitere, zusätzliche Mutationen detektiert werden. Mit 24 % (26/133) waren Mutationen in *TET2* am häufigsten. Auch Mutationen in den Genen *SRSF2*, *ASXL1*, *RUNX1*, *JAK2* *CBL* und *K/NRAS* wurden mit einer Häufigkeit von 21 % bis 6 % rekurrent detektiert. Seltener fand man Mutationen in den Genen, *IDH2*, *EZH2*, *U2AF1*, *ETNK1*, *NPM1*, *SF3B1*, *DNMT3a* und *SETPB1* (jeweils 1-2 %).

Von den insgesamt 109 Patienten hatten 16/109 (15 %) einen aberranten Karyotyp und alle wiesen eine fortgeschrittene SM auf. 94 % (15/16) zeigten eine SM-AHN. Nur ein Patient präsentierte sich mit einer MCL ohne AHN. Die Hälfte der Patienten mit AHN (53 %, 8/15) wies eine AML als AHN auf. 33 % (5/15) der Patienten zeigten eine SM-MDS und jeweils 7 % (1/15) eine SM-CMML oder eine SM-MDS/MPNu (Tab. 8).

Tab. 8: Patientencharakteristika von 109 Patienten mit SM

Parameter	Alle Patienten (n=109)	Patienten mit normalem Karyotyp (n=93)	Patienten mit aberrantem Karyotyp (n=16)
Diagnose			
Indolente SM (%)	26 (24)	26 (28)	--
ISM/SSM, n (%)	26 (100)	26 (100)	--
Fortgeschrittene SM (%)	83 (76)	67 (72)	16 (100)
ASM, n (%)	3 (4)	3 (5)	--
MCL, n (%)	8 (10)	7 (10)	1 (6)
SM-AHN, n (%)	62 (75)	50 (75)	12 (75)
MCL-AHN, n (%)	10 (12)	7 (10)	3 (19)
AHN Subtypen			
	n=72	n=57	n=15
CMML, n (%)	26 (36)	25 (44)	1 (7)
MDS/MPNu, n (%)	17 (24)	16 (28)	1 (7)
MDS, n (%)	8 (11)	3 (5)	5 (33)
CEL/HES, n (%)	7 (10)	7 (12)	--
AML, n (%)	9 (13)	1 (2)	8 (53)
MF, n (%)	3 (4)	3 (5)	--
CLL, n (%)	1 (1)	1 (2)	--
PV, n (%)	1 (1)	1 (2)	--
Zusatzmutationen			
	n=133	n=111	n=22
<i>TET2</i> , n (%)	32 (24)	30 (27)	2 (9)
<i>SRSF2</i> , n (%)	28 (21)	25 (22)	3 (14)
<i>ASXL1</i> , n (%)	17 (12)	14 (13)	3 (14)
<i>RUNX1</i> , n (%)	11 (8)	8 (7)	3 (14)
<i>JAK2</i> , n (%)	13 (10)	12 (11)	1 (5)
<i>CBL</i> , n (%)	10 (7)	9 (8)	1 (5)
<i>K/NRAS</i> , n (%)	9 (6)	5 (4)	4 (18)
<i>IDH2</i> , n (%)	2 (2)	2 (2)	--
<i>EZH2</i> , n (%)	2 (2)	2 (2)	--
<i>U2AF1</i> , n (%)	3 (2)	2 (2)	1 (5)
<i>ETNK1</i> , n (%)	1 (1)	1 (1)	--
<i>NPM1</i> , n (%)	2 (2)	--	2 (9)
<i>SF3B1</i> , n (%)	1 (1)	--	1 (5)
<i>DNMT3a</i> , n (%)	1 (1)	1 (1)	--
<i>SETPB1</i> , n (%)	1 (1)	--	1 (5)

Die Diagnose entspricht dem Zeitpunkt der Initialdiagnose bei Patienten mit normalem Karyotyp, und dem Zeitpunkt des ersten aberranten Karyotypes bei Patienten mit aberrantem Karyotyp. Abkürzungen: n, Anzahl; SM, systemische Mastozytose; AHN, assoziierte hämatologische Neoplasie; ISM, indolente systemische Mastozytose; SSM, schwelende systemische Mastozytose; ASM, aggressive systemische Mastozytose; MCL, Mastzellleukämie;

CMML, chronische myelomonozytäre Leukämie; MDS, myelodysplastische Syndrome; MPNu, unklassifizierte myeloproliferative Neoplasien; CEL, chronische Eosinophilenleukämie; HES, hypereosinophiles Syndrom; AML, akute myeloische Leukämie; MF, Myelofibrose; CLL, chronische lymphatische Leukämie; PV, Polycythaemia Vera.

Auch bei Patienten mit aberrantem Karyotyp konnten neben der *KIT*-Mutation 22 verschiedene Zusatzmutationen nachgewiesen werden. Mit 18 % (4/22) und jeweils 14 % (3/22) wurden Mutationen in den Genen *K/NRAS* sowie *SRSF2*, *ASXL1* und *RUNX1* am häufigsten detektiert, während Mutationen in *U2AF1*, *JAK2*, *CBL*, *SETPB1* und *SETPB1* nur jeweils einmal gefunden wurden (Tab. 8, Abb. 5). Mutationen in *TET2* und *NPM1* wurden jeweils zwei mal detektiert (je 2/23 %).

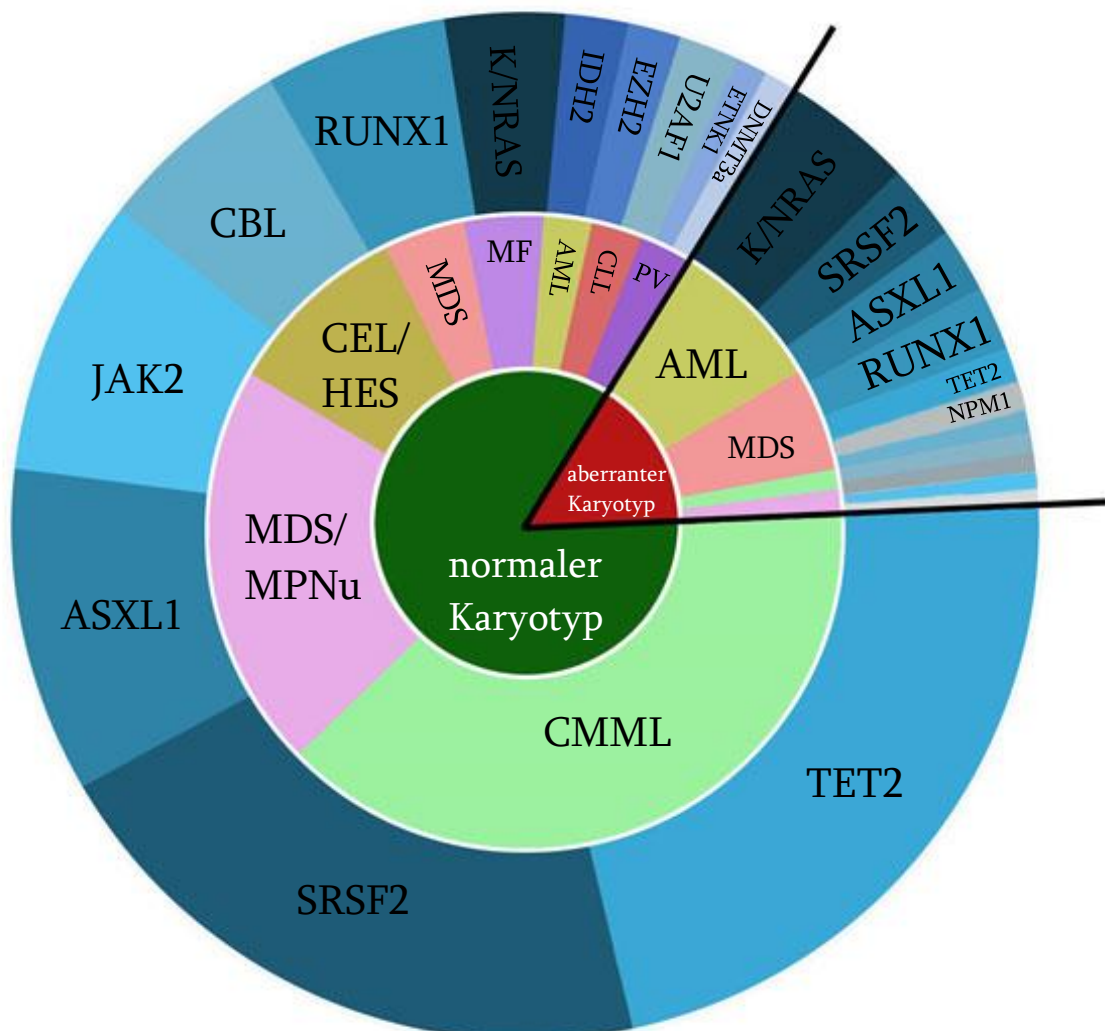


Abb. 5: Prozentuale Verteilung von AHN und Zusatzmutationen bei 109 SM-Patienten. Bei normalem Karyotyp ist die am häufigsten vorkommende AHN die CMML, gefolgt von MDS/MPNu und CEL/HES. Beim aberranten Karyotyp ist die am häufigsten vorkommende AHN die AML, gefolgt von MDS. Die am häufigsten vorkommende Zusatzmutation bei Patienten mit normalem Karyotyp sind Mutationen in *TET2*, während bei Patienten mit aberrantem Karyotyp Mutationen in *RAS* am häufigsten sind.

Abkürzungen: CMML, chronische myelomonozytäre Leukämie; MDS, myelodysplastische Syndrome; MPNu, unklassifizierte myeloproliferative Neoplasie; CEL, chronische Eosinophilenleukämie; HES, hypereosinophiles Syndrom; AML, akute myeloische Leukämie; MF, Myelofibrose; CLL, chronische lymphatische Leukämie; PV, Polycythaemia Vera

3.1.1 Erstellen des Karyotyps

Von allen 109 SM-Patienten wurden zytogenetische Analysen durchgeführt. Bei 85 % (93/109) der Patienten wurde ein normaler Karyotyp ermittelt (siehe 1.5), wobei die restlichen 15 % (16/109) entweder initial, oder im *follow-up* einen aberranten Karyotyp aufwiesen (Tab. 8).

Um komplex aberrante Karyotypen aufzuschlüsseln, wurde neben der konventionellen Zytogenetik ebenfalls eine *Multicolor-Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung* (M-FISH) durchgeführt. Die Ergebnisse beider Detektionsmethoden sind in Abbildung 6 exemplarisch für einen komplex aberranten Karyotyp (Patient #13, Zeitpunkt AML) dargestellt (für den detaillierten Karyotyp siehe Tab. 12). Anhand des Karyogramms des gezeigten Klons konnten die Deletionen del(5)(q14q34), del(7)(q22q36) und del(17)(q11q21), sowie das Ringchromosom 11 und die Monosomie 13 eindeutig identifiziert werden (Abb. 6 A, rote Pfeile). Das derivative Chromosom 3 mit der Translokation t(3;13)(p14;p13), sowie das derivative Chromosom der(17;21)(q10;q10) konnten durch die fluoreszenzbasierte M-FISH ebenfalls bestätigt werden (Abb. 6 B, rote Pfeile). Zur vereinfachten schematischen Darstellung dient das Ideogramm des detektierten Klons (Abb. 6 C, alle Abnormitäten rot umrandet).

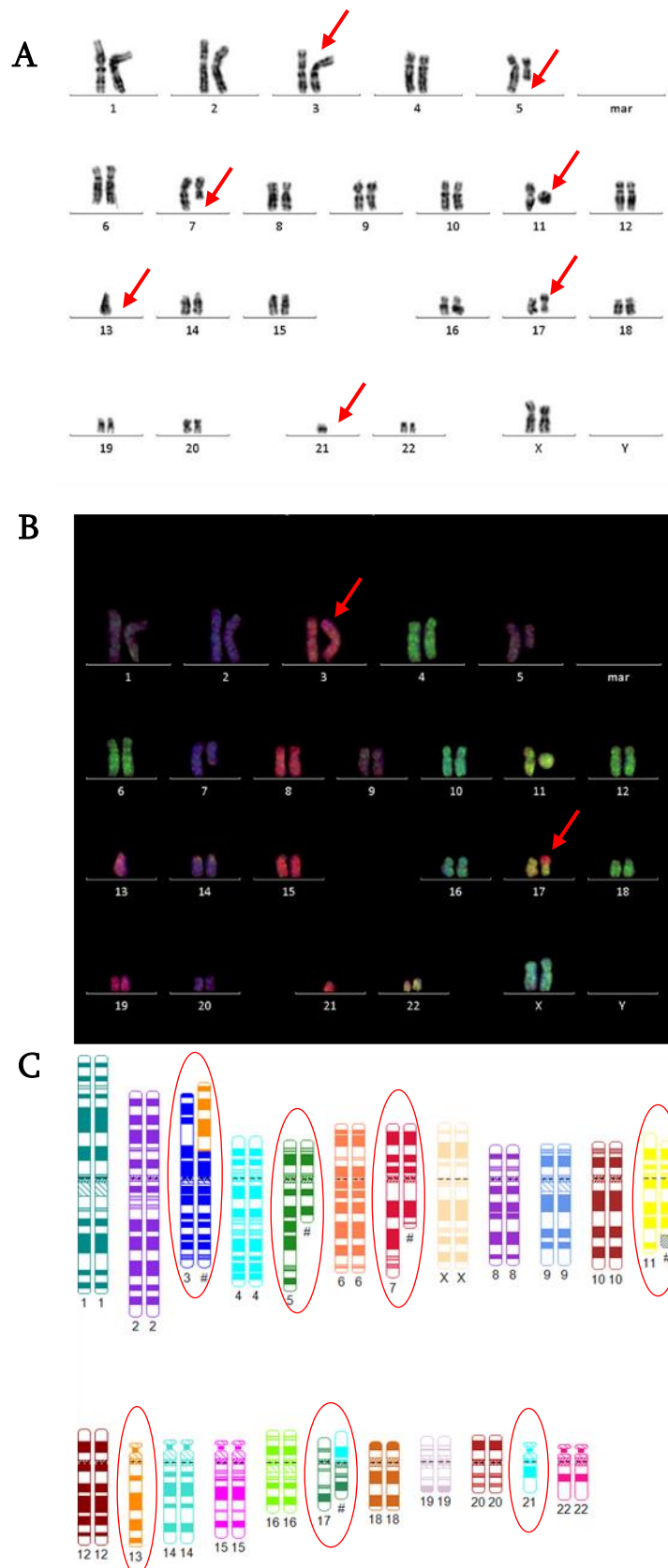


Abb. 6: Komplex abnormer Klon. (A) Karyogramm. Rote Pfeile kennzeichnen chromosomale Aberrationen wie die Deletionen 5q und 7q, das Ringchromosom 11 oder die Monosomie 13. (B) Multicolor-FISH zum zweifelsfreien Nachweis der Translokation $t(3;13)$. (C) Ideogramm des vorliegenden Klonen mit allen Veränderungen (rot umrandet). Alle Bilder wurden freundlicherweise vom Münchner Leukämie Labor (MLL) zur Verfügung gestellt.

3.1.2 Auftreten von Zusatzmutationen

Wie bereits in Tabelle 8 beschrieben, wurden neben Mutationen in *KIT* auch verschiedene zusätzliche Mutationen in einer Vielzahl weiterer Gene gefunden. Dabei handelte es sich hauptsächlich um Gene, die häufig bei Erkrankungen der AHNs zu finden sind. Dementsprechend selten findet man Zusatzmutationen bei indolenten Verlaufsformen der SM, sowie bei der ASM oder MCL, und häufiger bei Patienten mit einer SM/MCL-AHN. Wir fanden unter 14 Patienten mit ISM/SSM nur 3 Zusatzmutationen und bei 3 Patienten mit ASM und 8 Patienten mit MCL nur jeweils eine Zusatzmutation. Hingegen lagen bei 10 Patienten mit MCL-AHN 21 Mutationen, und unter 56 SM-AHN Patienten 107 Zusatzmutationen vor (Abb. 7).

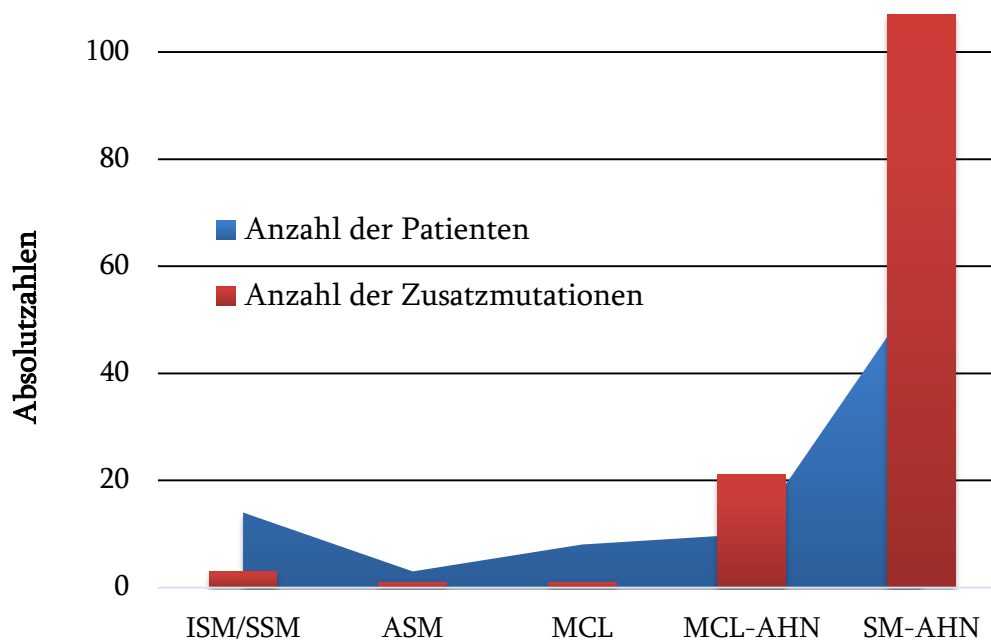


Abb. 7: Verteilung von Zusatzmutationen bei SM-Patienten. Patienten ohne AHN (ISM, ASM und MCL) haben deutlich weniger Zusatzmutationen als Patienten mit AHN (SM-AHN, MCL-AHN). Abkürzungen: SM, systemische Mastozytose; AHN, assoziierte hämatologische Neoplasie; ISM, indolente systemische Mastozytose; SSM, schwelende systemische Mastozytose; ASM, aggressive systemische Mastozytose; MCL, Mastzelleukämie.

3.1.3 Detaillierte Patientenübersicht von 83 Patienten mit fortgeschrittener SM

Da die Mehrheit der Patienten mit indolenter SM weder Zusatzmutationen noch einen Überlebensnachteil haben konzentrierten wir uns auf Patienten mit fortgeschrittenen Verlaufsformen (n=83). Unter diesen 83 Patienten konnten wir bei 77 Patienten den gesamten Mutationsstatus erheben. 75/77 (97 %) der Patienten wiesen eine Mutation im *KIT*-Gen (D816V n=73, 97 %; D816H n=2; 3 %) auf. Von 75 Patienten zeigten 83 % (62/75) mindestens eine Zusatzmutation. 29 % (22/75) wiesen eine weitere Aberration, jeweils 24 % (18/75) zwei und drei Zusatzaberrationen und 5 % (4/75) mehr als 3 weitere Mutationen auf. Bei 13/75 Patienten (17 %) konnte neben der *KIT*-Mutation keine weitere Zusatzaberration gefunden werden.

Alle Patienten mit aberrantem Karyotyp (16/16, 100 %) litten unter einer fortgeschrittenen SM, die Art der chromosomalen Aberration war aber für jeden Patienten individuell. Neben 4/16 (25 %) Patienten mit einem 5q- Syndrom, detektierten wir einen Patienten mit einer Deletion 1q, einen mit einer Trisomie 8, einen mit einer Monosomie 7 und einen Patienten mit einer Deletion 12p (jeweils 1/ 17 %). Darüber hinaus zeigten 50 % (8/16) der Patienten einen komplex aberranten Karyotyp. Ein komplex aberranter Karyotyp lag vor, wenn drei und mehr chromosomale Veränderungen detektiert wurden (ISCN 2016).

Unter den 16 Patienten konnten bei 75 % (12/16) molekulare Zusatzaberrationen detektiert werden. Dabei hatten 50 % (6/12) eine weitere molekulare Aberration, 25 % (3/12) zwei weitere Mutationen und 25 % (3/12) drei oder mehr molekulare Zusatzaberrationen (Abb. 8).

3.1.4 Mutationskombinationen

Wie in Abb. 9 dargestellt, kamen bestimmte Mutationen häufiger in Kombination vor als andere. Insgesamt konnten unter 62 Patienten mit fortgeschrittener SM (mit *KIT*-Mutation und mindestens einer Zusatzmutation), eine sehr heterogene Gruppe von 37 verschiedenen Mutationsprofilen beobachtet werden.

Die häufigsten Kombinationen sind beispielsweise *KIT-JAK2* (n=8), *KIT-TET2* (n=4), *KIT-TET2-SRSF2* (n=7), *KIT-TET2-SRSF2-CBL* (n=3) und *KIT-TET2-SRSF2-ASXL1* (n=4). Allein das gemeinsame Vorkommen von *KIT* und *TET2*, sowie von *KIT* und *SRSF2* fanden wir in jeweils 29/62 (47 %) und 27/62 (44 %) der Patienten.

Weniger häufig wurden Mutationskombinationen wie *KIT-K/NRAS* (n=3) oder *KIT-TET2-SRSF2-RUNX1* (n=2) gefunden. Die meisten Kombinationen wie beispielsweise *KIT-ASXL1-CBL* oder *KIT-U2AF1-ETNK1-DNMT3a* blieben einzigartig (27/37 Kombinationen; 73 %).

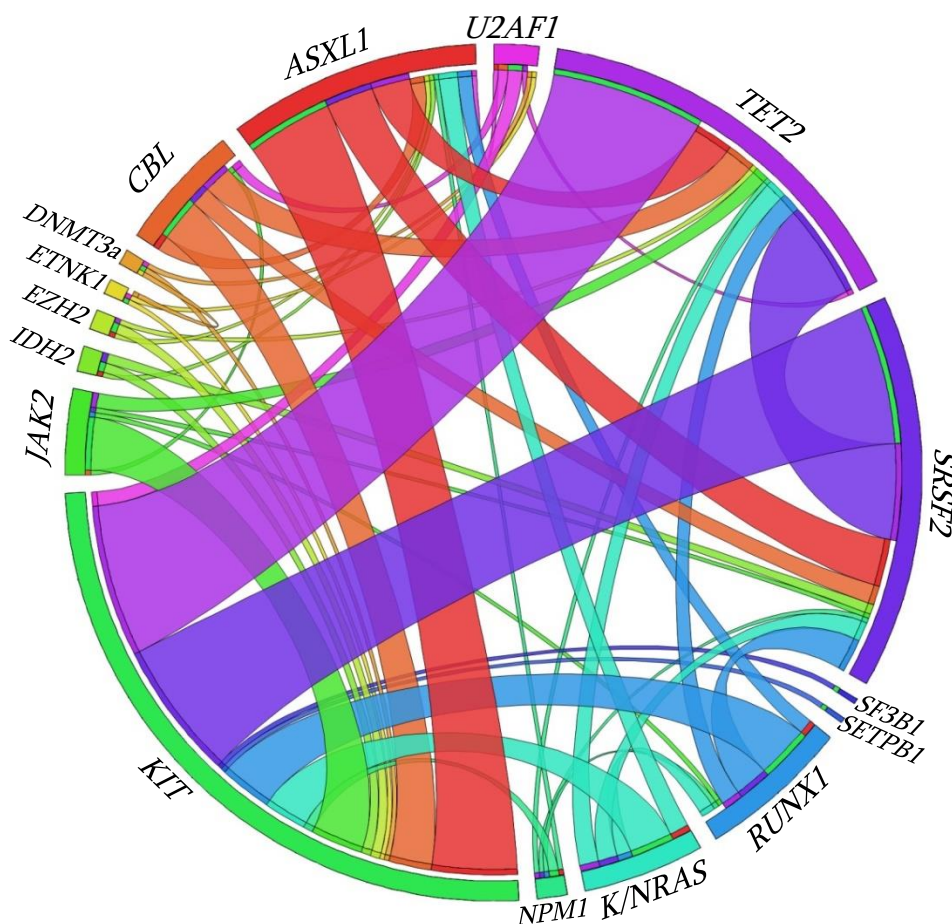


Abb. 9: Mutationskombinationen von 16 Genen bei 62 Patienten mit fortgeschrittener SM, *KIT*-Mutation und mindestens einer Zusatzmutation. Die Anzahl der verschiedenfarbigen Bänder innerhalb eines Gens entspricht dem paarweisen Vorkommen der Mutationen. Die Breite der Bänder entspricht der relativen Frequenz der gleichzeitig auftretenden Mutationen.

3.1.5 Klinische und laborchemische Parameter

Um spezifische Parameter zu identifizieren, in denen sich Patienten mit aberrantem Karyotyp von Patienten mit normalem Karyotyp unterscheiden, wurden für die Erkrankung charakteristische laborchemische und klinische Daten gegenübergestellt (Tab. 9).

Verschiedene Parameter von 83 Patienten mit fortgeschrittener SM wurden analysiert. Über die Hälfte der Patienten (53/83, 64 %) waren männlich und durchschnittlich 64 Jahre alt. Der mediane Hämoglobin (Hb) Wert lag bei 10,5 g/dl und war damit im Durchschnitt zu niedrig. Obwohl der Durchschnittswert der Thrombozyten mit $168 \times 10^9/l$ im Normbereich lag, war die Anzahl der Thrombozyten bei den meisten Patienten erniedrigt (Abb. 10).

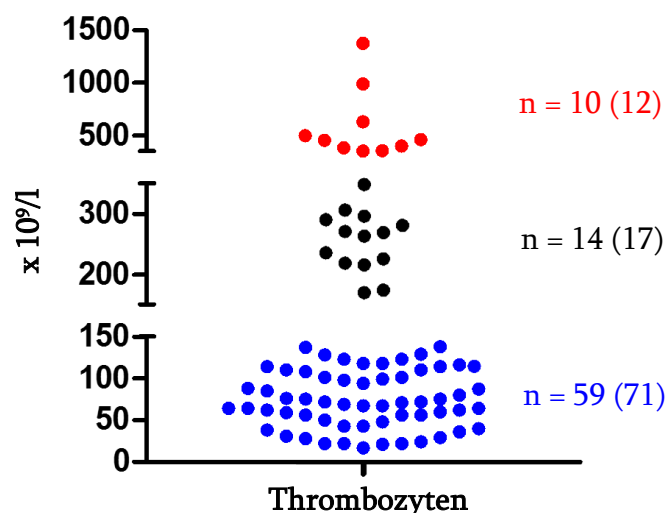


Abb. 10: Verteilung der Thrombozytenwerte bei 83 Patienten mit fortgeschrittener SM. Jeder Punkt repräsentiert einen Patienten. Blaue Punkte markieren die Thrombozytenmesswerte, die unterhalb des Normbereiches gemessen wurden (59/83, 71 %). Schwarze Punkte kennzeichnen Thrombozytenmesswerte im Normbereich (14/83, 17 %) und rote Punkte zeigen Messwerte überhalb der Norm (10/83, 12 %). Werte in Klammern zeigen den jeweiligen prozentualen Anteil.

Bei den Leukozyten ($12,3 \times 10^9/l$), der alkalischen Phosphatase (179 U/l), den Monozyten ($1,1 \times 10^9/l$), den Eosinophilen ($2,3 \times 10^9/l$) und der Serumtryptase (225 $\mu\text{g/l}$), wurden erhöhte Werte gemessen. Die Allellast der *KIT*-D816V-Mutation im PB lag durchschnittlich bei 21 % (Tab. 9).

Die Laborwerte von Patienten mit normalem und aberrantem Karyotyp unterschieden sich nur wenig voneinander. Der einzige signifikante Unterschied lag in der Anzahl an Monozyten vor. Die Monozytose der Patienten mit aberrantem Karyotyp war signifikant stärker ausgeprägt als bei Patienten mit normalem Karyotyp ($p < 0,034$).

Auch klinische Parameter wie starker Gewichtsverlust von mindestens 10 kg innerhalb von 6 Monaten, Hepatomegalie mit Ascites, Hepatomegalie allein, Splenomegalie oder Lymphadenopathie (zusammengefasst als „Organomegalie“) sowie Mastzellinfiltration im KM ergaben keine signifikanten Unterschiede bei Patienten mit normalem vs. aberrantem Karyotyp (Tab. 9).

Tab. 9: Klinische und laborchemische Parameter von 83 Patienten mit fortgeschrittener SM und normalem oder aberrantem Karyotyp

	Referenz- werte	alle Patienten (n=83)	normaler Karyotyp (n=67)	aberranter Karyotyp (n=16)	P-Wert normaler vs. aberranter Karyotyp
Alter in Jahren		64 (30 - 82)	65 (30 - 80)	61 (38 - 82)	n.s.
männlich, n (%)		53 (64)	42 (63)	11 (69)	n.s.
C-findings					
Hämoglobin, g/dl	13,2 - 16,7	10,5 (6-21)	10,7 (7-21)	9,6 (6- 14)	n.s.
Thrombozyten, x 10 ⁹ /l	145 - 348	168 (17-1375)	165 (21-1375)	173 (17-632)	n.s.
alkalische Phosphatase, U/l	55 - 105	179 (45-743)	189 (45-743)	142 (60-339)	n.s.
Albumin, g/l	34 - 50	36 (19-49)	37 (19-49)	34 (21-43)	n.s.
Gewichtsverlust (>10 kg in 6 Mo.), n (%)		33 (40)	29 (43)	4 (25)*	n.s.
Hepatomegalie mit Ascites, n (%)		28 (34)	26 (39)	3 (19)	n.s.
B-findings					
Mastzellinfiltration im KM, %		32 (3-95)	33 (3-95)	24 (3-70)	n.s.
Serumtryptase, µg/l	< 11,4	225 (5-1326)	226 (5-1300)	211 (9-1326)	n.s.
Organomegalie ^a		73 (88)	63 (94)	10 (63)	n.s.
andere relevante Parameter					
Leukozyten, x 10 ⁹ /l	4,2 - 10,2	12,3 (0,5-74)	11,6 (0,5-74)	15 (2-54)	n.s.
Monozyten, x 10 ⁹ /l	0,3 - 0,8	1,1 (0,07-17)	0,9 (0,07-8)	2,2 (0,2-17)	0,034
Eosinophile, x 10 ⁹ /l	0 - 0,4	2,3 (0-35)	2,4 (0-35)	1,9 (0-10)	n.s.
<i>KIT</i> D816V ⁺ AB in PB, %	0	21 (0-100)	20 (0-100)	19 (0-50)	n.s.

Alle Werte entsprechen bei Patienten mit normalem Karyotyp dem Zeitpunkt der Diagnose und bei Patienten mit aberrantem Karyotyp dem Zeitpunkt des Auftretens des ersten aberranten Karyotyps. Abkürzungen: AB, Allellast; PB, peripheres Blut; n.s., nicht signifikant; KM, Knochenmark; ^a Hepatomegalie, Splenomegalie und/oder Lymphadenopathie. * Informationen waren bei 63 % (10/16) Patienten verfügbar.

3.1.6 Einteilung des Karyotyps in „geringes Risiko“ und „hohes Risiko“

Durch zahlreiche Publikationen anderer hämatologischer Entitäten weiß man, dass bestimmte Karyotypen prognostisch günstig, bzw. ungünstig sind. Anhand dieser Daten wurden die Karyotypen der 16 Patienten mit aberrantem Karyotyp einer Gruppe mit „geringem Risiko“, und einer Gruppe mit „hohem Risiko“ zugeordnet. Die Gruppe mit aberranten Karyotypen, die prognostisch günstig einzustufen sind („geringes Risiko“), umfasst 38 % (6/16) der Patienten. Die Gruppe mit Karyotypen, die prognostisch ungünstig einzuteilen sind („hohes Risiko“), umfasst 62 % (10/16) der Patienten. Zur Gruppe „geringes Risiko“ wurde die Deletion 5q beim MDS, die Deletion 1q, die Deletion 12p und die Trisomie 8 eingeordnet. Zur Gruppe „hohes Risiko“ zählte das 5q- Syndrom bei der AML, die Monosomie 7 und ein komplex aberranter Karyotyp (Abb. 11).

Die Einteilung der Karyotypen erfolgte immer anhand des ersten detektierbaren aberranten Karyotyps.

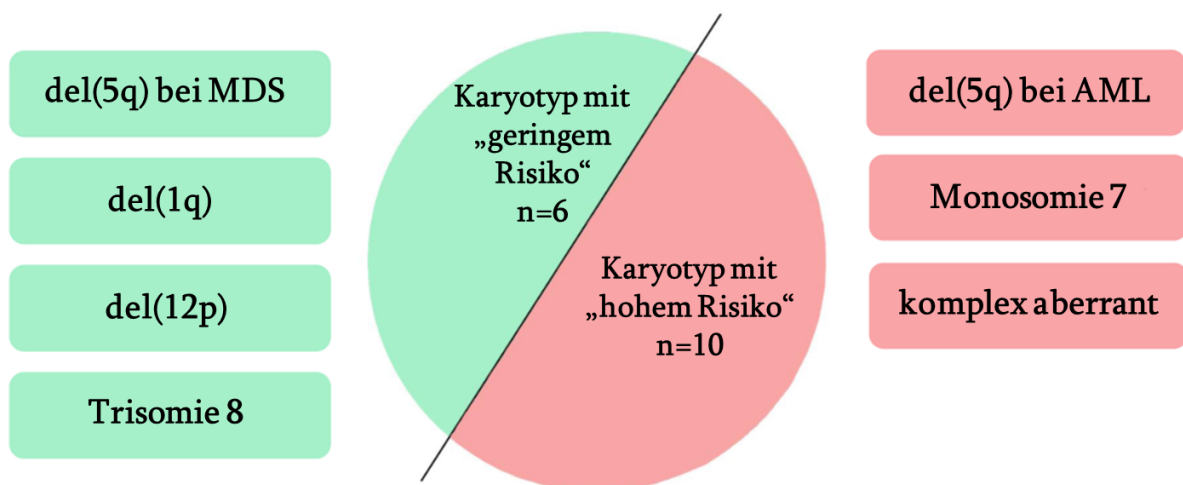


Abb. 11: Einteilung des aberranten Karyotyps nach "geringes Risiko" und "hohes Risiko". Zur Gruppe der Karyotypen mit geringem Risiko zählen die Deletion 5q beim MDS, die Trisomie 8 sowie die Deletionen 1q und 12p. Zur Gruppe „hohes Risiko“ zählen komplex aberrante Karyotypen, die Monosomie 7 und die Deletion 5q bei der AML.

3.1.7 Aberranter Karyotyp und Krankheitsverlauf (n=16)

Abbildung 12 zeigt die klinischen Verläufe der 16 Patienten mit aberrantem Karyotyp (#1 bis #16). 50 % (8/16) der Patienten (#9 bis #16) haben im Laufe ihrer Erkrankung einen Progress erlitten (siehe auch Tab. 10). Alle Patienten, die einen prognostisch günstigen Karyotyp („geringes Risiko“) haben, sind teilweise auch nach mehreren Jahren, progressionsfrei (#1, #2, #3, #5, #7), während Patienten mit einem prognostisch ungünstigen Karyotyp („hohes Risiko“) oftmals nur wenige Monate nach der Detektion des Karyotyps verstorben sind (#9 bis #16). Ein Patient (#13) zeigt eine Karyotypevolution von prognostisch günstigen in prognostisch ungünstigen Karyotyp.

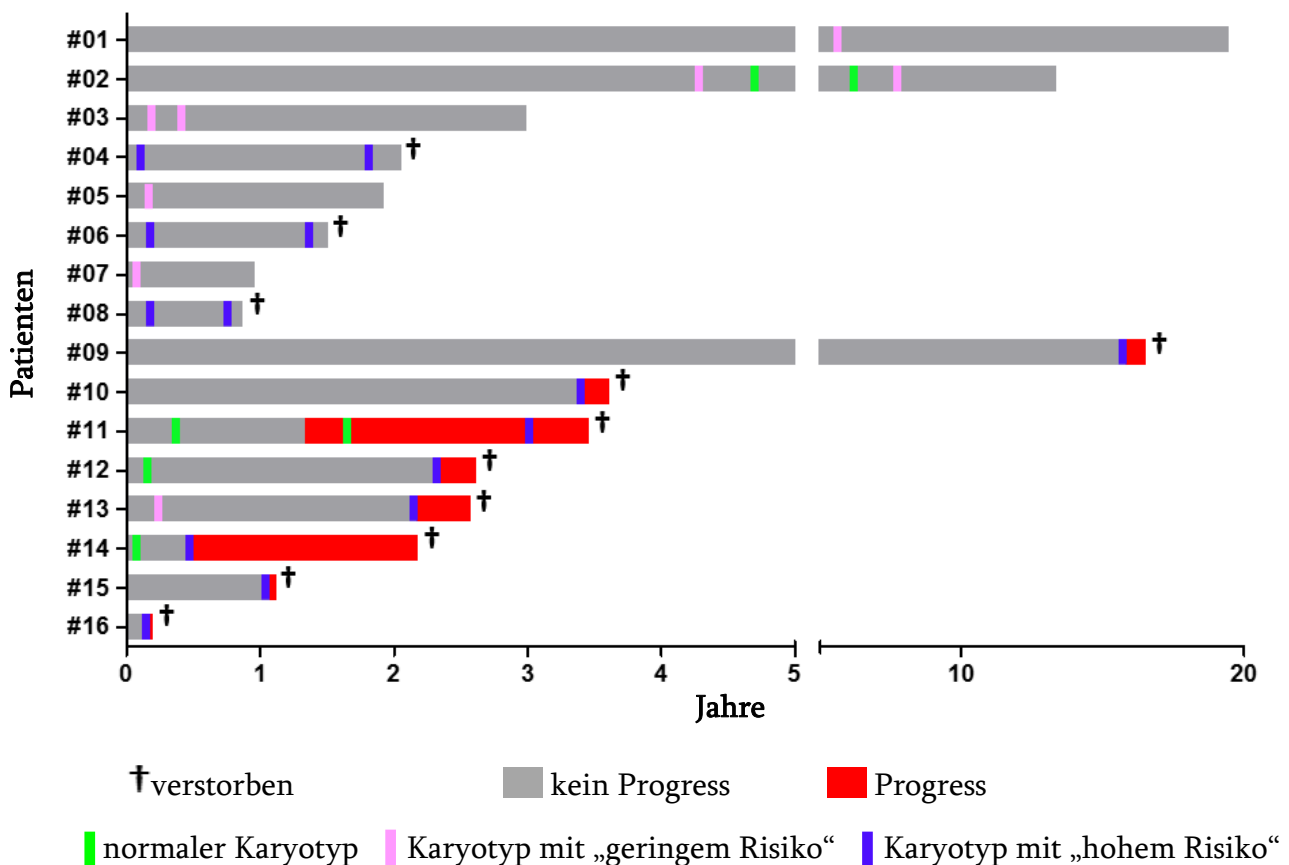


Abb. 12: Klinische Verläufe von 16 SM-Patienten mit aberrantem Karyotyp. Patienten #01 bis #08 haben keinen Progress erlitten, während Patienten #09 bis #16 progredient waren (rot). Alle Patienten mit einem prognostisch ungünstigen Karyotyp (violett) sind verstorben, während Patienten mit einem prognostisch günstigen Karyotyp (rosa) auch nach teils jahrelanger Krankheit leben.

Insgesamt zeigten 50 % (3/6) der Patienten (#11, #13, #16) mit der initialen Diagnose SM-MDS, und 75 % (3/4) mit der Initialdiagnose SM-CMML (#9, #10, #12) einen Progress in eine MCL und/oder AML. 25 % (2/8) der Patienten, die progredient waren, bekamen eine MCL (#9, #11), während 88 % (7/8) der Patienten (#9, #10, #12-#16) eine sekundäre AML entwickelten (Tab.10). Ein Patient transformierte in eine MCL-AML (#9).

Tab. 10: Diagnosen von 16 Patienten mit aberrantem Karyotyp initial und nach Progress

Patient	initiale Diagnose	Diagnose nach Progress
#1	SM-CMML	k.P.
#2	SM-MDS	k.P.
#3	SM-MDS/MPNu	k.P.
#4	SM-MDS	k.P.
#5	SM-MDS	k.P.
#6	MCL-AML	k.P.
#7	MCL	k.P.
#8	SM-AML	k.P.
#9	SM-CMML	MCL-AML
#10	SM-CMML	SM-AML
#11	SM-MDS	MCL-MDS
#12	SM-CMML	SM-AML
#13	SM-MDS	SM-AML
#14	SM	SM-AML
#15	SM-MPNu	SM-AML
#16	SM-MDS	SM-AML

Abkürzungen: k.P., kein Progress; SM, systemische Mastozytose; MCL, Mastzelleukämie; CMML, chronische myelomonozytäre Leukämie; MDS, myelodysplastische Syndrome; MPNu, unklassifizierte myeloproliferative Neoplasien; AML, akute myeloische Leukämie.

3.1.8 Aberranter Karyotyp (n=16)

50 % (8/16) der Patienten mit einem aberranten Karyotyp zeigen im Laufe ihrer Erkrankung keinen Progress. Die Karyotypen dieser Patienten sind in Tabelle 11 dargestellt. 63 % (5/8) wiesen einen prognostisch günstigen Karyotyp (Patienten #1, #2, #3, #5, #7) und 37 % (3/8) einen prognostisch ungünstigen Karyotyp (Patienten #4, #6, #8) auf.

Tab. 11: Karyotypen der Patienten mit aberrantem Karyotyp ohne Progress (n=8)

Patient	Karyotyp
#1	46,XY,del(1)(q21q23)[7]/ 46,XY[13]
#2	46,XY,del(5)(q13q31)[14]/ 46,XY[1]
#3	46,XY,del(5)(q14q34)[3]/ 46,XY[19]
#4	47,XY,+der(1;19)(q10;p10)[2]/ 46,XY,der(6)t(1;6)(q21;p22)[1]/ 46,XY,+1,der(1;15)(q10;q10)[1]/ 46,XY[17]
#5	47,XY,+8[25]
#6	46,XX,del(8)(q21),der(10)t(8;10)(q22;q26), r(12)(p12q15),der(16)t(12;16)(q21;q22) inv(12)(q21q24)[8]/ 46,XX[13]
#7	46,XX,del(12)(p13p13)[3]/ 46,XX[18]
#8	45,XY,-7[20]

50 % (8/16) der Patienten mit aberrantem Karyotyp waren im Lauf der Erkrankung progredient. Der Karyotyp dieser Patienten ist (vor und nach Progress) in Tabelle 12 zusammengefasst. Nur 1/8 (13 %, #13) konnte in die Gruppe der prognostisch günstigen Karyotypen eingeordnet werden. Die verbleibenden 87 % (7/8) der Patienten wurden in die prognostisch ungünstige Gruppe eingeordnet.

Tab. 12: Karyotyp der Patienten mit aberrantem Karyotyp mit Progress (n=8)

Patient	Initialer Karyotyp	Karyotyp nach Progress
#9	n.b.	46,XX,del(5)(q13q31)[25]
#10	n.b.	47,XX,t(5;10)(q34;p15),+8,der(19)t(3;19)(q11;q13)[7]/ 47,XX,+8,der(19)t(3;19)(q11;q13)[11]/ 47,XX,+8[1]/ 46,XX[1]
#11	46,XY[20]	46,XY,der(9)t(1;9)(q21;q22),idic(9)(p11)[6]/ 46,XY[17]
#12	46,XY[20]	48,XY,+8,+13[2]/ 49,idem,+21[5]/ 52,idem,+9,+18,+22[1]/ 46,XY[17]
#13	46,XX,del(5)(q14q34)[16] 46,XX[6]	46,XX,del(5)(q14q34)[1]/ 44,XX,der(3)t(3;13)(p14;p13),del(5)(q14q34),del(7)(q22q36), r(11)(p15q23)hsr(11)(q23),-13,der(17;21)(q10;q10)del(17)(q11q21)[14]
#14	46,XY[20]	47,XY,+r(17)(p11q11)[12]/ 46,XY,der(10)t(10;15)(p12;q25),der(12)t(12;17)(p11;q23), del(15)(q21),der(17)t(15;17)(q21;q25)t(15;10)(q25;p12)[2]/46,XY[5]
#15	46,XY[20]	47,XY,+8,der(10;19)(q10;p10),+19[4]/ 58<2n>,XY,+del(X)(p11p22),+Y,+1,+5,+6,+8,+8,+12,+13,+16,+20,+22[5]/ 46,XY[9]
#16	n.b.	44,XY,del(5)(q14q34),del(7)(q21q35),dic(12;13)(p12;p11), der(17)t(1;17)(p22;p13),der(17;22)(q10;q10)[6]/ 43,XY,del(5)(q14q34),-7,+r(8)(q24q23),der(8;15)(q10;q10), dic(12;16)(p11;q11),der(17;22)(q10;q10)[5]/ 46,XY[2]

Abkürzungen: n.b., nicht bestimmt

3.1.9 Kaplan-Meier Überlebenskurven

Patienten mit einer fortgeschrittenen SM (n=83) wurden anhand ihres Karyotyps und ihres molekularen Status in verschiedene Gruppen eingeteilt und in Kaplan-Meier Kurven miteinander verglichen (Abb. 13). Generell hatten Patienten mit einem aberranten Karyotyp eine signifikant schlechtere Überlebenswahrscheinlichkeit als Patienten mit einem normalen Karyotyp ($p < 0,01$, Abb. 13 A). Wird die Gruppe der Patienten mit aberrantem Karyotyp zusätzlich in Karyotypen mit geringem und hohem Risiko (siehe Punkt 3.1.6) eingeteilt, wird der Abstand beider Kurven noch deutlicher (Abb. 13 B) und zeigt einen signifikanten p-Wert von 0,0001.

Inkludiert man den S/A/R Mutationsstatus wird ersichtlich, dass Patienten mit einem prognostisch günstigen Karyotyp ohne Mutationen in S/A/R einen signifikant besseren Verlauf hatten als Patienten mit einem ebenso günstigen Karyotyp, allerdings mit einer oder mehreren Mutationen in den Genen S/A/R ($p < 0,02$). Beide Gruppen hatten dennoch einen hoch signifikanten Überlebensvorteil gegenüber Patienten mit einem prognostisch ungünstigen Karyotyp, und zwar unabhängig davon, ob Mutationen in S/A/R vorhanden waren oder nicht ($p < 0,0001$, Abb. 13 C).

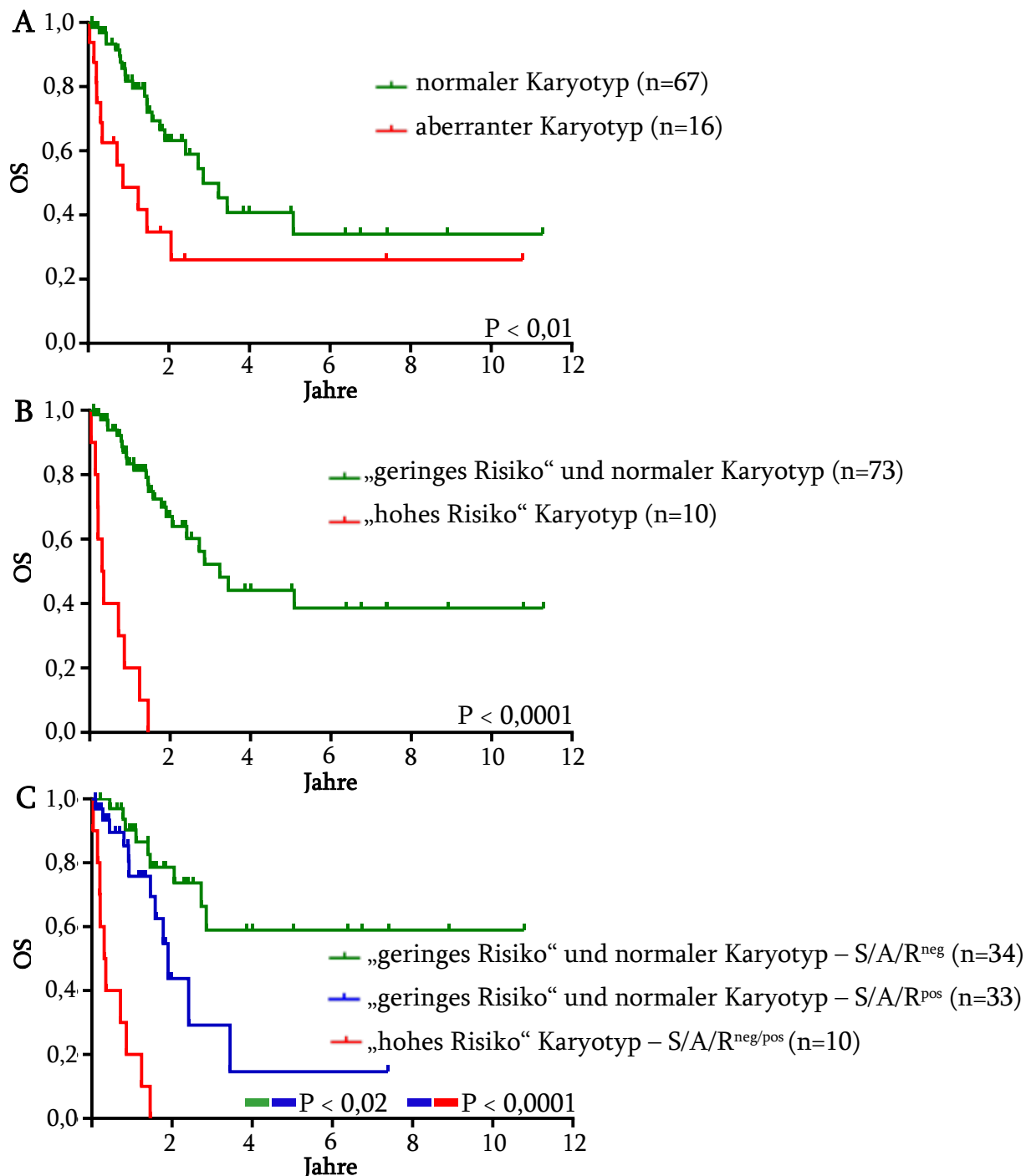


Abb. 13: Kaplan-Meier Überlebenskurven von Patienten mit fortgeschrittener SM. (A) Patienten mit normalem Karyotyp hatten eine signifikant bessere Überlebenswahrscheinlichkeit als Patienten mit aberrantem Karyotyp. (B) Patienten mit einem normalem oder prognostisch günstigem („geringes Risiko“) Karyotyp hatten eine signifikant bessere Überlebenswahrscheinlichkeit als Patienten mit einem prognostisch ungünstigem („hohes Risiko“) Karyotyp. (C) Patienten mit einem „geringes Risiko“ oder normalem Karyotyp und keinen Mutationen in *SRSF2*, *ASXL1* und *RUNX1* (S/A/R^{neg}) wiesen eine signifikant bessere Überlebenswahrscheinlichkeit auf als Patienten mit einem „geringes Risiko“ oder normalem Karyotyp und einer Mutation in einem oder mehreren der Gene *SRSF2*, *ASXL1* und/oder *RUNX1* (S/A/R^{pos}). Beide Gruppen hatten außerdem einen signifikanten Überlebensvorteil gegenüber Patienten mit einem „hohes Risiko“ Karyotyp, unabhängig vom Mutationsstatus. Abkürzungen: OS, Überlebenswahrscheinlichkeit („overall survival“); p, p-Wert berechnet mittels Mantel-Cox Test.

3.2 Kolonien von hämatopoetischen Zellen

3.2.1 Detektion von Mutationen in Kolonien

3.1.7.1 Detektion von Mutationen durch Sanger-Sequenzierung

Punktmutationen in den Genen *KIT*, *TET2*, *NRAS* und *TP53* wurden mit Hilfe der Sanger-Sequenzierung bestimmt. Anhand der resultierenden Elektropherogramme konnte innerhalb des *KIT*-Gens die Mischbase W an Position 2447 der codierenden *KIT*-Sequenz nachgewiesen werden (Abb. 14 A).

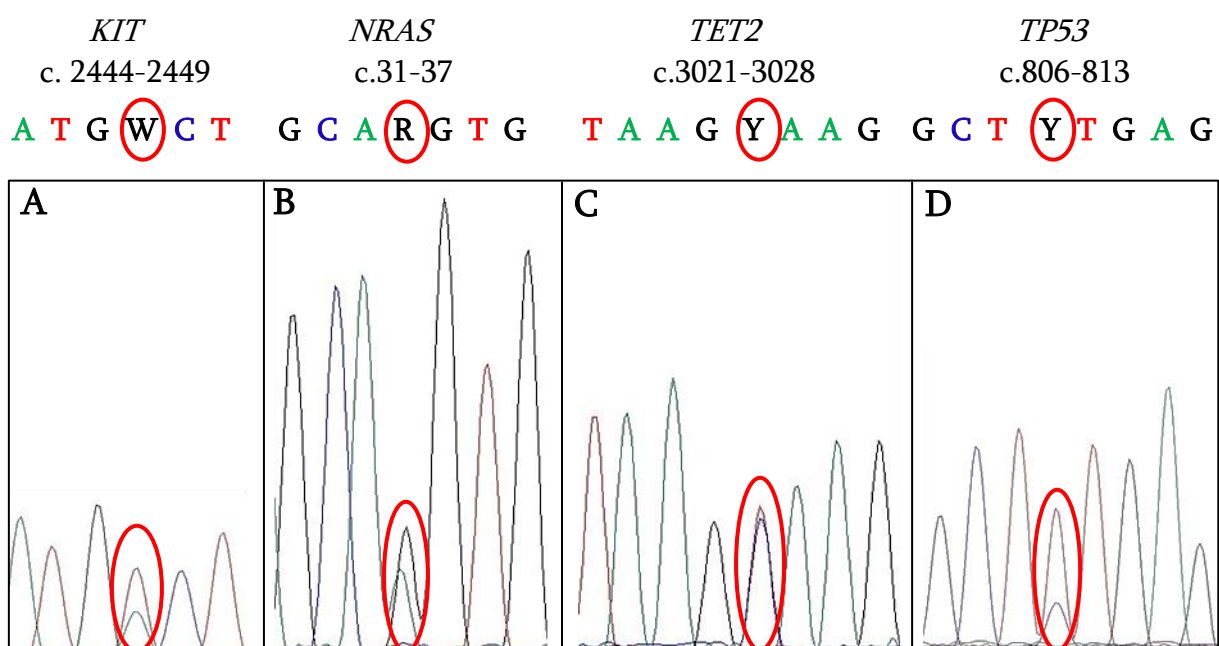


Abb. 14: Elektropherogramme von Punktmutationen in den Genen *KIT*, *NRAS*, *TET2* und *TP53*. Im *KIT*-Gen konnte die Mischbase W an Position c.2447 durch den Austausch der Basen A und T detektiert werden. An Position c.34 wurde die Mischbase R durch den Basenaustausch von G und A im *NRAS*-Gen gemessen. Die Mischbase Y (Austausch von C und T) wurde im *TET2*-Gen an Position c.3025 und im *TP53*-Gen an Stelle c.809 detektiert.

Mischbase W heißt, dass an dieser Stelle entweder ein T oder ein A detektiert wurde, was zu der Mutation D816V führt. Abb. 14 B zeigt die Detektion der Mischbase R an Position c.34 innerhalb des *NRAS*-Gens. An dieser Stelle konnte entweder ein G oder ein A gemessen werden, was zu der Mutation G12S führt. Der Austausch der Basen C und T (dargestellt durch die Mischbase Y) führt im *TET2*-Gen an Stelle c.3025 zur Mutation Q1009* und im *TP53*-Gen an Position c.809 zur Mutation F270S (Abb. 14 C,D).

Insertionen, Deletionen oder Duplikationen führen zu einer Verschiebung des Leserahmens und sind als Untergrund in der Sequenz erkennbar. Exemplarisch dafür ist die 23 bp große Deletion des *ASXL1*-Gens an Position c.1900_1922 in Abb. 15 dargestellt.

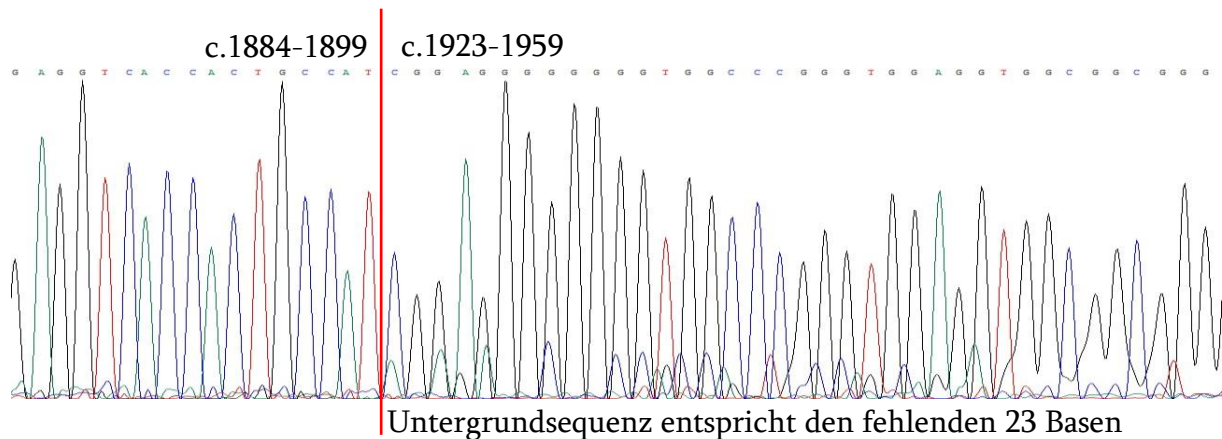


Abb. 15: Elektropherogramm der 23 bp Deletion im *ASXL1*-Gen. Die rote Linie kennzeichnet den Beginn der 23 bp starken Untergrundsequenz. Die Basenabfolge der Untergrundsequenz entspricht der Deletion. Als dominierende Hauptsequenz wurde die deletierte Sequenz gemessen.

3.1.7.2 Detektion von Mutationen durch allelspezifische qualitative PCR

Die Detektion der V617F-Mutation im *JAK2*-Gen, sowie die Detektion der P95H-Mutation im *SRSF2*-Gen erfolgte über eine allelspezifische qualitative PCR mit anschließender Gelelektrophorese. Die V617F-Mutationen im *JAK2*-Gen konnte bei Patient #3 in 100 % (10/10) der Kolonien nachgewiesen werden (Abb. 16 A). Die Mutation P95H im *SRSF2*-Gen konnte in den Kolonien von Patient #15 ebenfalls in 100 % (10/10) detektiert werden (Abb. 16 B).

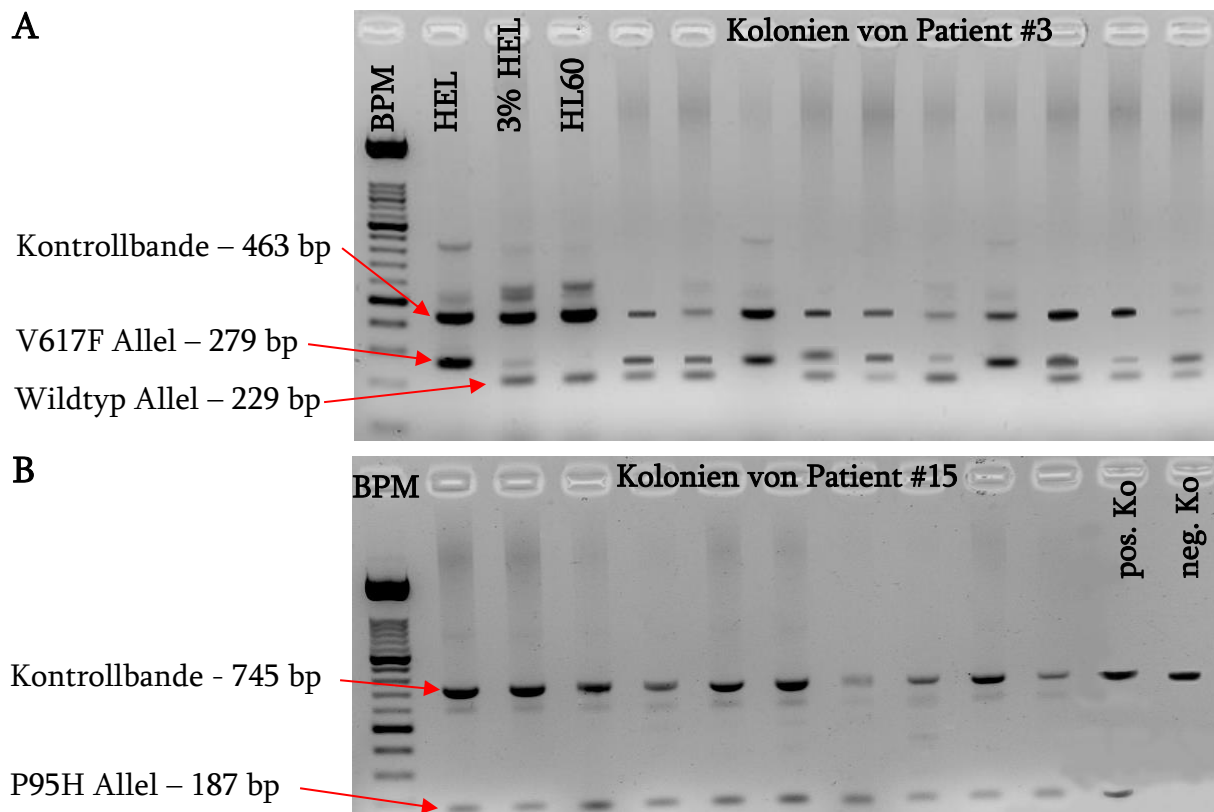


Abb. 16: Allelspezifischer, qualitativer Nachweis der *JAK2* V617F und der *SRSF2* P95H Mutation. (A) Gelbild nach allelspezifischer *JAK2* V617F PCR. Als Positivkontrolle diente die Zelllinie HEL und als Negativkontrolle die Zelllinie HL60. Alle 10 Kolonien von Patient #3 trugen die V617F-Mutation. (B) Gelbild nach allelspezifischer *SRSF2* P95H PCR. Als Positivkontrolle diente eine zuvor sequenzierte positive Patientenprobe. Als Negativkontrolle diente gesunde DNA. Alle 10 Kolonien von Patient #15 trugen die P95H Mutation. Abkürzungen: BPM, Basenpaarmarker; bp, Basenpaare; pos. Ko, Positivkontrolle; neg. Ko, Negativkontrolle.

3.2.2 Detektion chromosomaler Aberrationen in Kolonien

Um spezifische chromosomale Veränderungen in den Kolonien der Patienten nachzuweisen, wurde eine *FISH*-Analyse angewandt. Für die Kolonien der Patienten #5, #10 und #15 wurde eine Sonde verwendet, die Teile des Chromosoms 8 markiert. Für Kolonien der Patienten #3, #9 und #13 wurde eine Sonde verwendet, die den langen Arm von Chromosom 5 markiert. In Abb. 17 sind exemplarisch gesunde Zellen, Zellen mit Trisomie 8 (Abb. 17 C, in rot) und Zellen mit 5q-Syndrom (Abb. 17 B, in rot) dargestellt. Während alle Zellen zwei grüne Signale anzeigen (Referenzsonde), variiert die Anzahl an roten Signalen. Grüne Signale zeigen Kontrollgene an, die in allen Patienten weder deletiert noch dupliziert sein sollten.

Zwei grüne Signale (diploider Chromosomensatz) zeigen damit die erfolgreiche Durchführung des Experimentes.

Das rote Signal zeigt jeweils die Anzahl der Chromosomen 8, bzw. das Vorhandensein des langen Arms von Chromosom 5 an. Gesunde Zellen besitzen zwei grüne, sowie zwei rote Signale (Abb. 17 A). Zellen mit 5q-Syndrom zeigen zwei grüne, aber nur ein rotes Signal (Abb. 17 B). In den Zellen mit einer Trisomie 8 leuchten neben zwei grünen Fluoreszenzsignalen drei rote (Abb. 17 C).

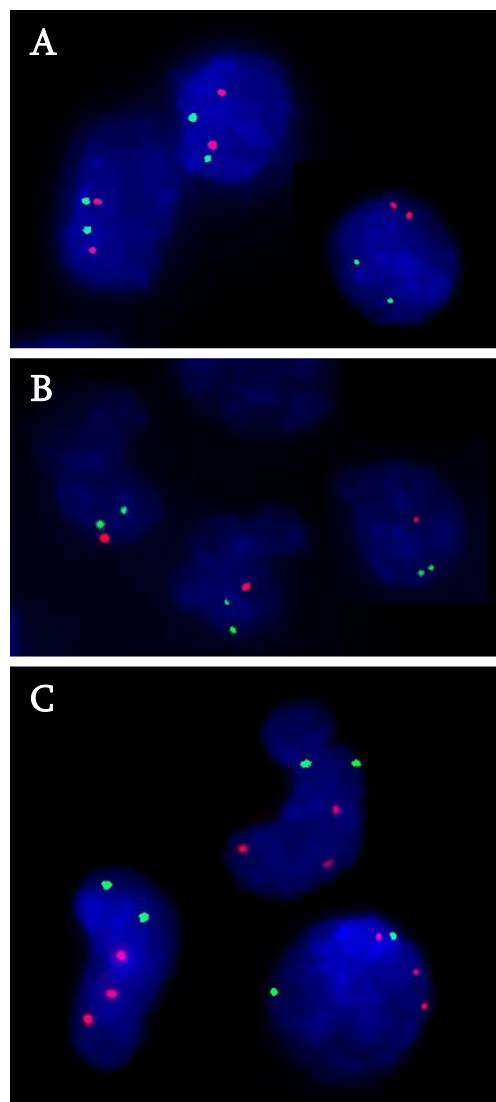


Abb. 17: FISH von Kolonien mit 5q-Syndrom und Trisomie 8 im Vergleich zu gesunden Zellen. (A) Detektion dreier Zellkerne (blau) ohne sondenspezifische chromosomale Aberrationen (je zwei grüne und 2 rote Fluoreszenzsignale). (B) Drei Zellkerne mit je zwei grünen Kontrollsignalen aber nur einem roten Signal für den langen Arm von Chromosom 5. (C) Drei Zellkerne mit jeweils zwei grünen Kontrollsignalen aber drei Signalen für Chromosom 8 (rot).

3.2.3 Gemeinsames Vorkommen von Mutationen und chromosomalen Aberrationen in Kolonien

In Abb. 18 sind diejenigen Mutationen und chromosomale Aberrationen dargestellt, die jeweils gemeinsam in einer Kolonie detektierbar waren. Von 6 Patienten wurden jeweils 10 Kolonien (ausgenommen Patient #9) analysiert. Patient #15 war routinediagnostisch positiv für Mutationen in *KIT*, *ASXL1*, *TET2*, *SRSF2* und *NPM1*. Außerdem zeigte die zytogenetische Analyse einen komplex aberranten Karyotyp mit Trisomie 8. Das verwendete Probenmaterial spiegelte den Zeitpunkt der Diagnose der SM-AML wieder. Es konnten zwei verschiedene Klone nachgewiesen werden. In 30 % (3/10) der Klone konnten spezifische Mutationen in *ASXL1*, *TET2* und *SRSF2* detektiert werden, in 70 % (7/10) der Klone noch zusätzlich die *KIT* D816V-Mutation. Die *NPM1*-Mutation sowie die Trisomie 8 wurden nicht gefunden.

Patient #10 präsentierte sich zum Zeitpunkt der SM-AML mit einer Mutation in den Genen *KIT*, *ASXL1*, *TET2* und *NRAS*. Zytogenetisch wurde eine Trisomie 8 innerhalb eines komplex aberranten Karyotyps detektiert. In 20 % (2/10) der Kolonien konnten Mutationen in *ASXL1* und *TET2* nachgewiesen werden. 80 % (8/10) der Kolonien trugen zusätzlich eine Mutation in *NRAS*. Die *KIT*-Mutation sowie die Trisomie 8 wurden nicht detektiert.

Bei Patient #3 konnte neben der *KIT* D816V die *JAK2* V617F-Mutation und ein 5q-Syndrom detektiert werden. 70 % (7/10) der Kolonien trugen allein die *JAK2*-Mutation, während 30 % (3/10) noch zusätzlich die Deletion 5q beinhalteten. Die *KIT*-Mutation wurde nicht gefunden.

Das Probenmaterial von Patient #13 stammte vom Zeitpunkt der Diagnose SM-AML. Die Routinediagnostik identifizierte Mutationen in *KIT* und *TP53*, sowie eine Deletion 5q. In 70 % (7/10) der Kolonien war nur die Deletion 5q detektierbar, in weiteren 30 % (3/10) der Kolonien zusätzlich die *TP53*-Mutation. Die Detektion von *KIT* D816V war nicht möglich.

Bei Patient #9 wurden bereits zum Zeitpunkt der SM-CMML Mutationen in *KIT* und *RUNX1*, sowie ein 5q-Syndrom nachgewiesen.

Wir fanden eine Kolonie (1/2, 50 %), die die zytogenetische Aberration trug und, unabhängig davon, eine weitere Kolonie (1/2, 50 %), die *KIT* D816V und eine Mutation in *RUNX1* aufwies.

Patient #5 trug die *KIT* D816V-Mutation und eine Trisomie 8. In 100 % (10/10) der Kolonien konnte ausschließlich die zytogenetische Aberration detektiert werden.

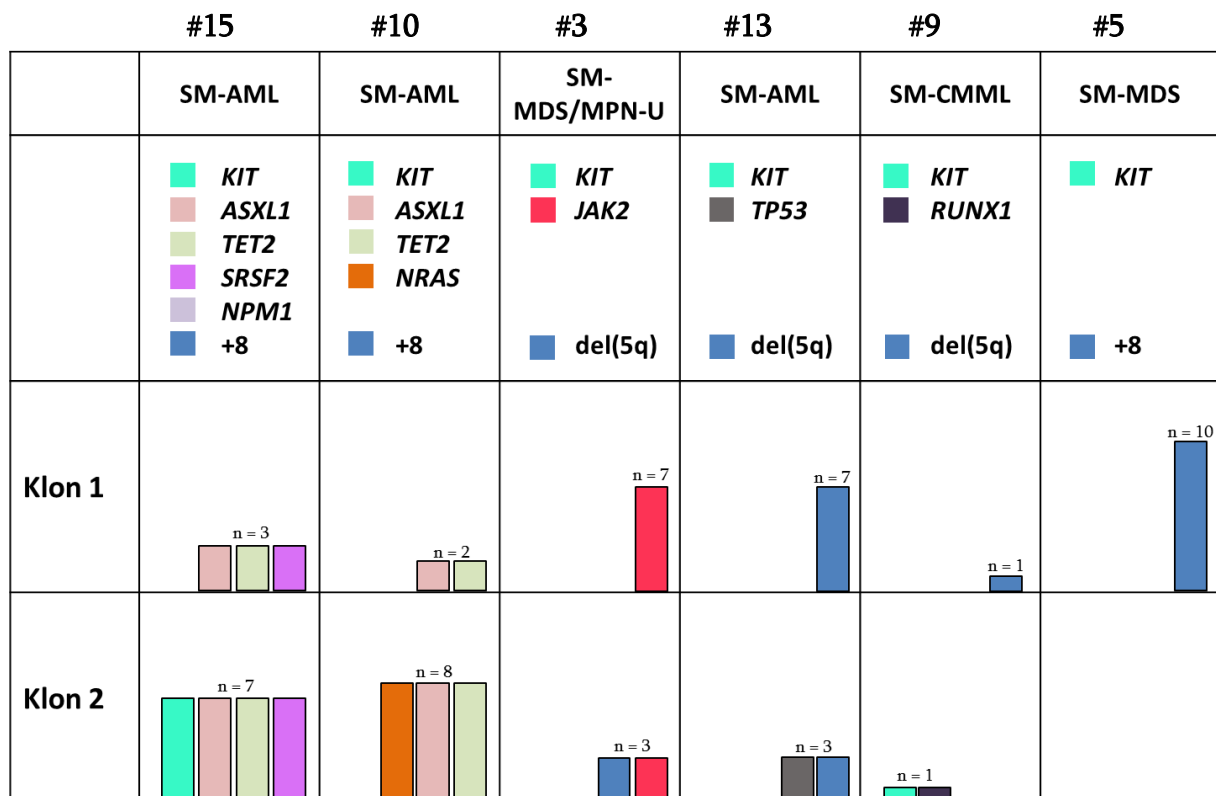


Abb. 18: Gemeinsames Vorkommen von Mutationen und chromosomalen Aberrationen in Kolonien. Dargestellt sind die Diagnosen zum Zeitpunkt der Analyse, routinemäßig detektierte molekulare und chromosomale Aberrationen und die Zusammensetzung der jeweils gefundenen Klone von n=6 Patienten. Bei den Patienten #15, #10, #3, #13 und #9 wurden je zwei verschiedene Klone gefunden. Bei Patient #5 konnte nur ein Klon detektiert werden. Bis auf Patient #9 wurden je Patient insgesamt n=10 Kolonien ausgewertet. Bei Patient #9 konnten n=2 Kolonien ausgewertet werden. Abkürzungen: SM, systemische Mastrozytose; AML, akute myeloische Leukämie; MDS, myelodysplastisches Syndrom; MPN-U, unklassifizierte myeloproliferative Neoplasie; CMML, Chronische myelomonozytäre Leukämie

3.2.4 Mutationshierarchie

Die Verteilung der Mutationen auf verschiedene Klone deckte bei Patient #15 auf, dass 30 % (3/10) der Zellen Mutationen in *ASXL1*, *TET2* und *SRSF2* trugen und 70 % (7/10) der Klone zusätzlich *KIT* D816V. 20 % (2/10) der Klone von Patient #10 trugen Mutationen in *ASXL1* und *TET2*.

Außerdem konnte bei 80 % der Kolonien (8/10) eine zusätzliche Mutation in *NRAS* nachgewiesen werden. In 70 % (7/10) der Kolonien von Patient #3 fand sich die *JAK2* V617F-Mutation und in 30 % (3/10) noch zusätzlich die Deletion 5q.

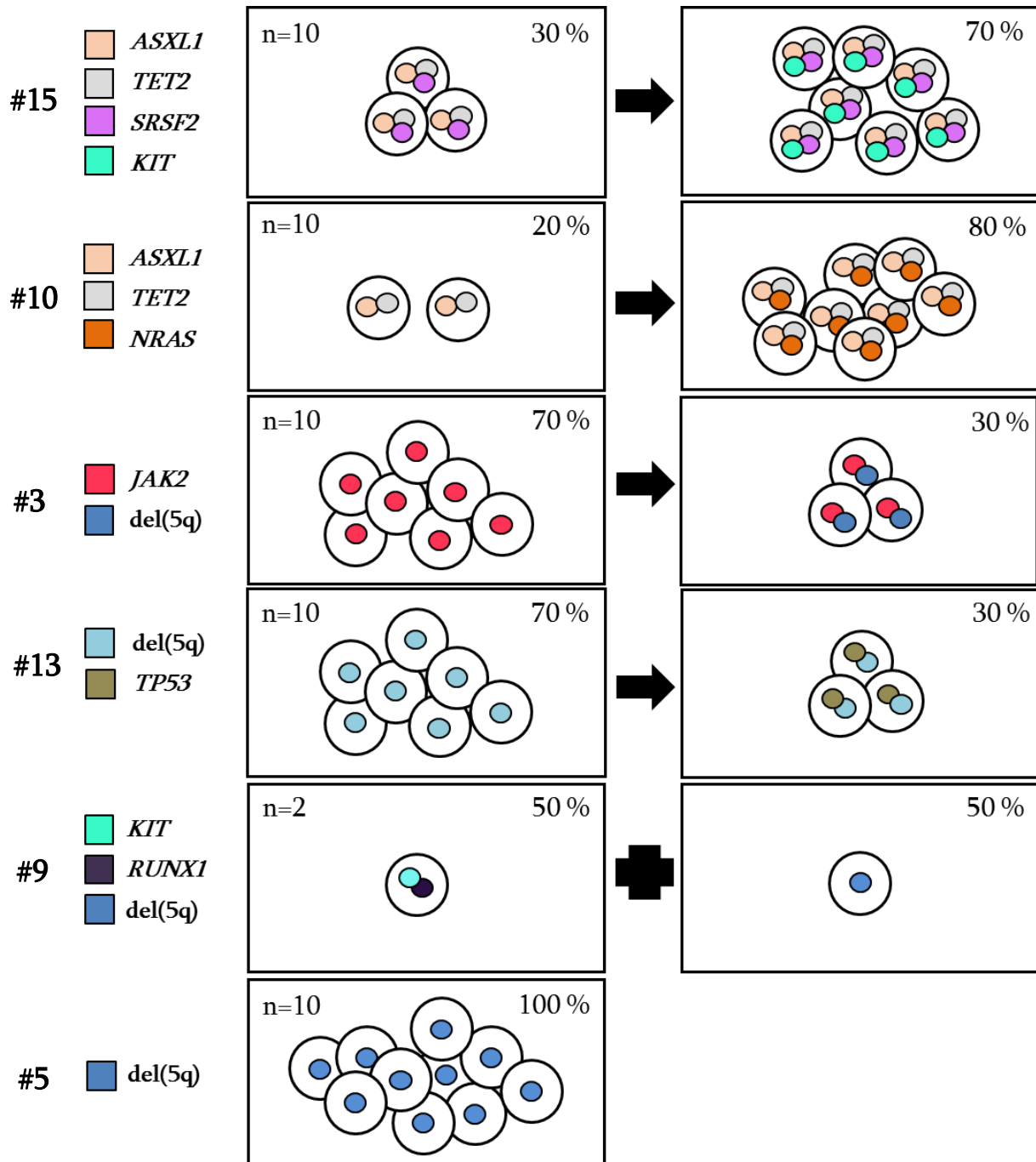


Abb. 19: Mutationshierarchie bei n=6 Patienten mit fortgeschrittener SM. Bei Patient #15, #10, #3 und #13 konnten Mutationshierarchien beobachtet werden. 30 % der Kolonien von Patient #15 trugen Mutationen in *ASXL1*, *TET2* und *SRSF2*, 70 % der Kolonien trugen zusätzlich eine Mutation in *KIT*. 20 % der Kolonien von Patient #10 trugen die Mutationen *ASXL1* und *TET2*. Eine zusätzliche *NRAS* Mutation trugen 80 % der Kolonien. Bei Patient #3 trugen 70 % der Zellen *JAK2* V617F, 30 % *JAK2* V617F und eine Deletion 5q. In 70 % der Kolonien von Patient #13 wurde allein die Deletion 5q detektiert, in den verbleibenden 30 % wurde zusätzlich *JAK2* V617F gefunden. In den Kolonien von Patient #9 wurde in einer Kolonie eine Mutation in *KIT* und *RUNX1*, und in der anderen Kolonie ein 5q-Syndrom detektiert. 100 % der Kolonien von Patient #5 trugen die Deletion 5q.

Bei Patient #9 konnte keine Mutationshierarchie, dafür jedoch zwei unabhängige Klone nachgewiesen werden. In einem Klon war *KIT* D816V und eine Mutation in *RUNX1* detektierbar, ein anderer Klon zeigte lediglich die Deletion 5q. Bei Patient #5 wurde nur ein einziger Klon gefunden. Alle 10 Kolonien trugen die Trisomie 8 (Abb.19).

4. Diskussion

Die systemische Mastozytose ist selten und aufgrund ihrer Heterogenität und Multikausalität schwer zu diagnostizieren, zu klassifizieren und zu charakterisieren. Durch das stetige „*monitoring*“ hämatologischer und molekularer Parameter bei betroffenen Patienten konnten in den vergangenen Jahren zahlreiche SM-Fälle dokumentiert werden. Dennoch liegen bisher keine genauen Zahlen zur SM-Inzidenz vor. Vor allem die genetische Komplexität von fortgeschrittenen SM-Formen erschwert die Einordnung der Patienten in klar definierte Risikogruppen. Daher konnte bisher kein standardisierter therapeutischer Algorithmus generiert werden.

Aufgrund dessen war es Ziel dieser Arbeit zytogenetische Aberrationen bei Patienten mit SM prognostisch einzuordnen, deren Einfluss auf Laborparameter und Überleben zu untersuchen und das Progressionsverhalten der Patienten mit aberrantem Karyotyp zu examinieren. Um den klonalen Ursprung von SM-AHN Patienten mit aberrantem Karyotyp zu untersuchen, sollte der Zusammenhang von Zytogenetik und Molekulargenetik bei mulimutierten Patienten erforscht werden. In diesem Kontext sollte außerdem das Vorkommen klonaler Hierarchien geprüft werden.

Mit dem Ziel, eine bessere klinische Versorgung der SM-Patienten zu gewährleisten, richtete die Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Andreas Reiter in Mannheim im Jahr 2012 ein deutschlandweites Register ein, in dessen Rahmen relevante epidemiologische Daten erhoben werden. Das „*Register für Erkrankungen der Eosinophilen und Mastzellen*“ erfasst mittlerweile über 400 Patienten. Durch die Sammlung klinischer und molekulargenetischer Daten innerhalb des Registers sowie durch die Untersuchung des Patientenmaterials sollen vor allem neue prognostische Marker identifiziert werden. Diese sollen zum einen Hinweise auf das jeweilige Krankheitsstadium, und zum anderen Zielstrukturen für Therapieansätze liefern. So könnten beispielsweise initiale Schritte der molekularen oder chromosomalen Pathogenese aufgeklärt, und der Übergang von einem indolenten (ISM) in einen aggressiven (ASM) Phänotyp charakterisiert werden.

Um die Frage zu beantworten, ob es ein zytogenetisches Muster bei SM-Patienten gibt, wurde ein Patientenkollektiv von 109 SM-Patienten mit zytogenetischen Daten aus dem Register gefiltert. Die meisten Patienten, die eine fortgeschrittene SM hatten, wiesen zusätzlich eine AHN auf. Das eine SM häufig in Assoziation mit einer AHN vorkommt, konnten bereits Travis und Kollegen vor fast 30 Jahren zeigen, indem sie unter 66 SM-Patienten über 30 % mit einer zusätzlichen hämatologischen Neoplasie identifizierten (Travis et al., 1988). Zudem konnte in den vergangenen Jahren mehrfach gezeigt werden, dass diese AHN fast ausschließlich myeloischen Ursprungs sind (Lim et al., 2009; Pardanani et al., 2009; Pardanani, 2013; Sperr et al., 2002).

Wie auch in unserer Studie wurde die CMML als die häufigste assoziierte SM-Erkrankung beschrieben, gefolgt von MDS und MDS/MPNu (Horny et al., 2004; Sotlar et al., 2002; Speer et al., 2002). Bei einem Großteil unserer Patienten mit SM-AHN wurden sowohl die SM als auch die AHN zum selben Zeitpunkt diagnostiziert. Dadurch kann ausgeschlossen werden, dass die jeweilige AHN Therapie-induziert, also sekundär ist. Zu demselben Entschluss kamen mehrere Arbeitsgruppen anhand teils großer Patientenkohorten (Horny et al., 2004; Kim et al., 2007; Travis et al., 1988; Wang et al., 2013).

Durch die Heterogenität der SM-Erkrankung kann diese bisher keinem definierten morphologischen Phänotyp zugeordnet werden. Einzig der Nachweis der Mutation D816V im *KIT*-Gen liegt bei über 80 % aller SM-Patienten, unabhängig vom Vorliegen einer AHN, vor (Kristensen et al., 2011; Orfao et al., 2007). Auch in der vorliegenden Studie konnte in 94 % der Patienten die *KIT* D816V-Mutation, und in 2 % der Patienten funktionell gleichbedeutende Mutationen an Stelle D816 im *KIT*-Gen nachgewiesen werden. Die konstitutive Aktivierung von TKs ist ein gut bekanntes pathogenetisches Kennzeichen innerhalb der verschiedensten hämatologischen Entitäten. TKs die beispielsweise durch die Bildung von Fusionsgenen mit *PDGFRB* (Naumann et al., 2015), oder *PDGFRA* (Cools et al., 2003) konstitutiv aktiviert werden zeigen oftmals ein sehr gutes Ansprechen auf Tyrosinkinaseinhibitoren (TKI) (Metzgeroth et al., 2013).

Auch etliche Punktmutationen, Deletionen oder Insertionen im *KIT*-Gen, die eine erhöhte TK-Aktivität zur Folge haben, können mit TKIs behandelt werden (Heinrich et al., 2003). Warum speziell die *KIT* D816V-Mutation schlechter auf TKIs anspricht, konnte bis heute nicht zweifelsfrei geklärt werden. Eine Arbeitsgruppe aus New York konnte zeigen, dass der TKI STI571 zwar die Proliferation des *KIT*-Wildtyp Codons 816 supprimiert, aber das Wachstum von Zellen, die eine Mutation in diesem Codon tragen, nicht vermindert (Akin et al., 2003). Beobachtungen von Vendome et al. deuten darauf hin, dass die D816V-Mutation (durch ihre Lokalisation in der TK Domäne des Proteins) das Konformationsgleichgewicht der *KIT*-Kinase-Domäne in Richtung des aktiven Zustands verschiebt, und dadurch die Bindung von TKIs an ATP-bindende Domänen (an die die meisten TKIs andocken) erschwert (Vendome et al., 2005). Außerdem wäre es möglich, dass die molekulare Pathogenese der SM dermaßen komplex ist, dass neben der *KIT*-Mutation auch noch andere molekulare Veränderungen Einfluss auf den klinischen Phänotyp sowie auf das Ansprechen auf TKIs haben. Beispielsweise könnten auch andere Mutationen als Resistenzauslöser, aber auch als mögliche therapeutische Targets in Frage kommen.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnten bei einer Vielzahl der 83 Patienten mit fortgeschrittener SM neben *KIT* D816V zusätzliche Mutationen detektiert werden. Unter anderem waren dies Mutationen in Genen, die für Proteine codieren, die eine Schlüsselrolle bei der DNA-Methylierung (TET2, DNMT3a) und beim Splicen der mRNA (SRSF2, SF3B1) einnehmen oder als Transkriptionsfaktor dienen (ASXL1, RUNX1). Alle im Rahmen dieser Studie detektierten Mutationen konnten bereits in einer Vielzahl myeloischer Neoplasien (Kohlmann et al., 2010; Meggendorfer et al., 2012; Tefferi, 2010; Yoshida et al., 2011), als auch speziell bei der SM (Jawhar et al., 2015; Schwaab et al., 2013) identifiziert werden. Entsprechend der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wurde häufig nicht nur eine zusätzliche Mutation, sondern mehrere zusätzliche Mutationen pro Patient detektiert (Jawhar et al., 2015, 2016b; Pardanani et al., 2016; Schwaab et al., 2013).

Fast alle diese Mutationen wurden bei Patienten mit SM-AHN detektiert. Die Vermutung liegt nahe, dass alle SM-Patienten, die neben einer Mutation im *KIT*-Gen noch eine weitere molekulare Veränderung haben, eine AHN aufweisen.

Das es dennoch Patienten gibt, die Zusatzmutationen haben, und mit SM, ASM oder MCL diagnostiziert wurden, könnte den folgenden Schluss nahelegen: Die Diagnose der SM bzw. SM-AHN stützt sich auf histologische und zytomorphologische Diagnostik. Je nach Ausprägung der SM bzw. der AHN, können die Infiltrationsgrade im KM so stark variieren, dass möglicherweise eine der Erkrankungen komplett maskiert sein kann (Zhrebker et al., 2014). So wäre es beispielsweise möglich, dass eine SM mit 80 % Mastzellinfiltration nur als SM erkannt wird, und die koexistente AHN nicht sichtbar ist. Im Gegensatz zu Studien bezüglich molekularer Aberrationen, wurden größere zytogenetische Studien bei Patienten mit SM bisher nicht durchgeführt. Deshalb gibt es in der Literatur nur wenige Arbeiten, die zytogenetische Veränderungen bei SM zumindest als Randerscheinung beschreiben. 15 % unserer Patienten wiesen einen aberranten Karyotyp auf. Die Inzidenz zytogenetischer Veränderungen bei SM reicht bisher von ca. 13 % (Wang et al., 2013), über 20 % (Lim et al., 2009) bis hin zu 36 % (Travis et al., 1988). Dabei ist interessant, dass fast alle dieser Patienten, genau wie in unserer Patientenkohorte, eine SM-AHN hatten. Lim et al. detektieren einen aberranten Karyotyp unter 37 Patienten signifikant häufiger bei Patienten mit SM-AHN, im Vergleich zu Patienten mit ASM und ISM. In retrospektiven Studien konnten Travis et al. und Wang et al. aberrante Karyotypen ausschließlich bei Patienten mit SM-AHN identifizieren. Grund dafür könnte die sehr geringe Anzahl an Mastzellen sein, die im Knochenmarkspirat enthalten ist. Geht man davon aus, dass zytogenetische Aberrationen Teil der SM sind, würden die zur Teilung fähigen Mastzellen in der Zellkultur fehlen, die für die konventionelle Zytogenetik benötigt werden. Im Gegensatz zu dieser methodischen Einschränkung wäre es möglich, dass zytogenetische Veränderungen bei SM nicht vorkommen und eher der AHN zugeordnet werden müssen. Letztere Hypothese wird durch den Umstand gestützt, dass weder bei der SM allein, noch bei der SM-AHN, spezifische chromosomale Veränderungen auftreten.

Man kann beobachten, dass die jeweiligen Aberrationen mit der zugrundeliegenden AHN assoziiert sind. Beispielsweise ist die, auch in dieser Arbeit verhältnismäßig häufig vorkommende Deletion 5q eng mit dem MDS assoziiert (Swerdlow et al., 2008). Dies könnte erklären, warum wir die del(5q) hauptsächlich bei Patienten mit SM-MDS fanden. Um eine prognostische Relevanz verschiedener aberranter Karyotypen auch in Verbindung mit der SM zu untersuchen, teilten wir diese in Risikogruppen ein, die denen der jeweiligen AHN entsprachen. Allgemein zählt ein normaler Karyotyp als prognostisch günstig, und ein komplex aberranter Karyotyp (≥ 3 Veränderungen) als prognostisch ungünstig (Knapp et al., 1985; Schanz et al., 2011). In Verbindung mit dem MDS ist die Deletion 5q, sowie die Trisomie 8 als prognostisch günstig einzustufen (Haase et al., 2007; Solé et al., 2005; Toyama et al., 1993), eine Monosomie 7 hingegen als prognostisch ungünstig (Greenberg et al., 1997). Bei der CMML zählen chromosomale Veränderungen wie der Verlust des Y-Chromosoms und die Deletion 3q als guter, Monosomien hingegen als schlechter prognostischer Faktor (Such et al., 2011; Wassie et al., 2014). Anders als beim MDS ist die Deletion 5q im Rahmen einer AML als prognostisch ungünstig zu werten (Haferlach et al., 2004).

Neben molekularen und zytogenetischen Risikofaktoren konnten bisher auch eine Reihe laborchemischer und klinischer Marker identifiziert werden, die einen aggressiven Verlauf der SM bzw. SM-AHN anzeigen. Schon recht lange ist bekannt, dass neben dem Subtyp der SM vor allem eine Anämie eine erhöhte Serumtryptase, und das Ausmaß der Mastzellinfiltration im Knochenmark ausschlaggebende Parameter sind, die Einfluss auf das Gesamtüberleben der SM-Patienten haben (Horan et al., 1991; Lawrence et al., 1991; Lim et al., 2009; Pardanani et al., 2002). Heute weiß man, dass Zytopenien, Leukozytose, Eosinophilie, eine erhöhte alkalische Phosphatase und Organomegalien ebenfalls wesentliche Prognoseparameter darstellen (Jawhar et al., 2016a,b, 2017; Pardanani, 2016; Wang et al., 2013). In den genannten Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die meisten dieser Marker hauptsächlich bei Patienten mit aggressiver SM (ASM, MCL) und bei Patienten mit SM-AHN außerhalb des Normbereiches liegen.

Im Rahmen der Arbeit sollte untersucht werden, ob signifikante Unterschiede auch zwischen SM-Patienten mit normalen und aberranten Karyotyp, unabhängig vom SM-Subtyp, vorliegen. Dies konnte nicht gezeigt werden und deutet darauf hin, dass der Karyotyp keinen direkten Einfluss auf Laborparameter der Patienten hat.

Eine erhöhte Serumtryptase kann bei SM-Patienten aller SM-WHO-Subgruppen detektiert werden, ist jedoch bei Patienten mit ASM und SM-AHN signifikant höher (>200 ng/ml) (Lim et al., 2009; Pardanani 2016). Erhöhte Serumtryptasespiegel konnten bereits bei Patienten mit CML, AML oder MDS gemessen werden, was zumindest den SM-spezifischen diagnostischen Nutzen einschränkt, sollte eine AHN vorliegen (Sperr et al., 2009).

In Anbetracht der Tatsache, dass die meisten Arbeitsgruppen weder *B-* noch *C-findings* bei Patienten mit ISM finden konnten, ist es durchaus möglich, dass die hämatologische Abnormität lediglich den Typ der zugrundeliegenden AHN widerspiegelt (Wang et al., 2013). Kürzlich konnte unsere Arbeitsgruppe zeigen, dass eine vergrößerte Milz und eine erhöhte alkalische Phosphatase einen statistisch signifikanten prognostischen Marker bei SM-Patienten darstellen (Jawhar et al., 2016a). Auch innerhalb dieser Parameter konnte in der vorliegenden Arbeit kein Unterschied zwischen Patienten mit normalem und aberrantem Karyotyp festgestellt werden.

Unter den 83 Patienten mit fortgeschrittener SM in dieser Studie, detektierten wir im Durchschnitt eine *KIT* D816V Allellast von 20 % im peripheren Blut. Dies war ebenfalls bei Patienten mit aberranten und normalem Karyotyp gleich. Bisher weiß man, dass diese Allellast bei Patienten mit SM mit der Krankheitsaktivität (z.B. Höhe der Serumtryptase), dem SM-Subtyp (ISM vs. ASM) und auch dem Gesamtüberleben, korreliert (Hoermann et al., 2014; Kristensen et al., 2012). Für den quantitativen Nachweis der Mutation nutzten wir ein von unserer Arbeitsgruppe etabliertes Assay auf mRNA-Ebene, mit dem noch 0,1 % *KIT* D816V-Mutationslast nachzuweisen ist (Erben et al., 2014).

Da sich Mastzellen unter physiologischen Bedingungen nur minimal im peripheren Blut befinden, deutet eine messbare *KIT* D816V-Allellast auf eine multilineare Beteiligung hin.

Verschiedene Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass im Blut zirkulierende Monozyten und Lymphozyten ebenso die D816V-Mutation tragen können, wenn eine fortgeschrittene SM Erkrankung vorliegt. Bei indolenten Verlaufsformen war die Mutationen für gewöhnlich nicht im PB, sondern nur im KM nachweisbar (Erben et al., 2014; Kristensen et al., 2012, 2014). Darüber hinaus ist der Nachweis der *KIT* D816V-Mutation außerhalb der Mastzellreihe mit einer höheren Progressionsrate und einem schlechteren Überleben assoziiert (Teodosio et al., 2012).

Schon vor über 20 Jahren wurde beobachtet, dass aberrante Karyotypen bei SM-AHN mit leukämischer Transformation und schlechter Prognose assoziiert sind (Travis et al., 1988). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde der Krankheitsverlauf von 16 Patienten mit aberrantem Karyotyp untersucht. Genau die Hälfte der Patienten erlitt einen Progress. Im Allgemeinen liegt die Wahrscheinlichkeit der Progression einer ASM in eine noch aggressivere Form bei ca. 5 %, bei einer SM-AHN schon bei 13 % (Valent et al., 2014). Außerdem scheint die Häufigkeit einer Progression vom Typ der AHN abhängig zu sein. Patienten mit SM-MDS sind in der Literatur mit der höchsten Progressionsrate assoziiert. Progressionen einer SM-CMML oder SM-MPN werden weniger häufig beschrieben (Lim et al., 2009; Pardanani et al., 2009, Pardanani, 2016). In der vorliegenden Arbeit transformierten ebenso viele SM-MDS Patienten wie SM-CMML Patienten, was wahrscheinlich auf die geringe Anzahl an Patienten zurück zu führen ist. Die ASM und die MCL sind zwar selten, gelten aber als Erkrankungen mit schnell progredienten klinischen Verläufen (Georgin-Lavialle et al., 2013; Valent et al., 2014). Pieri und Kollegen berichteten von einer durchschnittlichen Transformationsfrequenz von 32 % einer ASM in eine MCL innerhalb von zwei Jahren (Pieri et al., 2016). Die Arbeitsgruppe der Mayo Klinik um Dr. Lim zählte unter 21 Patienten mit leukämischer Transformation 90 % SM-AHN Fälle. Achtzehn transformieren in eine AML, drei in eine MCL (Lim et al., 2009). Ähnliche Beobachtungen machte Dr. Pardanani mit seiner Arbeitsgruppe und fand unter 159 ISM-Patienten eine Progressionsrate von unter 1 %, wohin gegen unter 138 Patienten mit SM-AHN 13 % transformierten.

29 % dieser Patienten hatten eine SM-MDS, 11 % eine SM-MPN und 6 % eine SM-CMML. Außerdem transformierten 5 % der Patienten mit ASM in eine AML (Pardanani et al., 2009). Demnach scheint eine Transformation in eine AML signifikant häufiger zu sein, als die Transformation in eine MCL. Auch dieses Ergebnis konnte durch die vorliegende Arbeit bestätigt werden. Zusätzlich konnten wir zeigen, dass der Progress von SM-MDS, SM-CMML und SM-MPN in eine SM-AML oder MCL mit einem schlechten Outcome assoziiert ist. Alle Patienten entwickelten zum Zeitpunkt des Progresses einen aberranten Karyotyp oder durchliefen eine Karyotypevolution, bei unverändertem Mutationsstatus. Eine Ausnahme bildeten die Patienten #13 und #15, die mit dem Progress typische AML-assoziierte Mutationen erworben. Ein aberranter Karyotyp kann somit einen vom Mutationsstatus unabhängigen prognostischen Marker darstellen. Lundberg et al. beschrieben kürzlich, dass sich die Genetik einer *de novo* AML von der einer sekundären AML, die beispielsweise aus einer Philadelphia-negativen MPN hervorgeht, unterscheidet. Die Arbeitsgruppe führte diese Annahme auf Mutationen in Genen wie *TET2*, *ASXL1* und *SRSF2* zurück, die bereits während des Bestehens der MPN detektierbar sind (Lundberg et al., 2014).

Innerhalb der letzten Jahre konnten bei der SM ausschließlich molekulare Veränderungen prognostisch eingeordnet werden. Dabei war unsere Arbeitsgruppe eine der ersten, die Mutationen zB. in den Genen *TET2*, *SRSF2*, *ASXL1*, *RUNX1*, *JAK2*, *CBL*, *SF3B1*, *IDH2* auch bei SM-Patienten detektierten (Schwaab et al., 2013). Wir fanden heraus, dass bei ca. 60 - 70 % der Patienten mit fortgeschrittener SM mindestens eine weitere Zusatzmutation neben einer Mutation im *KIT*-Gen exprimiert wurde. Einige dieser Mutationen konnte man mit einer niedrigeren Allellast auch bei älteren gesunden Menschen nachweisen (Busque et al., 2012). Aufgrund der Tatsache, dass Patienten mit fortgeschrittener SM häufig drei oder mehr solcher Mutationen tragen, kann man dennoch von einem pathogenetischen Effekt der Mutationen ausgehen.

Wie auch in der vorliegenden Arbeit beobachtet, schienen Punkt- oder Längenmutationen in *TET2* mit Abstand die häufigsten Mutationen bei SM-Patienten zu sein (Bibi et al., 2014; Jawhar et al., 2015; Rouet et al., 2015; Soucie et al., 2012; Schwaab et al., 2013; Tefferi et al., 2009). Wie bereits bei der CMML sowie der AML beschrieben, findet man Mutationen in *TET2* auch bei SM-Patienten über das gesamte Gen verteilt (Abdel-Wahab et al., 2009). Obwohl gezeigt werden konnte, dass diese Veränderungen die Onkogenität von klonalen Mastzellen in Verbindung mit *KIT* D816V erhöht, konnte bisher kein direkter Einfluss auf das Gesamtüberleben der SM-Patienten beobachtet werden (Pardanani, 2013; Soucie et al., 2012).

Im Gegensatz zu Mutationen in *TET2*, konnten Mutationen in *ASXL1*, *SRSF2* und *RUNX1* bei SM als prognostisch ungünstig eingestuft werden (Damaj et al., 2014; Hanssens et al., 2014; Jawhar et al., 2016). Kürzlich gelang es unserer Arbeitsgruppe, speziell diese Mutationen (S/A/R Genpanel) als eine Hochrisiko-Gruppe von SM-Patienten zu identifizieren (Jawhar et al., 2016b). Analog dazu sind diese Mutationen in MDS, CMML, AML und der MF ebenfalls mit einer schlechten Prognose assoziiert (Alvarez and Dasanu, 2017; Haferlach et al., 2014; Itzykson et al., 2013; Lin et al., 2016; Thol et al., 2012; Tsai et al., 2015; Vannucchi et al., 2013). Beispielsweise fand man Mutationen in *SRSF2* und *ASXL1* signifikant häufiger bei Hochrisiko-MF Patienten als bei Niedrigrisiko-MF Patienten. Patienten mit den besagten Mutationen waren mit einem schlechteren *Outcome* assoziiert (Vannucchi et al., 2013). *RUNX1*-Mutationen wurden bis dahin weder bei der MF, der CMML noch bei der SM eingehend untersucht, sind aber bei der AML und beim MDS mit einer ungünstigen Prognose assoziiert (Gaidzik et al., 2011; Schnittger et al., 2011).

Aufgrund dieser Beobachtungen wurde das S/A/R Genpanel in die Analysen zur Auswertung des Gesamtüberlebens der SM-Patienten mit normalem und aberrantem Karyotyp einbezogen. Wir konnten zeigen, dass Patienten, deren aberranten Karyotyp wir als prognostisch günstig eingestuft hatten, einen besseren Verlauf hatten als Patienten die wir als prognostisch ungünstig eingestuft hatten. Demnach hat sich die Einteilung der Karyotypen nach dem Risikoscore der zugrundeliegenden AHN als konsistent gezeigt.

Da Patienten mit einem prognostisch ungünstigen Karyotyp, unabhängig davon, ob sie Mutationen des S/A/R Genpanels besitzen, ein schlechteres *Outcome* zeigen als Patienten mit Mutationen in S/A/R aber einem prognostisch günstigen Karyotyp, konnten wir zudem zeigen, dass ein Karyotyp mit hohem Risiko als ein prognostischer Marker gesehen werden kann, der mit einem schlechten Überleben der SM-Patienten assoziiert ist. Vergleichende Studien zur Risikostratifizierung einer aberranten Zytogenetik bei der SM sind bisher in der Literatur nicht beschrieben.

Eine weitere Fragestellung dieser Dissertation beschäftigte sich mit der klonalen Ordnung von molekularen und zytogenetischen Aberrationen bei Patienten mit SM. Da neben reinen SM-Erkrankungen wie ISM, ASM oder MCL auch nahezu alle Patienten mit SM-AHN die *KIT* D816V-Mutation trugen, stellte sich die Frage nach einer klonalen Assoziation der SM- und AHN-Komponente. Mit *KIT* D816V als Klonalitätsmarker konnten bereits verschiedene Arbeitsgruppen zeigen, dass SM und myeloische AHN ihren Ursprung in einer gemeinsamen Progenitorzelle haben (Fritsche-Polanz et al., 2010; Sotlar et al., 2008, 2010; Wang et al., 2013). Im Gegensatz dazu konnte häufig keine klonale Beziehung zwischen der SM und einer lymphatischen AHN beobachtet werden (Sotlar et al., 2010; Wang et al., 2013).

Schon in den 90er Jahren wurden Klonalitätsanalysen bei Patienten mit SM-AHN durchgeführt, die jedoch zu unterschiedlichen Ergebnissen führten. Nagata und Kollegen fanden die *KIT* D816V-Mutation sowohl in Mastzellen, als auch in Zellen der CMML, während Sperr et al. diese nur in Mastzellen und nicht in den leukämischen Blasten einer assoziierten AML detektieren konnte (Nagata et al., 1995; Sperr et al., 1998). Später konnte eine Arbeitsgruppe aus Spanien die *KIT* D816V-Mutation bei Patienten mit SM-AHN neben Mastzellen auch in eosinophilen Granulozyten, Monozyten und bei zwei Patienten auch in Lymphozyten detektieren (Garcia-Montero et al., 2006). Man fand heraus, dass Patienten, bei denen *KIT* D816V in einer frühen Vorläuferzelle mutiert war, oftmals einen aggressiven Phänotyp zeigten. Aufbauend darauf untersuchte die Arbeitsgruppe um Prof. Sotlar den klonalen Zusammenhang zwischen fünf Patienten mit SM-PMF.

Bei allen fünf Patienten fand man die *JAK2* V617F-Mutation sowohl in Mastzellen, als auch in CD15-positiven myeloischen Zellen. Hingegen konnte die *KIT* D816V-Mutation zwar bei allen fünf Patienten in den Mastzellen, aber nur bei zwei Patienten in den Zellen der PMF detektiert werden (Sotlar et al., 2008). Diese Ergebnisse decken sich mit Beobachtungen der vorliegenden Arbeit, in der in GFU-GM von Patient #3, die *JAK2* V617F-Mutation nicht zusammen in einem Klon mit der *KIT* D816V-Mutation nachweisbar war. Dies lässt vermuten, dass SM und AHN zumindest nicht aus einer einheitlichen neoplastischen *KIT* D816V-tragenden Vorläuferzelle entstehen. Es ist anzunehmen, dass die Pathogenese der SM-AHN durch eine sequentielle *multiple-Hit*-Abfolge gekennzeichnet ist. Demnach würde die SM bzw. die AHN durch verschiedene genetische Veränderungen im Verlauf des Krankheitsprozesses jeweils nacheinander entstehen.

Um diese Frage zu beantworten und einen tieferen Einblick in die klonale Evolution der myeloischen Vorläuferzellen zu bekommen, untersuchte unsere Arbeitsgruppe die klonale Struktur einer Gruppe von 12 multimutierten SM-AHN Patienten anhand von GFU-GM und mikrodisszierten CD15-positiven myeloischen Zellen (Jawhar et al., 2015). Es gelang uns, die klonale Hierarchie der zugrundeliegenden Mutationen mit beiden Methoden äquivalent zu rekonstruieren. Wir detektieren innerhalb eines Patienten sowohl GFU-GM als auch CD15-positive Zellen, die entweder für *KIT* D816V und Zusatzmutationen positiv waren, oder nur für die Zusatzmutationen. Es ist anzunehmen, dass Mutationen in *TET2*, *SRSF2* und *ASXL1* sehr früh erworben werden, während die *KIT* D816V-Mutation ein späteres Ereignis darstellt. Diese Entdeckung konnte auch in der vorliegenden Arbeit bei Patient #15 bestätigt werden.

Eine mögliche Erklärung wäre, dass die SM-AHN bei Patienten, bei denen wir ausschließlich die Zusatzmutationen detektieren konnten, biklonal entwickelt ist. In diesem Fall würde man die *KIT* D816V-Mutation ausschließlich in Mastzellen finden und die Zusatzmutationen wären nur in CFU-GM nachweisbar, denn diese sind verhältnismäßig späte Progenitoren, sodass es möglich wäre, dass die Mastzelllinie einem früheren Zelltyp entspringt (Agis et al., 1996).

Eine wahrscheinlichere Erklärung böte die *multiple-Hit* Theorie. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnten klonale Hierarchien bei den Patienten #15, #10, #3 und #13 erstellt werden. Neben der bereits beschriebenen klonalen Evolution bei Patient #15, konnte die erst zum Zeitpunkt der AML detektierte *NPM1*-Mutation nicht in den CFU-GM detektiert werden. Es ist sehr wahrscheinlich, dass auch diese Mutation einen weiteren „Hit“ während der Progression der CMML (die bereits die Mutationen in *KIT*, *ASXL1*, *TET2* und *SRSF2* trug) in die AML darstellte, und zum Zeitpunkt der Analyse in noch zu wenigen Zellen manifestiert war. Stimmt diese Hypothese, müsste man die Anzahl der untersuchten Kolonien erweitern, um einen Klon zu finden, der alle Mutationen exprimiert.

Ein ähnliches Phänomen wäre ebenso bei Patient #10 denkbar, bei dem neben der *KIT*-Mutation auch der Nachweis der *NRAS*-Mutation in den einzelnen GFU-GM fehlte. Bei beiden Patienten blieb der Nachweis der jeweils zu Grunde liegenden zytogenetischen Veränderung aus. Grund dafür könnte der komplex aberrante Karyotyp sein, der genetisch so instabil ist, dass Zellen, die diesen Karyotyp aufwiesen, die 14-tägige, methoden-abhängige Kultivierungszeit nicht überleben.

Bei den Patienten #3 und #13 konnten die Mutationen in *JAK2* bzw. *TP53* gemeinsam mit der zytogenetischen Aberration [del(5q)] in einer Kolonie detektiert werden. Bei beiden Patienten entwickelte sich das 5q-Syndrom hierarchisch später als die zu Grunde liegende molekulare Veränderung. Diese Beobachtung könnte dadurch erklärt werden, dass die del(5q) nur in drei (#3) und einer (#13) von 25 analysierten Metaphasen bei der konventionellen Zytogenetik detektiert werden konnte. Der Nachweis der *KIT*-Mutation blieb bei beiden Patienten aus. Bei zwei weiteren Patienten (#9 und #5) wurde die zytogenetische Aberration ebenfalls nie gemeinsam mit der *KIT*-Mutation im selben Klon detektiert. Der Grund für das nicht-detektieren der *KIT*-Mutation gemeinsam mit der zytogenetischen Aberration bei den vier Patienten #3, #5, #9 und #13 könnte zum einen die *KIT*-Allellast sein, die bei allen vier Patienten unter 5 % lag.

Deshalb müssten bei einer *KIT*-Allellast von 1-5 % statistisch betrachtet 100 Kolonien untersucht werden, um nur 1-5 Kolonien zu finden, bei denen alle molekularen und zytogenetischen Veränderungen in einem Klon zu detektieren sind.

Zusammenfassend wurde in der vorliegenden Arbeit unter den sechs analysierten Patienten kein einziger gefunden, der *KIT* D816V und zytogenetische Veränderungen in der selben Zelle exprimiert. Neben den bereits aufgeführten Hypothesen könnte es auch möglich sein, dass es bei Patienten mit SM-AHN und aberrantem Karyotyp eine biklonale Entwicklung eines SM-AHN Klons, und eines alleinstehenden AHN Klons gibt. In der Literatur gibt es nur wenige Studien mit einzelnen Fallberichten, die die klonale Architektur von SM-AHN Patienten mit chromosomalen Aberrationen untersuchten (Nagai et al., 2007; Pullarkat et al., 2007; Cornet et al., 2012; Bae et al., 2013; Pullarkat et al., 2013; Wang et al., 2013; Frederiksen et al., 2016). Bei insgesamt 13/14 der Patienten konnte die letztere Hypothese widerlegt werden, denn molekularen und zytogenetischen Veränderungen konnte derselbe myeloische Ursprung nachgewiesen werden. Die Arbeitsgruppe um Dr. Pullarkat konnte bei insgesamt sechs Patienten mit SM-AML die Translokation t(8;21) sowohl in Myeloblasten, als auch in Mastzellen detektieren (Pullarkat et al., 2007, 2013). Wang et al. demonstrierten eine klonale Beziehung zwischen Mastzellen und myeloischen Zellen bei zwei Patienten mit SM-CMML und einem Patienten mit SM-MDS. Der klonale Nachweis bei einem Patienten mit SM-CLL blieb jedoch aus, denn die bei diesem Patienten im Vorfeld detektierte Deletion del(11q) wurde nur in den CLL Zellen, jedoch nicht in den Mastzellen gefunden (Wang et al., 2013). Die Arbeitsgruppe vermutete, dass bei Patienten mit SM-MDS und SM-CMML sowohl die Mastzellen als auch die myeloischen Zellen von einer *KIT*-mutierten und chromosomal veränderten Stammzelle hervorgehen. Diese Stammzelle könnte eine gewisse Art von Plastizität besitzen, die es ihr ermöglicht, in Reaktion auf verschiedene Stimuli aus der Umwelt zu Mastzellen zu differenzieren. Frederiksen et al. berichten von einem Patienten mit MCL-AML, dessen Mastzellen dieselben zytogenetischen Aberrationen (Deletionen 5q, 7p, 7q, 17q und 21q) tragen wie die leukämischen myeloischen Blasten der AML.

Die genannten Studien verwendeten zum Nachweis der zytogenetischen Aberrationen Laser-Mikrodissektion in Kombination mit *FISH*, oder einen Gesamtgenom-basierten Einzelnukleotid-Polymorphismus-Assay.

Das in der vorliegenden Studie verwendete CFU-GM Assay erlaubt zwar theoretisch die Analyse der klonalen Architektur auf Einzelzellebene, wurde aber bisher von keiner weiteren Arbeitsgruppe für die Detektion von zytogenetischen Aberrationen verwendet, und kann damit in seiner Funktionalität nur eingeschränkt in das diagnostische Gesamtbild eingeordnet werden. Schlussfolgernd kann man sagen, dass die Krankheitsevolution von Patienten mit fortgeschrittener SM durch Mutationen am Codon D816 im *KIT*-Gen, Zusatzmutationen (vor allem in S/A/R) und einem aberranten Karyotyp ausgelöst wird.

Durch die vorliegende Arbeit konnten erstmals Erkenntnisse über die Frequenz und den prognostischen Einfluss chromosomaler Aberrationen bei SM-Patienten gewonnen werden. Die Entschlüsselung der klonalen Architektur bei Patienten mit SM-AHN und assoziiertem aberrantem Karyotyp stellt jedoch weiterhin eine Herausforderung dar und erfordert aufgrund der bisher niedrigen Patientenzahl weitere Untersuchungen an größeren Patientenkollektiven. Somit konnten die zu Beginn der Arbeit aufgestellten Ziele und Fragestellungen größtenteils geklärt werden.

5. Zusammenfassung

Seit der *World Health Organization* Klassifikation von 2016 ist die systemische Mastozytose als eigenständige Entität der myeloischen Neoplasien eingeordnet. Grund dafür ist das in den letzten Jahren gewachsene Verständnis für pathogenetische und molekulare Prozesse, die mit aggressiven Krankheitsverläufen assoziiert sind und damit prognostische Relevanz besitzen. Erst kürzlich gelang unserer Arbeitsgruppe die Identifizierung einer Hochrisikogruppe von Patienten mit systemischer Mastozytose. Patienten, die dieser Gruppe angehören, weisen Mutationen in entweder ein oder mehreren der Gene *SRSF2*, *ASXL1* und *RUNX1* auf und sind mit einem schlechten *Outcome* assoziiert. Bisher veröffentlichte Arbeiten über Risikofaktoren und Progressionsverhalten bei der systemischen Mastozytose widmeten sich vor allem morphologischen Untersuchungen des Knochenmarks, laborchemischen Parametern, dem klinischen Verlauf des Patienten und molekulargenetischen Veränderungen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Stellenwert der Zytogenetik bei Patienten mit systemischer Mastozytose zu untersuchen und damit gegebenenfalls einen weiteren wichtigen Prognoseparameter zu identifizieren. Außerdem sollten Analysen zur klonalen Entwicklung der Zusatzmutationen und chromosomalen Veränderungen Einblick in die Entstehung der Erkrankung, speziell bei Patienten mit systemischer Mastozytose und assoziierter hämatologischer Neoplasie und deren Phänotyp, liefern.

In der vorliegenden Arbeit konnte an 109 Patienten gezeigt werden, dass ca. 18 % der Patienten mit einer fortgeschrittenen systemischen Mastozytose einen aberranten Karyotyp entwickelten (n=16). 50 % dieser Patienten erlitten im Verlauf der Erkrankung einen Progress in eine akute myeloische Leukämie oder eine Mastzelleukämie, der fast immer (7/8; 88 %) mit einem komplex aberranten Karyotyp einherging und mit einem schlechtem *Outcome* assoziiert war. Zudem konnte gezeigt werden, dass die Einteilung der individuellen chromosomalen Aberrationen in Risikogruppen (prognostisch günstig/ungünstig) analog der zugrundeliegenden assoziierten hämatologischen Neoplasie Rückschlüsse auf das progressionsfreie Überleben der Patienten zulässt.

Patienten mit einem der nicht-Mastzellerkrankung zugrundeliegenden aberranten Karyotyp mit guter Prognose lebten länger als Patienten mit einem prognostisch ungünstigen Karyotyp. Mutationen in *SRSF2*, *ASXL1* und *RUNX1* fand man sowohl vor als auch nach Progress, so dass die geringe Überlebensdauer nach Progress mit dem komplex aberranten Karyotyp korreliert. Ein prognostisch ungünstiger, aberranter Karyotyp kann somit bei Patienten mit systemischer Mastozytose und einer assoziierten hämatologischen Neoplasie als unabhängiger prognostischer Marker eines schlechten *Outcome* betrachtet werden. Unsere Ergebnisse zeigen, dass es aufgrund des aggressiven Krankheitsverlaufs beim Auftreten eines prognostisch ungünstigen Karyotyps wichtig ist, Patienten mit fortgeschrittener systemischer Mastozytose schon ab Initialdiagnose und auch im *follow-up* zytogenetisch zu untersuchen.

Analysen an sechs Patienten mit fortgeschrittener systemischer Mastozytose, *KIT* D816V-Mutation, Zusatzmutationen und aberranter Zytogenetik zeigten analog zu bisherigen Veröffentlichungen die Existenz einer gemeinsamen Progenitorzelle, die sowohl die für eine Mastzellerkrankung typische *KIT* D816V-Mutation trug, als auch die für eine assoziierte hämatologische Neoplasie typischen Zusatzmutationen. Ein gemeinsamer klonaler Ursprung der *KIT* D816V-positiven Mastzellerkrankung und der chromosomalen Veränderung konnte nicht gezeigt werden. Möglicherweise sind die Untersuchungen an Kolonie-bildenden Einheiten durch ihre 14-tägige Kultivierungsphase und ihrer geringen Kolonie-Ausbeute nicht geeignet um a) Zellen mit komplex aberrantem Karyotyp (genetisch instabil) zu kultivieren und b) eine ausreichende Anzahl an Kolonien zu generieren, um auch Patientenmaterial mit einer geringen *KIT* D816V-Allellast untersuchen zu können.

Zusammenfassend ist es in der vorliegenden Arbeit erstmals gelungen, den Stellenwert zytogenetischer Aberrationen bei Patienten mit systemischer Mastozytose und einer assoziierten hämatologischen Neoplasie zu zeigen. Die hier gewonnenen Erkenntnisse identifizieren definierte chromosomale Veränderungen als prognostischen Marker für ein schlechtes *Outcome*, sind von hoher klinischer Relevanz und ermöglichen eine Änderung der Therapiestrategie.

6. Literaturverzeichnis

Abdel-Wahab, O., Mullally, A., Hedvat, C., Garcia-Manero, G., Patel, J., Wadleigh, M., Malinger, S., Yao, J., Kilpivaara, O., Bhat, R., et al. (2009). Genetic characterization of TET1, TET2, and TET3 alterations in myeloid malignancies. *Blood* 114, 144-147.

Abdel-Wahab, O., Pardanani, A., Patel, J., Wadleigh, M., Lasho, T., Heguy, A., Beran, M., Gilliland, D.G., Levine, R.L., and Tefferi, A. (2011). Concomitant analysis of EZH2 and ASXL1 mutations in myelofibrosis, chronic myelomonocytic leukemia and blast-phase myeloproliferative neoplasms. *Leukemia* 25, 1200-1202.

Alvarez Argote, J., and Dasanu, C.A. (2017). ASXL1 mutations in myeloid neoplasms: pathogenetic considerations, impact on clinical outcomes and survival. *Current medical research and opinion*, 1-7.

Agis, H., Füreder, W., Bankl, H.C., Kundi, M., Sperr, W.R., Willheim, M., Boltz-Nitulescu, G., Butterfield, J.H., Kishi, K., Lechner, K., et al. (1996). Comparative immunophenotypic analysis of human mast cells, blood basophils and monocytes. *Immunology* 87, 535-543.

Akin, C., Brockow, K., D'Ambrosio, C., Kirshenbaum, A.S., Ma, Y., Longley, B.J., and Metcalfe, D.D. (2003). Effects of tyrosine kinase inhibitor STI571 on human mast cells bearing wild-type or mutated c-kit. *Experimental hematology* 31, 686-692.

Arber, D.A., Orazi, A., Hasserjian, R., Thiele, J., Borowitz, M.J., Le Beau, M.M., Bloomfield, C.D., Cazzola, M., and Vardiman, J.W. (2016). The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood* 127, 2391-2405.

Bae, M.H., Kim, H.K., Park, C.J., Seo, E.J., Park, S.H., Cho, Y.U., Jang, S., Chi, H.S., and Lee, K.H. (2013). A case of systemic mastocytosis associated with acute myeloid leukemia terminating as aleukemic mast cell leukemia after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Annals of laboratory medicine* 33, 125-129.

Beil, W.J., Schulz, M., and Wefelmeyer, U. (2000). Mast cell granule composition and tissue location--a close correlation. *Histology and histopathology* 15, 937-946.

Betz, B.L., and Hess, J.L. (2010). Acute myeloid leukemia diagnosis in the 21st century. *Archives of pathology & laboratory medicine* 134, 1427-1433.

Bibi, S., Langenfeld, F., Jeanningros, S., Brenet, F., Soucie, E., Hermine, O., Damaj, G., Dubreuil, P., and Arock, M. (2014). Molecular defects in mastocytosis: KIT and beyond KIT. *Immunology and allergy clinics of North America* 34, 239-262.

Blyth, K., Cameron, E.R., and Neil, J.C. (2005). The RUNX genes: gain or loss of function in cancer. *Nature reviews Cancer* 5, 376-387.

- Busque, L., Patel, J.P., Figueroa, M.E., Vasanthakumar, A., Provost, S., Hamilou, Z., Mollica, L., Li, J., Viale, A., Heguy, A., et al. (2012). Recurrent somatic TET2 mutations in normal elderly individuals with clonal hematopoiesis. *Nature genetics* 44, 1179-1181.
- Buttner, C., Henz, B.M., Welker, P., Sepp, N.T., and Grabbe, J. (1998). Identification of activating c-kit mutations in adult-, but not in childhood-onset indolent mastocytosis: a possible explanation for divergent clinical behavior. *The Journal of investigative dermatology* 111, 1227-1231.
- Cameron, S., Taylor, D.S., TePas, E.C., Speck, N.A., and Mathey-Prevot, B. (1994). Identification of a critical regulatory site in the human interleukin-3 promoter by in vivo footprinting. *Blood* 83, 2851-2859.
- Carbuccia, N., Murati, A., Trouplin, V., Brecqueville, M., Adelaide, J., Rey, J., Vainchenker, W., Bernard, O.A., Chaffanet, M., Vey, N., et al. (2009). Mutations of ASXL1 gene in myeloproliferative neoplasms. *Leukemia* 23, 2183-2186.
- Cools, J., DeAngelo, D.J., Gotlib, J., Stover, E.H., Legare, R.D., Cortes, J., Kutok, J., Clark, J., Galinsky, I., Griffin, J.D., et al. (2003). A tyrosine kinase created by fusion of the PDGFRA and FIP1L1 genes as a therapeutic target of imatinib in idiopathic hypereosinophilic syndrome. *The New England journal of medicine* 348, 1201-1214.
- Cornet, E., Dumezy, F., Roumier, C., Lepelley, P., Jouy, N., Philippe, N., Renneville, A., Berthon, C., Nelken, B., Quesnel, B., et al. (2012). Involvement of a common progenitor cell in core binding factor acute myeloid leukaemia associated with mastocytosis. *Leukemia research* 36, 1330-1333.
- Damaj, G., Joris, M., Chandesris, O., Hanssens, K., Soucie, E., Canioni, D., Kolb, B., Durieu, I., Gyan, E., Livideanu, C., et al. (2014). ASXL1 but Not TET2 Mutations Adversely Impact Overall Survival of Patients Suffering Systemic Mastocytosis with Associated Clonal Hematologic Non-Mast-Cell Diseases. *PLOS ONE* 9, e85362.
- de Vries, V.C., Pino-Lagos, K., Nowak, E.C., Bennett, K.A., Oliva, C., and Noelle, R.J. (2011). Mast cells condition dendritic cells to mediate allograft tolerance. *Immunity* 35, 550-561.
- Ehrlich, P. (1879). *Beiträge zur Theorie und Praxis der histologischen Färbung*. Leipzig: 65
- Ellis, J.M. (1949). Urticaria pigmentosa; a report of a case with autopsy. *Archives of pathology* 48, 426-435.
- Erben, P., Schwaab, J., Metzgeroth, G., Horny, H.P., Jawhar, M., Sotlar, K., Fabarius, A., Teichmann, M., Schneider, S., Ernst, T., et al. (2014). The KIT D816V expressed allele burden for diagnosis and disease monitoring of systemic mastocytosis. *Ann Hematol* 93, 81-88.

- Escribano, L., Akin, C., Castells, M., and Schwartz, L.B. (2006). Current options in the treatment of mast cell mediator-related symptoms in mastocytosis. *Inflammation & allergy drug targets* 5, 61-77.
- Frederiksen, J.K., Shao, L., Bixby, D.L., and Ross, C.W. (2016). Shared clonal cytogenetic abnormalities in aberrant mast cells and leukemic myeloid blasts detected by single nucleotide polymorphism microarray-based whole-genome scanning. *Genes, chromosomes & cancer* 55, 389-396.
- Fritsche-Polanz, R., Fritz, M., Huber, A., Sotlar, K., Sperr, W.R., Mannhalter, C., Fodinger, M., and Valent, P. (2010). High frequency of concomitant mastocytosis in patients with acute myeloid leukemia exhibiting the transforming KIT mutation D816V. *Molecular oncology* 4, 335-346.
- Furitsu, T., Tsujimura, T., Tono, T., Ikeda, H., Kitayama, H., Koshimizu, U., Sugahara, H., Butterfield, J.H., Ashman, L.K., Kanayama, Y., et al. (1993). Identification of mutations in the coding sequence of the proto-oncogene c-kit in a human mast cell leukemia cell line causing ligand-independent activation of c-kit product. *The Journal of clinical investigation* 92, 1736-1744.
- Gaidzik, V.I., Bullinger, L., Schlenk, R.F., Zimmermann, A.S., Rock, J., Paschka, P., Corbacioglu, A., Krauter, J., Schlegelberger, B., Ganser, A., et al. (2011). RUNX1 mutations in acute myeloid leukemia: results from a comprehensive genetic and clinical analysis from the AML study group. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 29, 1364-1372.
- Galli, S.J., Borregaard, N., and Wynn, T.A. (2011). Phenotypic and functional plasticity of cells of innate immunity: macrophages, mast cells and neutrophils. *Nature immunology* 12, 1035-1044.
- Garcia-Montero, A.C., Jara-Acevedo, M., Teodosio, C., Sanchez, M.L., Nunez, R., Prados, A., Aldanondo, I., Sanchez, L., Dominguez, M., Botana, L.M., et al. (2006). KIT mutation in mast cells and other bone marrow hematopoietic cell lineages in systemic mast cell disorders: a prospective study of the Spanish Network on Mastocytosis (REMA) in a series of 113 patients. *Blood* 108, 2366-2372.
- Gelsi-Boyer, V., Brecqueville, M., Devillier, R., Murati, A., Mozziconacci, M.J., and Birnbaum, D. (2012). Mutations in ASXL1 are associated with poor prognosis across the spectrum of malignant myeloid diseases. *Journal of hematology & oncology* 5, 12.
- Georgin-Lavialle, S., Lhermitte, L., Dubreuil, P., Chandesris, M.O., Hermine, O., and Damaj, G. (2013). Mast cell leukemia. *Blood* 121, 1285-1295.
- Giebel, L.B., Strunk, K.M., Holmes, S.A., and Spritz, R.A. (1992). Organization and nucleotide sequence of the human KIT (mast/stem cell growth factor receptor) proto-oncogene. *Oncogene* 7, 2207-2217.

- Gotlib, J., Kluin-Nelemans, H.C., George, T.I., Akin, C., Sotlar, K., Hermine, O., Awan, F.T., Hexner, E., Mauro, M.J., Sternberg, D.W., et al. (2016). Efficacy and Safety of Midostaurin in Advanced Systemic Mastocytosis. *The New England journal of medicine* 374, 2530-2541.
- Grabbe, J., Haas, N., and Czarnetzki, B.M. (1994a). [The mast cell]. *Hno* 42, 375-384.
- Grabbe, J., Welker, P., Dippel, E., and Czarnetzki, B.M. (1994b). Stem cell factor, a novel cutaneous growth factor for mast cells and melanocytes. *Archives of dermatological research* 287, 78-84.
- Greenberg, P., Cox, C., LeBeau, M.M., Fenaux, P., Morel, P., Sanz, G., Sanz, M., Vallespi, T., Hamblin, T., Oscier, D., et al. (1997). International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. *Blood* 89, 2079-2088.
- Guglielmelli, P., Lasho, T.L., Rotunno, G., Score, J., Mannarelli, C., Pancrazzi, A., Biamonte, F., Pardanani, A., Zoi, K., Reiter, A., et al. (2014). The number of prognostically detrimental mutations and prognosis in primary myelofibrosis: an international study of 797 patients. *Leukemia* 28, 1804-1810.
- Haase, D., Germing, U., Schanz, J., Pfeilstocker, M., Nosslinger, T., Hildebrandt, B., Kundgen, A., Lubbert, M., Kunzmann, R., Giagounidis, A.A., et al. (2007). New insights into the prognostic impact of the karyotype in MDS and correlation with subtypes: evidence from a core dataset of 2124 patients. *Blood* 110, 4385-4395.
- Haferlach, T., Nagata, Y., Grossmann, V., Okuno, Y., Bacher, U., Nagae, G., Schnittger, S., Sanada, M., Kon, A., Alpermann, T., et al. (2014). Landscape of genetic lesions in 944 patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia* 28, 241-247.
- Haferlach, T., Schnittger, S., Kern, W., Hiddemann, W., and Schoch, C. (2004). Genetic classification of acute myeloid leukemia (AML). *Ann Hematol* 83 Suppl 1, S97-100.
- Hanssens, K., Brenet, F., Agopian, J., Georgin-Lavialle, S., Damaj, G., Cabaret, L., Chandesris, M.O., de Sepulveda, P., Hermine, O., Dubreuil, P., et al. (2014). SRSF2-p95 hotspot mutation is highly associated with advanced forms of mastocytosis and mutations in epigenetic regulator genes. *Haematologica* 99, 830-835.
- Hartmann, K., and Henz, B.M. (2001). Mastocytosis: recent advances in defining the disease. *The British journal of dermatology* 144, 682-695.
- Hauswirth, A.W., Simonitsch-Klupp, I., Uffmann, M., Koller, E., Sperr, W.R., Lechner, K., and Valent, P. (2004). Response to therapy with interferon alpha-2b and prednisolone in aggressive systemic mastocytosis: report of five cases and review of the literature. *Leukemia research* 28, 249-257.

- Heinrich, M.C., Corless, C.L., Demetri, G.D., Blanke, C.D., von Mehren, M., Joensuu, H., McGreevey, L.S., Chen, C.J., Van den Abbeele, A.D., Druker, B.J., et al. (2003). Kinase mutations and imatinib response in patients with metastatic gastrointestinal stromal tumor. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 21, 4342-4349.
- Hoermann, G., Gleixner, K.V., Dinu, G.E., Kundi, M., Greiner, G., Wimazal, F., Hadzijusufovic, E., Mitterbauer, G., Mannhalter, C., Valent, P., et al. (2014). The KIT D816V allele burden predicts survival in patients with mastocytosis and correlates with the WHO type of the disease. *Allergy* 69, 810-813.
- Horan, R.F., and Austen, K.F. (1991). Systemic mastocytosis: retrospective review of a decade's clinical experience at the Brigham and Women's Hospital. *The Journal of investigative dermatology* 96, 5S-13S; discussion 13S-14S, 60S-65S.
- Horny, H.P., Parwaresch, M.R., and Lennert, K. (1985). Bone marrow findings in systemic mastocytosis. *Human pathology* 16, 808-814.
- Horny, H.P., Sillaber, C., Menke, D., Kaiserling, E., Wehrmann, M., Stehberger, B., Chott, A., Lechner, K., Lennert, K., and Valent, P. (1998). Diagnostic value of immunostaining for tryptase in patients with mastocytosis. *The American journal of surgical pathology* 22, 1132-1140.
- Horny, H.P., Sotlar, K., Sperr, W.R., and Valent, P. (2004). Systemic mastocytosis with associated clonal haematological non-mast cell lineage diseases: a histopathological challenge. *Journal of Clinical Pathology* 57, 604-608.
- Hsiang, Y.H., Spencer, D., Wang, S., Speck, N.A., and Raulet, D.H. (1993). The role of viral enhancer "core" motif-related sequences in regulating T cell receptor-gamma and -delta gene expression. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 150, 3905-3916.
- ISCN 2016. Simons, A., Schmid M. (2016). *An International System for Human Cytogenomic Nomenclature* (Basel: Karger)
- Ito, Y. (1999). Molecular basis of tissue-specific gene expression mediated by the runt domain transcription factor PEBP2/CBF. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms* 4, 685-696.
- Itzykson, R., Kosmider, O., Renneville, A., Gelsi-Boyer, V., Meggendorfer, M., Morabito, M., Berthon, C., Ades, L., Fenaux, P., Beyne-Rauzy, O., et al. (2013). Prognostic score including gene mutations in chronic myelomonocytic leukemia. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 31, 2428-2436.
- Jawhar, M., Schwaab, J., Schnittger, S., Sotlar, K., Horny, H.P., Metzgeroth, G., Muller, N., Schneider, S., Naumann, N., Walz, C., et al. (2015). Molecular profiling of myeloid progenitor cells in multi-mutated advanced systemic mastocytosis identifies KIT D816V as a distinct and late event. *Leukemia* 29, 1115-1122.

- Jawhar, M., Schwaab, J., Meggendorfer, M., Naumann, N., Horny, H.P., Sotlar, K., Haferlach, T., Schmitt, K., Fabarius, A., Valent, P., et al. (2017). The clinical and molecular diversity of mast cell leukemia with or without associated hematologic neoplasm. *Haematologica*.
- Jawhar, M., Schwaab, J., Hausmann, D., Clemens, J., Naumann, N., Henzler, T., Horny, H.P., Sotlar, K., Schoenberg, S.O., Cross, N.C.P., et al. (2016a). Splenomegaly, elevated alkaline phosphatase and mutations in the SRSF2/ASXL1/RUNX1 gene panel are strong adverse prognostic markers in patients with systemic mastocytosis. *Leukemia* 30, 2342-2350.
- Jawhar, M., Schwaab, J., Schnittger, S., Meggendorfer, M., Pfirrmann, M., Sotlar, K., Horny, H.P., Metzgeroth, G., Kluger, S., Naumann, N., et al. (2016b). Additional mutations in SRSF2, ASXL1 and/or RUNX1 identify a high-risk group of patients with KIT D816V(+) advanced systemic mastocytosis. *Leukemia* 30, 136-143.
- Jorpes, J. (1939). Heparin: Its chemistry, physiology and application in medicine. *Journal of the American Medical Association* 114, 350-350.
- Kazlauskas, A., Durden, D.L., and Cooper, J.A. (1991). Functions of the major tyrosine phosphorylation site of the PDGF receptor beta subunit. *Cell regulation* 2, 413-425.
- Kim, Y., Weiss, L.M., Chen, Y.Y., and Pullarkat, V. (2007). Distinct clonal origins of systemic mastocytosis and associated B-cell lymphoma. *Leukemia research* 31, 1749-1754.
- Kirshenbaum, A.S., Goff, J.P., Semere, T., Foster, B., Scott, L.M., and Metcalfe, D.D. (1999). Demonstration that human mast cells arise from a progenitor cell population that is CD34(+), c-kit(+), and expresses aminopeptidase N (CD13). *Blood* 94, 2333-2342.
- Kirshenbaum, A.S., Kessler, S.W., Goff, J.P., and Metcalfe, D.D. (1991). Demonstration of the origin of human mast cells from CD34+ bone marrow progenitor cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 146, 1410-1415.
- Knapp, R.H., Dewald, G.W., and Pierre, R.V. (1985). Cytogenetic studies in 174 consecutive patients with preleukemic or myelodysplastic syndromes. *Mayo Clinic proceedings* 60, 507-516.
- Kohlmann, A., Grossmann, V., Klein, H.U., Schindela, S., Weiss, T., Kazak, B., Dicker, F., Schnittger, S., Dugas, M., Kern, W., et al. (2010). Next-generation sequencing technology reveals a characteristic pattern of molecular mutations in 72.8% of chronic myelomonocytic leukemia by detecting frequent alterations in TET2, CBL, RAS, and RUNX1. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 28, 3858-3865.
- Kristensen, T., Broesby-Olsen, S., Vestergaard, H., Bindslev-Jensen, C., and Moller, M.B. (2012). Circulating KIT D816V-Mutation-positive non-mast cells in peripheral blood are characteristic of indolent systemic mastocytosis. *European journal of haematology* 89, 42-46.

- Kristensen, T., Vestergaard, H., Bindslev-Jensen, C., Moller, M.B., and Broesby-Olsen, S. (2014). Sensitive KIT D816V-Mutation analysis of blood as a diagnostic test in mastocytosis. *American journal of hematology* 89, 493-498.
- Kristensen, T., Vestergaard, H., and Moller, M.B. (2011). Improved detection of the KIT D816V-Mutation in patients with systemic mastocytosis using a quantitative and highly sensitive real-time qPCR assay. *The Journal of molecular diagnostics : JMD* 13, 180-188.
- Lawrence, J.B., Friedman, B.S., Travis, W.D., Chinchilli, V.M., Metcalfe, D.D., and Gralnick, H.R. (1991). Hematologic manifestations of systemic mast cell disease: a prospective study of laboratory and morphologic features and their relation to prognosis. *The American journal of medicine* 91, 612-624.
- Lemmon, M.A., Pinchasi, D., Zhou, M., Lax, I., and Schlessinger, J. (1997). Kit receptor dimerization is driven by bivalent binding of stem cell factor. *The Journal of biological chemistry* 272, 6311-6317.
- Lennert, K., and Parwaresch, M.R. (1979). Mast cells and mast cell neoplasia: a review. *Histopathology* 3, 349-365.
- Lev, S., Givol, D., and Yarden, Y. (1992). Interkinase domain of kit contains the binding site for phosphatidylinositol 3' kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89, 678-682.
- Lim, K.H., Tefferi, A., Lasho, T.L., Finke, C., Patnaik, M., Butterfield, J.H., McClure, R.F., Li, C.Y., and Pardanani, A. (2009). Systemic mastocytosis in 342 consecutive adults: survival studies and prognostic factors. *Blood* 113, 5727-5736.
- Lin, Y., Zheng, Y., Wang, Z.C., and Wang, S.Y. (2016). Prognostic significance of ASXL1 mutations in myelodysplastic syndromes and chronic myelomonocytic leukemia: A meta-analysis. *Hematology (Amsterdam, Netherlands)* 21, 454-461.
- Linnekin, D. (1999). Early signaling pathways activated by c-Kit in hematopoietic cells. *The international journal of biochemistry & cell biology* 31, 1053-1074.
- Longley, B.J., Jr., Metcalfe, D.D., Tharp, M., Wang, X., Tyrrell, L., Lu, S.Z., Heitjan, D., and Ma, Y. (1999). Activating and dominant inactivating c-KIT catalytic domain mutations in distinct clinical forms of human mastocytosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 1609-1614.
- Lundberg, P., Karow, A., Nienhold, R., Looser, R., Hao-Shen, H., Nissen, I., Girsberger, S., Lehmann, T., Passweg, J., Stern, M., et al. (2014). Clonal evolution and clinical correlates of somatic mutations in myeloproliferative neoplasms. *Blood* 123, 2220-2228.
- Manley, J.L., and Tacke, R. (1996). SR proteins and splicing control. *Genes & development* 10, 1569-1579.

- Marshall, J.S. (2004). Mast-cell responses to pathogens. *Nature reviews Immunology* 4, 787-799.
- Meggendorfer, M., Roller, A., Haferlach, T., Eder, C., Dicker, F., Grossmann, V., Kohlmann, A., Alpermann, T., Yoshida, K., Ogawa, S., et al. (2012). SRSF2 mutations in 275 cases with chronic myelomonocytic leukemia (CMML). *Blood* 120, 3080-3088.
- Metzgeroth, G., Schwaab, J., Gosenca, D., Fabarius, A., Haferlach, C., Hochhaus, A., Cross, N.C., Hofmann, W.K., and Reiter, A. (2013). Long-term follow-up of treatment with imatinib in eosinophilia-associated myeloid/lymphoid neoplasms with PDGFR rearrangements in blast phase. *Leukemia* 27, 2254-2256.
- Mol, C.D., Dougan, D.R., Schneider, T.R., Skene, R.J., Kraus, M.L., Scheibe, D.N., Snell, G.P., Zou, H., Sang, B.C., and Wilson, K.P. (2004). Structural basis for the autoinhibition and STI-571 inhibition of c-Kit tyrosine kinase. *The Journal of biological chemistry* 279, 31655-31663.
- Mrozek, K., Heerema, N.A., and Bloomfield, C.D. (2004). Cytogenetics in acute leukemia. *Blood reviews* 18, 115-136.
- Nagai, S., Ichikawa, M., Takahashi, T., Sato, H., Yokota, H., Oshima, K., Izutsu, K., Hangaishi, A., Kanda, Y., Motokura, T., et al. (2007). The origin of neoplastic mast cells in systemic mastocytosis with AML1/ETO-positive acute myeloid leukemia. *Experimental hematology* 35, 1747-1752.
- Nagata, H., Worobec, A.S., Oh, C.K., Chowdhury, B.A., Tannenbaum, S., Suzuki, Y., and Metcalfe, D.D. (1995). 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 10560-10564.
- Nakagomi, N., and Hirota, S. (2007). Juxtamembrane-type c-kit gene mutation found in aggressive systemic mastocytosis induces imatinib-resistant constitutive KIT activation. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 87, 365-371.
- Naumann, N., Schwaab, J., Metzgeroth, G., Jawhar, M., Haferlach, C., Gohring, G., Schlegelberger, B., Dietz, C.T., Schnittger, S., Lotfi, S., et al. (2015). Fusion of PDGFRB to MPRIP, CPSF6, and GOLGB1 in three patients with eosinophilia-associated myeloproliferative neoplasms. *Genes, chromosomes & cancer* 54, 762-770.
- Nettleship, E., Tay, W. (1869). Rare forms of urticaria. *British Medical Journal* 2.
- Okayama, Y., and Kawakami, T. (2006). Development, migration, and survival of mast cells. *Immunologic research* 34, 97-115.

- Omura, T., Heldin, C.H., and Ostman, A. (1997). Immunoglobulin-like domain 4-mediated receptor-receptor interactions contribute to platelet-derived growth factor-induced receptor dimerization. *The Journal of biological chemistry* 272, 12676-12682.
- Orfao, A., Garcia-Montero, A.C., Sanchez, L., and Escribano, L. (2007). Recent advances in the understanding of mastocytosis: the role of KIT mutations. *British journal of haematology* 138, 12-30.
- Papayannopoulou, T., Brice, M., Broudy, V.C., and Zsebo, K.M. (1991). Isolation of c-kit receptor-expressing cells from bone marrow, peripheral blood, and fetal liver: functional properties and composite antigenic profile. *Blood* 78, 1403-1412.
- Pardanani, A. (2013). Systemic mastocytosis in adults: 2013 update on diagnosis, risk stratification, and management. *American journal of hematology* 88, 612-624.
- Pardanani, A. (2016). Systemic mastocytosis in adults: 2017 update on diagnosis, risk stratification and management. *American journal of hematology* 91, 1146-1159.
- Pardanani, A., Baek, J.Y., Li, C.Y., Butterfield, J.H., and Tefferi, A. (2002). Systemic mast cell disease without associated hematologic disorder: a combined retrospective and prospective study. *Mayo Clinic proceedings* 77, 1169-1175.
- Pardanani, A., Lim, K.H., Lasho, T.L., Finke, C., McClure, R.F., Li, C.Y., and Tefferi, A. (2009). Prognostically relevant breakdown of 123 patients with systemic mastocytosis associated with other myeloid malignancies. *Blood* 114, 3769-3772.
- Pardanani, A.D., Lasho, T.L., Finke, C., Zblewski, D.L., Abdelrahman, R.A., Wassie, E.A., Gangat, N., Hanson, C.A., Ketterling, R.P., and Tefferi, A. (2016). ASXL1 and CBL mutations are independently predictive of inferior survival in advanced systemic mastocytosis. *British journal of haematology* 175, 534-536.
- Pennock, J.L., and Grecis, R.K. (2006). The mast cell and gut nematodes: damage and defence. *Chemical immunology and allergy* 90, 128-140.
- Peterson, L.F., and Zhang, D.E. (2004). The 8;21 translocation in leukemogenesis. *Oncogene* 23, 4255-4262.
- Pieri, L., Bonadonna, P., Elena, C., Papayannidis, C., Grifoni, F.I., Rondoni, M., Girlanda, S., Mauro, M., Magliacane, D., Elli, E.M., et al. (2016). Clinical presentation and management practice of systemic mastocytosis. A survey on 460 Italian patients. *American journal of hematology* 91, 692-699.
- Pignon, J.M., Giraudier, S., Duquesnoy, P., Jouault, H., Imbert, M., Vainchenker, W., Vernant, J.P., and Tulliez, M. (1997). A new c-kit mutation in a case of aggressive mast cell disease. *British journal of haematology* 96, 374-376.

Pullarkat, S.T., Pullarkat, V., Lagoo, A., Brynes, R., Weiss, L.M., Bedell, V., Chen, W., Huang, Q., Gaal, K., Weisenburger, D.D., et al. (2013). Characterization of bone marrow mast cells in acute myeloid leukemia with t(8;21) (q22;q22); RUNX1-RUNX1T1. *Leukemia research* 37, 1572-1575.

Pullarkat, V., Bedell, V., Kim, Y., Bhatia, R., Nakamura, R., Forman, S., Sun, J., Senitzer, D., and Slovak, M.L. (2007). Neoplastic mast cells in systemic mastocytosis associated with t(8;21) acute myeloid leukemia are derived from the leukemic clone. *Leukemia research* 31, 261-265.

Qiu, F.H., Ray, P., Brown, K., Barker, P.E., Jhanwar, S., Ruddle, F.H., and Besmer, P. (1988). Primary structure of c-kit: relationship with the CSF-1/PDGF receptor kinase family oncogenic activation of v-kit involves deletion of extracellular domain and C terminus. *The EMBO Journal* 7, 1003-1011.

Riley, J.F. (1953). Histamine in tissue mast cells. *Science (New York, NY)* 118, 332.

Roskoski, R., Jr. (2005). Structure and regulation of Kit protein-tyrosine kinase--the stem cell factor receptor. *Biochemical and biophysical research communications* 338, 1307-1315.

Rouet, A., Aouba, A., Damaj, G., Soucie, E., Hanssens, K., Chandesris, M.O., Livideanu, C.B., Dutertre, M., Durieu, I., Grandpeix-Guyodo, C., et al. (2016). Mastocytosis among elderly patients: A multicenter retrospective French study on 53 patients. *Medicine* 95, e3901.

Rowley, J.D. (1973). Identification of a translocation with quinacrine fluorescence in a patient with acute leukemia. *Annales de genetique* 16, 109-112.

Schanz, J., Steidl, C., Fonatsch, C., Pfeilstocker, M., Nosslinger, T., Tuechler, H., Valent, P., Hildebrandt, B., Giagounidis, A., Aul, C., et al. (2011). Coalesced multicentric analysis of 2,351 patients with myelodysplastic syndromes indicates an underestimation of poor-risk cytogenetics of myelodysplastic syndromes in the international prognostic scoring system. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 29, 1963-1970.

Schnittger, S., Dicker, F., Kern, W., Wendland, N., Sundermann, J., Alpermann, T., Haferlach, C., and Haferlach, T. (2011). RUNX1 mutations are frequent in de novo AML with noncomplex karyotype and confer an unfavorable prognosis. *Blood* 117, 2348-2357.

Schoch, C., Schnittger, S., Klaus, M., Kern, W., Hiddemann, W., and Haferlach, T. (2003). AML with 11q23/MLL abnormalities as defined by the WHO classification: incidence, partner chromosomes, FAB subtype, age distribution, and prognostic impact in an unselected series of 1897 cytogenetically analyzed AML cases. *Blood* 102, 2395-2402.

Schwaab, J., Schnittger, S., Sotlar, K., Walz, C., Fabarius, A., Pfirrmann, M., Kohlmann, A., Grossmann, V., Meggendorfer, M., Horny, H.P., et al. (2013). Comprehensive mutational profiling in advanced systemic mastocytosis. *Blood* 122, 2460-2466.

Sole, F., Luno, E., Sanzo, C., Espinet, B., Sanz, G.F., Cervera, J., Calasanz, M.J., Cigudosa, J.C., Milla, F., Ribera, J.M., et al. (2005). Identification of novel cytogenetic markers with prognostic significance in a series of 968 patients with primary myelodysplastic syndromes. *Haematologica* 90, 1168-1178.

Sotlar, K., Bache, A., Stellmacher, F., Bültmann, B., Valent, P., and Horny, H.-P. (2008). Systemic Mastocytosis Associated with Chronic Idiopathic Myelofibrosis: A Distinct Subtype of Systemic Mastocytosis-Associated Clonal Hematological Nonmast Cell Lineage Disorder Carrying the Activating Point Mutations KIT(D816V) and JAK2(V617F). *The Journal of molecular diagnostics : JMD* 10, 58-66.

Sotlar, K., Colak, S., Bache, A., Berezowska, S., Krokowski, M., Bultmann, B., Valent, P., and Horny, H.P. (2010). Variable presence of KITD816V in clonal haematological non-mast cell lineage diseases associated with systemic mastocytosis (SM-AHNMD). *The Journal of pathology* 220, 586-595.

Sotlar, K., Escribano, L., Landt, O., Mohrle, S., Herrero, S., Torrelo, A., Lass, U., Horny, H.P., and Bultmann, B. (2003). One-step detection of c-kit point mutations using peptide nucleic acid-mediated polymerase chain reaction clamping and hybridization probes. *The American journal of pathology* 162, 737-746.

Sotlar, K., Fridrich, C., Mall, A., Jaussi, R., Bultmann, B., Valent, P., and Horny, H.P. (2002). Detection of c-kit point mutation Asp-816 --> Val in microdissected pooled single mast cells and leukemic cells in a patient with systemic mastocytosis and concomitant chronic myelomonocytic leukemia. *Leukemia research* 26, 979-984.

Sotlar, K., Marafioti, T., Griesser, H., Theil, J., Aepinus, C., Jaussi, R., Stein, H., Valent, P., and Horny, H.P. (2000). 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. *Molecular pathology : MP* 53, 188-193.

Soucie, E., Hanssens, K., Mercher, T., Georjin-Lavialle, S., Damaj, G., Livideanu, C., Chandesris, M.O., Acin, Y., Létard, S., de Sepulveda, P., et al. (2012). In aggressive forms of mastocytosis, TET2 loss cooperates with c-KITD816V to transform mast cells. *Blood* 120, 4846-4849.

Sperr, W.R., El-Samahi, A., Kundi, M., Girschikofsky, M., Winkler, S., Lutz, D., Endler, G., Rumpold, H., Agis, H., Sillaber, C., et al. (2009). Elevated tryptase levels selectively cluster in myeloid neoplasms: a novel diagnostic approach and screen marker in clinical haematology. *European journal of clinical investigation* 39, 914-923.

Sperr, W.R., Horny, H.P., and Valent, P. (2002). Spectrum of associated clonal hematologic non-mast cell lineage disorders occurring in patients with systemic mastocytosis. *International archives of allergy and immunology* 127, 140-142.

Sperr, W.R., and Valent, P. (2012). Diagnosis, progression patterns and prognostication in mastocytosis. *Expert review of hematology* 5, 261-274.

- Sperr, W.R., Walchshofer, S., Horny, H.P., Fodinger, M., Simonitsch, I., Fritsche-Polanz, R., Schwarzinger, I., Tschachler, E., Sillaber, C., Hagen, W., et al. (1998). Systemic mastocytosis associated with acute myeloid leukaemia: report of two cases and detection of the c-kit mutation Asp-816 to Val. *British journal of haematology* 103, 740-749.
- Such, E., Cervera, J., Costa, D., Sole, F., Vallespi, T., Luno, E., Collado, R., Calasanz, M.J., Hernandez-Rivas, J.M., Cigudosa, J.C., et al. (2011). Cytogenetic risk stratification in chronic myelomonocytic leukemia. *Haematologica* 96, 375-383.
- Swerdlow, S.H., C.E., Harris N.L., Jaffe E.S, Pileri S.A., Stein H, Thiele J, Vardiman JW (2008). WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. (Lyon, France) IARC Press 2.
- Tallman, M.S., Dewald, G.W., Gandham, S., Logan, B.R., Keating, A., Lazarus, H.M., Litzow, M.R., Mehta, J., Pedersen, T., Perez, W.S., et al. (2007). Impact of cytogenetics on outcome of matched unrelated donor hematopoietic stem cell transplantation for acute myeloid leukemia in first or second complete remission. *Blood* 110, 409-417.
- Tefferi, A. (2010). Novel mutations and their functional and clinical relevance in myeloproliferative neoplasms: JAK2, MPL, TET2, ASXL1, CBL, IDH and IKZF1. *Leukemia* 24, 1128-1138.
- Tefferi, A., Guglielmelli, P., Lasho, T.L., Rotunno, G., Finke, C., Mannarelli, C., Belachew, A.A., Pancrazzi, A., Wassie, E.A., Ketterling, R.P., et al. (2014). CALR and ASXL1 mutations-based molecular prognostication in primary myelofibrosis: an international study of 570 patients. *Leukemia* 28, 1494-1500.
- Tefferi, A., Levine, R.L., Lim, K.H., Abdel-Wahab, O., Lasho, T.L., Patel, J., Finke, C.M., Mullally, A., Li, C.Y., Pardanani, A., et al. (2009). Frequent TET2 mutations in systemic mastocytosis: clinical, KITD816V and FIP1L1-PDGFR α correlates. *Leukemia* 23, 900-904.
- Tefferi, A., Verstovsek, S., and Pardanani, A. (2008). How we diagnose and treat WHO-defined systemic mastocytosis in adults. *Haematologica* 93, 6-9.
- Teodosio, C., Garcia-Montero, A.C., Jara-Acevedo, M., Alvarez-Twose, I., Sanchez-Munoz, L., Almeida, J., Morgado, J.M., Matito, A., Escribano, L., and Orfao, A. (2012). An immature immunophenotype of bone marrow mast cells predicts for multilineage D816V KIT mutation in systemic mastocytosis. *Leukemia* 26, 951-958.
- Thol, F., Kade, S., Schlarman, C., Loffeld, P., Morgan, M., Krauter, J., Wlodarski, M.W., Kolking, B., Wichmann, M., Gorlich, K., et al. (2012). Frequency and prognostic impact of mutations in SRSF2, U2AF1, and ZRSR2 in patients with myelodysplastic syndromes. *Blood* 119, 3578-3584.
- Thommes, K., Lennartsson, J., Carlberg, M., and Ronnstrand, L. (1999). Identification of Tyr-703 and Tyr-936 as the primary association sites for Grb2 and Grb7 in the c-Kit/stem cell factor receptor. *The Biochemical journal* 341 (Pt 1), 211-216.

- Toyama, K., Ohyashiki, K., Yoshida, Y., Abe, T., Asano, S., Hirai, H., Hirashima, K., Hotta, T., Kuramoto, A., Kuriya, S., et al. (1993). Clinical implications of chromosomal abnormalities in 401 patients with myelodysplastic syndromes: a multicentric study in Japan. *Leukemia* 7, 499-508.
- Traina, F., Visconte, V., Jankowska, A.M., Makishima, H., O'Keefe, C.L., Elson, P., Han, Y., Hsieh, F.H., Sekeres, M.A., Mali, R.S., et al. (2012). Single nucleotide polymorphism array lesions, TET2, DNMT3A, ASXL1 and CBL mutations are present in systemic mastocytosis. *PLoS One* 7, e43090.
- Travis, W.D., Li, C.Y., Yam, L.T., Bergstralh, E.J., and Swee, R.G. (1988). Significance of systemic mast cell disease with associated hematologic disorders. *Cancer* 62, 965-972.
- Tsai, S.C., Shih, L.Y., Liang, S.T., Huang, Y.J., Kuo, M.C., Huang, C.F., Shih, Y.S., Lin, T.H., Chiu, M.C., and Liang, D.C. (2015). Biological Activities of RUNX1 Mutants Predict Secondary Acute Leukemia Transformation from Chronic Myelomonocytic Leukemia and Myelodysplastic Syndromes. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 21, 3541-3551.
- Ustun, C., Reiter, A., Scott, B.L., Nakamura, R., Damaj, G., Kreil, S., Shanley, R., Hogan, W.J., Perales, M.-A., Shore, T., et al. (2014). Hematopoietic Stem-Cell Transplantation for Advanced Systemic Mastocytosis. *Journal of Clinical Oncology* 32, 3264-3274.
- Valent, P. (2013). Mastocytosis: a paradigmatic example of a rare disease with complex biology and pathology. *American journal of cancer research* 3, 159-172.
- Valent, P., Akin, C., Escribano, L., Fodinger, M., Hartmann, K., Brockow, K., Castells, M., Sperr, W.R., Klün-Nelemans, H.C., Hamdy, N.A., et al. (2007). Standards and standardization in mastocytosis: consensus statements on diagnostics, treatment recommendations and response criteria. *European journal of clinical investigation* 37, 435-453.
- Valent, P., Horny, H.P., Escribano, L., Longley, B.J., Li, C.Y., Schwartz, L.B., Marone, G., Nunez, R., Akin, C., Sotlar, K., et al. (2001). Diagnostic criteria and classification of mastocytosis: a consensus proposal. *Leukemia research* 25, 603-625.
- Valent, P., Sotlar, K., Sperr, W.R., Escribano, L., Yavuz, S., Reiter, A., George, T.I., Klün-Nelemans, H.C., Hermine, O., Butterfield, J.H., et al. (2014). Refined diagnostic criteria and classification of mast cell leukemia (MCL) and myelomastocytic leukemia (MML): a consensus proposal. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology* 25, 1691-1700.
- Valent, P., Spanblochl, E., Sperr, W.R., Sillaber, C., Zsebo, K.M., Agis, H., Strobl, H., Geissler, K., Bettelheim, P., and Lechner, K. (1992). Induction of differentiation of human mast cells from bone marrow and peripheral blood mononuclear cells by recombinant human stem cell factor/kit-ligand in long-term culture. *Blood* 80, 2237-2245.

- Valent, P., Sperr, W.R., and Akin, C. (2010). How I treat patients with advanced systemic mastocytosis. *Blood* 116, 5812-5817.
- Vannucchi, A.M., Lasho, T.L., Guglielmelli, P., Biamonte, F., Pardanani, A., Pereira, A., Finke, C., Score, J., Gangat, N., Mannarelli, C., et al. (2013). Mutations and prognosis in primary myelofibrosis. *Leukemia* 27, 1861-1869.
- Vendome, J., Letard, S., Martin, F., Svinarchuk, F., Dubreuil, P., Auclair, C., and Le Bret, M. (2005). Molecular modeling of wild-type and D816V c-Kit inhibition based on ATP-competitive binding of ellipticine derivatives to tyrosine kinases. *Journal of medicinal chemistry* 48, 6194-6201.
- Wang, S.A., Hutchinson, L., Tang, G., Chen, S.S., Miron, P.M., Huh, Y.O., Jones, D.M., Bueso-Ramos, C., Verstovsek, S., Medeiros, L.J., et al. (2013). Systemic mastocytosis with associated clonal hematological non-mast cell lineage disease: clinical significance and comparison of chromosomal abnormalities in SM and AHNMD components. *American journal of hematology* 88, 219-224.
- Wassie, E.A., Itzykson, R., Lasho, T.L., Kosmider, O., Finke, C.M., Hanson, C.A., Ketterling, R.P., Solary, E., Tefferi, A., and Patnaik, M.M. (2014). Molecular and prognostic correlates of cytogenetic abnormalities in chronic myelomonocytic leukemia: a Mayo Clinic-French Consortium Study. *American journal of hematology* 89, 1111-1115.
- Weiler, S.R., Mou, S., DeBerry, C.S., Keller, J.R., Ruscetti, F.W., Ferris, D.K., Longo, D.L., and Linnekin, D. (1996). JAK2 is associated with the c-kit proto-oncogene product and is phosphorylated in response to stem cell factor. *Blood* 87, 3688-3693.
- Wu, J.Y., and Maniatis, T. (1993). Specific interactions between proteins implicated in splice site selection and regulated alternative splicing. *Cell* 75, 1061-1070.
- Yarden, Y., Kuang, W.J., Yang-Feng, T., Coussens, L., Munemitsu, S., Dull, T.J., Chen, E., Schlessinger, J., Francke, U., and Ullrich, A. (1987). Human proto-oncogene c-kit: a new cell surface receptor tyrosine kinase for an unidentified ligand. *The EMBO journal* 6, 3341-3351.
- Yarden, Y., and Ullrich, A. (1988). Molecular analysis of signal transduction by growth factors. *Biochemistry* 27, 3113-3119.
- Yee, N.S., Paek, I., and Besmer, P. (1994). Role of kit-ligand in proliferation and suppression of apoptosis in mast cells: basis for radiosensitivity of white spotting and steel mutant mice. *The Journal of experimental medicine* 179, 1777-1787.
- Yoshida, K., Sanada, M., Shiraishi, Y., Nowak, D., Nagata, Y., Yamamoto, R., Sato, Y., Sato-Otsubo, A., Kon, A., Nagasaki, M., et al. (2011). Frequent pathway mutations of splicing machinery in myelodysplasia. *Nature* 478, 64-69.
- Zhrebker, L., Cooper, B., and Krause, J.R. (2014). Systemic mastocytosis with associated acute myelogenous leukemia. *Proceedings (Baylor University Medical Center)* 27, 22-24.

Eigene Publikationen:

Jawhar, M., Schwaab, J., Hausmann, D., Clemens, J., **Naumann, N.**, Henzler, T., Horny, H.P., Sotlar, K., Schoenberg, S.O., Cross, N.C.P., *et al.* (2016a). Splenomegaly, elevated alkaline phosphatase and mutations in the SRSF2/ASXL1/RUNX1 gene panel are strong adverse prognostic markers in patients with systemic mastocytosis. *Leukemia* *30*, 2342-2350.

Jawhar, M., Schwaab, J., Horny, H.P., Sotlar, K., **Naumann, N.**, Fabarius, A., Valent, P., Cross, N.C., Hofmann, W.K., Metzgeroth, G., *et al.* (2016b). Impact of centralized evaluation of bone marrow histology in systemic mastocytosis. *European journal of clinical investigation* *46*, 392-397.

Jawhar, M., Schwaab, J., Meggendorfer, M., **Naumann, N.**, Horny, H.P., Sotlar, K., Haferlach, T., Schmitt, K., Fabarius, A., Valent, P., *et al.* (2017a). The clinical and molecular diversity of mast cell leukemia with or without associated hematologic neoplasm. *Haematologica*.

Jawhar, M., Schwaab, J., **Naumann, N.**, Horny, H.P., Sotlar, K., Haferlach, T., Metzgeroth, G., Fabarius, A., Valent, P., Hofmann, W.K., *et al.* (2017b). Response and progression on midostaurin in advanced systemic mastocytosis: KIT D816V and other molecular markers. *Blood* (zur Publikation angenommen).

Jawhar, M., Schwaab, J., Schnittger, S., Meggendorfer, M., Pffirmann, M., Sotlar, K., Horny, H.P., Metzgeroth, G., Kluger, S., **Naumann, N.**, *et al.* (2016c). Additional mutations in SRSF2, ASXL1 and/or RUNX1 identify a high-risk group of patients with KIT D816V(+) advanced systemic mastocytosis. *Leukemia* *30*, 136-143.

Jawhar, M., Schwaab, J., Schnittger, S., Sotlar, K., Horny, H.P., Metzgeroth, G., Muller, N., Schneider, S., **Naumann, N.**, Walz, C., *et al.* (2015). Molecular profiling of myeloid progenitor cells in multi-mutated advanced systemic mastocytosis identifies KIT D816V as a distinct and late event. *Leukemia* *29*, 1115-1122.

Naumann, N., Schwaab, J., Metzgeroth, G., Jawhar, M., Haferlach, C., Gohring, G., Schlegelberger, B., Dietz, C.T., Schnittger, S., Lotfi, S., *et al.* (2015). Fusion of PDGFRB to MPRIP, CPSF6, and GOLGB1 in three patients with eosinophilia-associated myeloproliferative neoplasms. *Genes, chromosomes & cancer* *54*, 762-770.

Popp, H.D., Meyer, M., Brendel, S., Prinzhorn, W., **Naumann, N.**, Weiss, C., Seifarth, W., Schoenberg, S.O., Hofmann, W.K., Henzler, T., *et al.* (2016). Leukocyte DNA damage after reduced and conventional absorbed radiation doses using 3rd generation dual-source CT technology. *European journal of radiology open* *3*, 134-137.

Popp, H.D., **Naumann, N.**, Brendel, S. , Henzler, T., Weiss, C., Hofmann, W.-K., and Fabarius, A. (2017). Increase of DNA damage and alteration of the DNA damage response in myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemias. *Leukemia research* 57, 112-118.

Schwaab, J., Jawhar, M., **Naumann, N.**, Schmitt-Graeff, A., Fabarius, A., Horny, H.P., Cross, N.C., Hofmann, W.K., Reiter, A., and Metzgeroth, G. (2016). Diagnostic challenges in the work up of hypereosinophilia: pitfalls in bone marrow core biopsy interpretation. *Ann Hematol* 95, 557-562.

Schwaab, J., Knut, M., Haferlach, C., Metzgeroth, G., Horny, H.P., Chase, A., Tapper, W., Score, J., Waghorn, K., **Naumann, N.**, *et al.* (2015a). Limited duration of complete remission on ruxolitinib in myeloid neoplasms with PCM1-JAK2 and BCR-JAK2 fusion genes. *Ann Hematol* 94, 233-238.

Schwaab, J., Umbach, R., Metzgeroth, G., **Naumann, N.**, Jawhar, M., Sotlar, K., Horny, H.P., Gaiser, T., Hofmann, W.K., Schnittger, S., *et al.* (2015b). KIT D816V and JAK2 V617F-Mutations are seen recurrently in hypereosinophilia of unknown significance. *American journal of hematology* 90, 774-777.

7. Anhang

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Oberflächenantigene auf normalen Mastzellen, atypischen Mastzellen und basophilen Leukozyten	4
Tab. 2: WHO Klassifikation der Mastzellerkrankungen.....	8
Tab. 3: WHO Diagnosekriterien der systemischen Mastozytose	9
Tab. 4: Lokalisierung von Mutationen in verschiedenen Genen	27
Tab. 5: Komponenten und PCR-Programm qualitativer PCRs	27
Tab. 6: Komponenten und PCR-Programm der quantitativen KIT PCR zur Amplifikation des WT	28
Tab. 7: Komponenten und PCR-Programm der quantitativen KIT PCR für die Amplifikation der D816V-Mutation	29
Tab. 8: Übersicht über die Patientencharakteristika von 109 Patienten mit SM.....	37
Tab. 9: Klinische und laborchemische Parameter von 83 Patienten mit fortgeschrittener SM und normalem oder aberrantem Karyotyp.	47
Tab. 10: Diagnosen von 16 Patienten mit aberrantem Karyotyp initial und nach Progress.	50
Tab. 11: Karyotypen der Patienten mit aberrantem Karyotyp ohne Progress (n=8).	51
Tab. 12: Karyotyp der Patienten mit aberrantem Karyotyp mit Progress (n=8).	52

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Erkrankungen der myeloischen Neoplasien nach den Richtlinien der WHO 2016 2	
Abb. 2: Struktureller Aufbau, Aktivierung und Wirkmechanismus des KIT Rezeptors	7
Abb. 3: Normaler männlicher Karyotyp	12
Abb. 4: Schematische Darstellung eines Chromosoms	12
Abb. 5: Prozentuale Verteilung von AHN und Zusatzmutationen bei 109 SM-Patienten. 38	
Abb. 6: Komplex aberranter Klon	40
Abb. 7: Verteilung von Zusatzmutationen bei SM-Patienten	41

Abb. 8: Detaillierte Patientenübersicht	43
Abb. 9: Mutationskombinationen von 16 Genen bei 62 Patienten mit fortgeschrittener SM, KIT Mutation und mindestens einer Zusatzmutation	44
Abb. 10: Verteilung der Thrombozytenwerte bei 83 Patienten mit fortgeschrittener SM	45
Abb. 11: Einteilung des aberranten Karyotyps nach "geringes Risiko" und "hohes Risiko"	48
Abb. 12: Klinische Verläufe von 16 SM-Patienten mit aberrantem Karyotyp.....	49
Abb. 13: Kaplan–Meier Überlebenskurven von Patienten mit fortgeschrittener SM	54
Abb. 14: Elektropherogramme von Punktmutationen in den Genen KIT, NRAS, TET2 und TP53	55
Abb. 15: Elektropherogramm der 23 bp Deletion im ASXL1 Gen.	56
Abb. 16: Allelspezifischer, qualitativer Nachweis der JAK2 V617F und der SRSF2 P95H Mutation.	57
Abb. 17: FISH von Kolonien mit 5q- Syndrom und Trisomie 8 im Vergleich zu gesunden Zellen.	58
Abb. 18: Gemeinsames Vorkommen von Mutationen und chromosomalen Aberrationen in Kolonien	60
Abb. 19: Mutationshierarchie bei n=6 Patienten mit fortgeschrittener SM.....	61

8. Lebenslauf

PERSONALIEN

Name und Vorname: Naumann, Nicole
Geburtsdatum: 14.11.1988
Geburtsort: Dresden
Familienstand: ledig
Vater: Roland Naumann, CNC-Dreher
Mutter: Kerstin Rogalla, Zahntechnikerin

SCHULISCHER WERDEGANG

08/1995 – 06/1999 126. Grundschule Dresden
08/1999 – 07/2007 Vitzthum Gymnasium Dresden
07.07.2007 Abitur

UNIVERSITÄRER WERDEGANG

WS 2007 – SS 2011 Bachelorstudium Genetik an der Universität Salzburg
29.08.2011 Bachelor of Science
WS 2011 – WS 2013 Masterstudium Biologie an der Universität Salzburg
11/2012 – 11/2013 Masterarbeit:
Mastoparan und 2-Deoxy-D-Glukose als mögliche
Induktoren von programmiertem Zelltod (PCD) in der Alge
Micrasterias
11.12.2013 Master of Science, Note: 1,5

9. Danksagung

Zu Beginn möchte ich mich bei unserem Direktor Herrn Prof. Dr. med. Wolf-K. Hofmann, für die Möglichkeit, meine Dissertation im Wissenschaftlichen Labor der III. Medizinischen Klinik in Mannheim anzufertigen, bedanken.

Ein ganz besonders großer Dank gilt meinen „Doktoreltern“ Frau Prof. Dr. rer. nat. Alice Fabarius und Herrn Prof. Dr. med. Andreas Reiter für die Überlassung des anspruchsvollen Dissertationsthemas, die motivierenden Worte zur rechten Zeit, eine stets „offene Tür“ und das allzeit entgegengebrachte Vertrauen. Ebenso für die Betreuung „mit Herz“, beruflich, sowie privat.

Von ganzem Herzen danke ich ebenso meinen „Doktorgeschwistern“ Dr. med. Mohamad Jawhar und Dr. med. Juliana Schwaab für die außergewöhnlich gute Zusammenarbeit, die fachliche Unterstützung, die vielen wertvollen Tipps, Ideen und Erklärungen sowie den freundschaftlichen Umgang miteinander.

Weiterhin gebührt großer Dank Frau Susanne Brendel für die tagtägliche, liebe und kompetente Unterstützung im Laboralltag. Bei Frau PD Dr. sc. hum. Birgit Spieß bedanke ich mich kurzum für ihre Hilfsbereitschaft und die Unterstützung in ALLEN Lebenslagen. Zudem danke ich meiner Kollegin und Freundin Frau Dipl.-LMChem. Sabrina Ruppenthal für die spitzenmäßige Büroatmosphäre und die tolle Freundschaft, die sich in so kurzer Zeit entwickeln konnte. Vielen Dank weiterhin an alle Mitarbeiter/innen in Labor und Klinik, die mir die Zeit meiner Dissertation mit Kollegialität und tatkräftiger Unterstützung versüßt haben.

Herzlichen Dank an meinen Freund, Sebastian Ledig, der mit mir gemeinsam alle Höhen und Tiefen zu jeder Tages- und Nachtzeit mitgelebt hat, und ohne den diese Arbeit so nicht möglich gewesen wäre. Vielen Dank auch an meine Schwiegereltern für ein „always open door“ und das Sorgen für mein leibliches Wohl in stressigen Zeiten. Ebenso danke ich meiner besten Freundin Frau MSc Pia Anwander. Sie weiß wofür. Meinen Freunden Miriam Jäger und Alexander Sprenk danke ich von ganzen Herzen für das Verständnis und die unvergesslichen Unternehmungen. Größter Dank gilt meinen Eltern Kerstin Rogalla und Roland Naumann sowie meiner Omi, Ursula Swatew, für die Unterstützung in „guten wie in schlechten Zeiten“.