

Aus der III. Medizinischen Klinik der Medizinischen Fakultät Mannheim

(Direktor: Prof. Dr. med. Wolf-Karsten Hofmann)

**Prognostischer Effekt zusätzlicher somatischer Mutationen
bei *KIT* D816V positiver systemischer Mastozytose**

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

vorgelegt von
Sebastian Ulrich Hartmut Kluger

aus
Düsseldorf
2018

Dekan: Prof. Dr. med. Sergij Goerd

Referent: Prof. apl. Dr. med. Andreas Reiter

Meinen Eltern
Ilse Blank-Kluger und Dr. Klaus Kluger
und meiner Schwester
Lea-Kristin Kluger

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	III
1 EINLEITUNG	1
1.1 Myeloische Neoplasien.....	1
1.2 Mastzellen	1
1.2.1 Geschichte.....	1
1.2.2 Entwicklung und Physiologie	2
1.2.3 Färbeverhalten und histologische Charakterisierung.....	5
1.3 Rezeptortyrosinkinase KIT/CD117	5
1.3.1 Aufbau, Struktur und Signaltransduktion	5
1.3.2 Mutationen im <i>KIT</i> -Gen.....	7
1.4 Mastozytose	8
1.4.1 WHO-Klassifikation der Mastozytose von 2016.....	8
1.4.2 Klinik und Diagnose der systemischen Mastozytose	9
1.4.3 Therapie	11
1.5 Molekulargenetik	12
1.6 Fragestellungen.....	13
2 PATIENTEN, MATERIAL UND METHODEN.....	14
2.1 Patientenkollektiv.....	14
2.2 Material.....	14
2.2.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien	14
2.2.2 Chemikalien	15
2.2.3 Lösungen	16
2.2.4 Enzyme.....	17
2.2.5 Gebrauchsfertige Reaktionssysteme	17
2.2.6 Software	17
2.2.7 FISH-Sonden.....	17
2.2.8 Primer für die Polymerase-Kettenreaktionen	17
2.3 Methoden	18
2.3.1 Erythrozytenlyse und Leukozytenisolation in Vollblut oder Knochenmark	18

2.3.2	RNA-Isolation	18
2.3.3	DNA-Isolation	19
2.3.4	DNA-Amplifikation.....	20
2.3.5	Qualitätskontrolle der Ribonukleinsäureproben	20
2.3.6	Synthese von cDNA.....	21
2.3.7	Qualitative Polymerase-Kettenreaktion.....	21
2.3.8	Quantitative Real Time PCR (qRT-PCR).....	23
2.3.9	Agarosegelelektrophorese	25
2.3.10	Next-generation deep amplicon Sequenzierung.....	25
2.3.11	FISH	27
2.3.12	Zytogenetik	28
2.3.13	Statistische Auswertung	29
3	ERGEBNISSE	31
3.1	Auswertung laborchemischer, klinischer und molekulargenetischer Charakteristika des Patientenkollektivs	31
3.1.1	Deskriptive Analyse krankheitsrelevanter Parameter	31
3.1.2	Häufigkeiten der Zusatzmutationen	34
3.1.3	Assoziationen von Subtypen der SM und Zusatzmutationen.....	34
3.2	Analyse von Einflussfaktoren auf klinische Endpunkte und Überlebenszeitkurven.....	35
3.2.1	Einfluss von klinischen und hämatologischen Parametern auf das Gesamtüberleben	35
3.2.2	Zusatzmutationen als unabhängige Risikofaktoren	37
3.3	Prognostische Bedeutung von Mutationen im S/A/R Genpanel	38
3.3.1	Einfluss von Mutationen im S/A/R Panel auf klinische und hämatologische Parameter.....	38
3.3.2	Einfluss von Mutationen im S/A/R Genpanel auf die Überlebenszeit	40
4	DISKUSSION	42
5	ZUSAMMENFASSUNG.....	52
6	LITERATURVERZEICHNIS.....	54
7	ANHANG	62
8	LEBENS LAUF	64
9	DANKSAGUNG	66

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AHN	assoziierte hämatologische Neoplasie
ALL	akute lymphatische Leukämie
AML	akute myeloische Leukämie
AP	alkalische Phosphatase
ASM	aggressive systemische Mastozytose
ASXL1	engl. Additional Sex Combs Like 1
CEL	chronische Eosinophilenleukämie
CFU-GM	engl. Colony Forming Unit – Granulocyte, Macrophage
CLL	chronische lymphatische Leukämie
CML	chronische myeloische Leukämie
CMML	chronische myelomonozytäre Leukämie
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
Hb	Hämoglobin
HES	hypereosinophiles Syndrom
HR	engl. Hazard ratio
IFN	Interferon
i.PI.	im Plasma
i.S.	im Serum
ISM	indolente systemische Mastozytose
JAK2	Januskinase 2
KIT	Stammzellfaktor-Rezeptor KIT
KM	Knochenmark
MCL	Mastzelleukämie
MDS	myelodysplastisches Syndrom
MF	Myelofibrose
MNC	mononukleäre Zellen
MPN	myeloproliferative Neoplasien
MPNu	unklassifizierte myeloproliferative Neoplasien
NPM1	Nucleophosmin 1
PB	peripheres Blut
PBS	engl. Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
PMF	primäre Myelofibrose
PV	Polycythaemia Vera
RUNX1	engl. Runt Related Transcription Factor 1
SCF	engl. Stem Cell Factor
SM	systemische Mastozytose
SSM	schwelende systemische Mastozytose
SZT	Stammzelltransplantation

TET2	engl. Tet methylcytosine dioxygenase 2
TK	Tyrosinkinase
WGA	engl. whole genome amplification
WHO	World Health Organisation

1 EINLEITUNG

1.1 Myeloische Neoplasien

Die verschiedenen Entitäten der Neoplasien der myeloischen Zellreihen des Blutes werden seit der Klassifikation der World Health Organisation (WHO) von 2008 im Cluster der myeloischen Neoplasien zusammengefasst (Abbildung 1). Hierzu zählen in der aktuell gültigen Fassung der WHO-Klassifikation von 2016 die akuten myeloischen Leukämien (AML), die myeloproliferativen Neoplasien (MPN), die myelodysplastischen Syndrome (MDS), die myelodysplastischen/myeloproliferativen Neoplasien (MDS/MPN) und die myeloischen und lymphatischen Neoplasien mit Eosinophilie und Rearrangierung von *PDGFRA*, *PDGFRB*, *FGFR1* oder *PCM1-JAK2* (MLN-eo) sowie die Mastozytose, die im Gegensatz zu früheren Klassifikationen nun eine eigenständige Entität bildet (Horny et al., 2017).

Die im Rahmen dieser Arbeit näher untersuchte Mastozytose wurde zuvor unter der Obergruppe der MPN klassifiziert, aufgrund der Erkenntnisse der hämatologischen Forschung zu systemischen Mastozytosen und der in Folge beschriebenen spezifischen klinischen, pathologischen und molekulargenetischen Charakteristika der Erkrankung scheint heutzutage jedoch die Einordnung in eine separate Entität angemessen.

1.2 Mastzellen

1.2.1 Geschichte

Die medizinische Erstbeschreibung einer Mastzellerkrankung datiert auf das Jahr 1869 durch E. Nettleship und W. Tay, die den Fall einer urtikariellen Hauterkrankung mit rotem Dermographismus als „*chronic urticaria, leaving brown stains*“ publizierten (Nettleship, 1869). Zur damaligen Zeit war die Mastzelle noch nicht bekannt; erst Paul Ehrlich beschrieb die Zelle 1878 histologisch und deutete die im Zytoplasma eingeschlossenen Granula irrtümlicherweise als Reste der Phagozytose und prägte daher die Bezeichnung „Mastzelle“ (Ehrlich, 1878). Er bemerkte auch die räumliche Beziehung der Zellen zu Nerven und Gefäßen. Mit dem darauf folgenden Nachweis von Mastzellen in der Haut von Patienten mit Urticaria pigmentosa gelang die Einordnung der Dermatose als Mastzellerkrankung. Erst im Jahre 1949 wurde die

Mastozytose dann auch als systemische Erkrankung mit viszeraler Beteiligung beschrieben (Ellis, 1949).

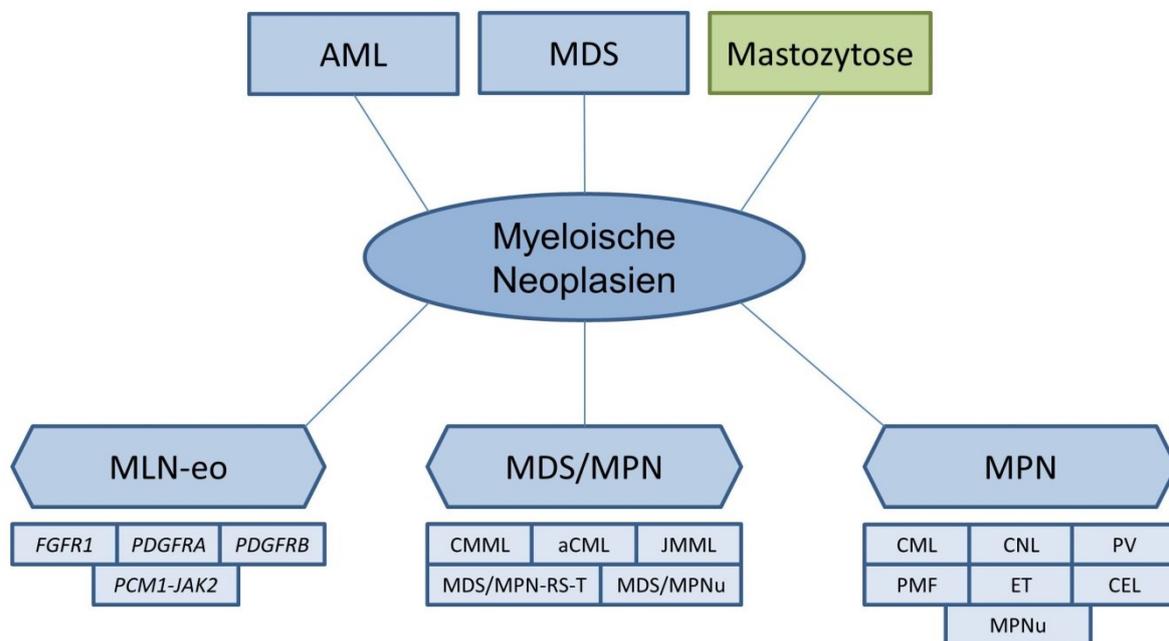


Abbildung 1: WHO-Klassifikation der myeloischen Neoplasien und Leukämien (2016)

Abkürzungen: AML, akute myeloische Leukämie; MDS, myelodysplastisches Syndrom; 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.

1.2.2 Entwicklung und Physiologie

Wie alle Zellen der myeloischen Reihe entwickeln sich Mastzellen aus *cluster of differentiation-34*-positiven (CD34⁺) pluripotenten Stammzellen der Hämatopoese (Kirshenbaum et al., 1991). Diese differenzieren im Knochenmark (KM) zu Mastzellen unter Einfluss des *stem cell factor* (SCF, KIT-Ligand), der als Signal für Proliferation, Migration, Überleben und Differenzierung von Mastzellen von großer Bedeutung ist. Nachdem noch nicht gänzlich ausdifferenzierte Mastzellvorläufer das KM verlassen haben, verteilen sie sich vor allem in den Geweben der Grenzflächen des Körpers und in serös ausgekleideten Organen wie der Haut, den Alveolen und

den Schleimhäuten. Im Zielgewebe erfolgt die endgültige Differenzierung unter dem Einfluss des Mikromilieus (Grabbe et al., 1994) und verschiedener Effektoren wie Interleukinen, Interferon (IFN)- γ , *nerve growth factor* (NGF), *transforming growth factor* (TGF)- β und dem *granulocyte/macrophage colony stimulating factor* (GM-CSF) und anderer Zytokine (Escribano et al., 2006; Galli et al., 2011).

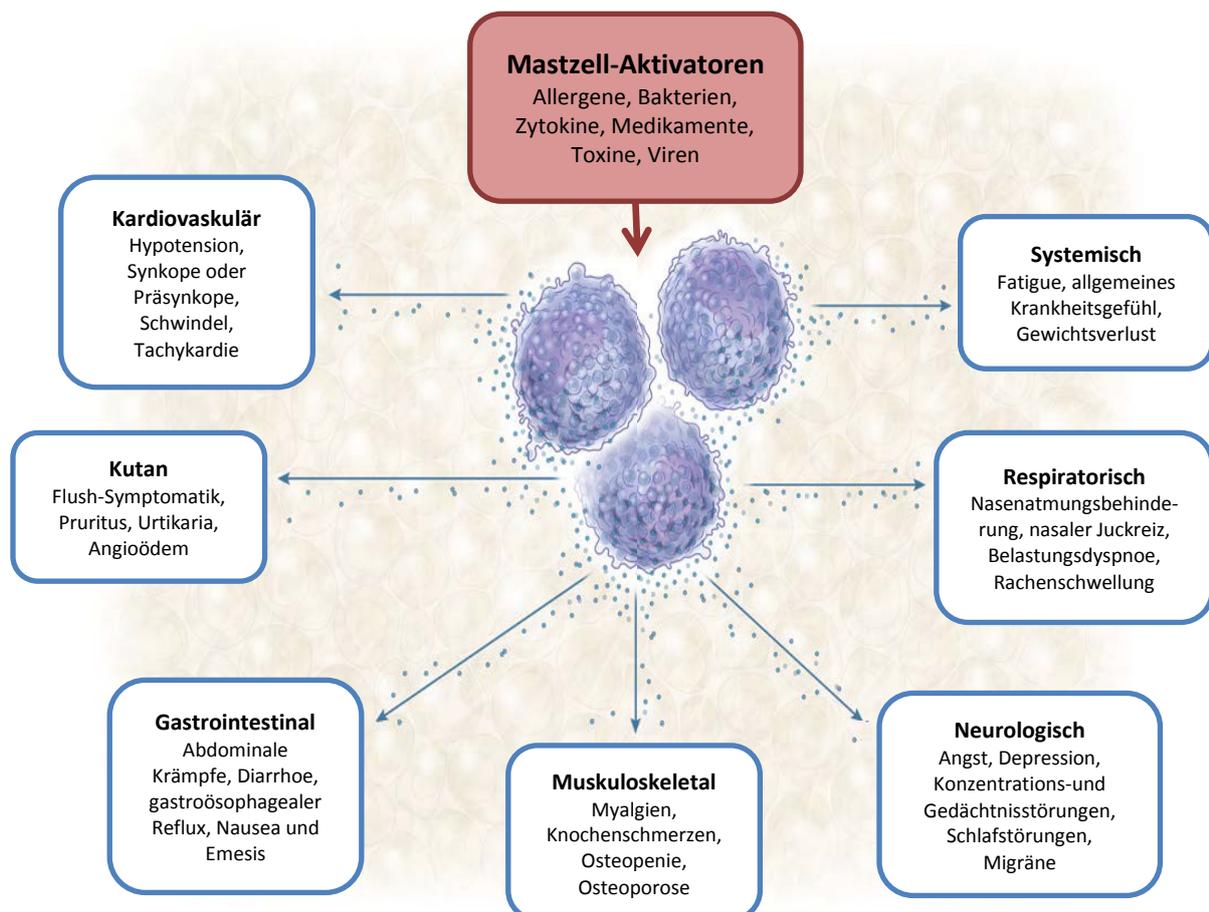


Abbildung 2: Klinische Effekte der Mastzelldegranulation. Abbildung modifiziert nach Theoharides et al. (2015)

Mastzellen spielen eine große Rolle bei der angeborenen und der erworbenen Immunantwort. So vermitteln sie vor allem die allergische Typ I-Reaktion, bei der ein Allergen zwei antigenspezifische IgE-Moleküle querverbindet (*cross-link*) und den auf Mastzellen konstitutiv exprimierten, hochaffinen Fc Epsilon Rezeptor 1 (Fc ϵ RI) aktiviert. Auch andere Mediatoren können Mastzellen aktivieren, dazu gehören Anaphylatoxine (via Komplement C3a und C5a), IgG-Aggregate, Medikamente, Tiergifte, Zytokine, physikalische Stimulation (Temperatur und Druck) sowie Neuropeptide wie Substanz P und Corticotropin-Releasing-Hormon (CRH).

Außerdem exprimieren Mastzellen auch Rezeptoren für diverse andere Liganden, darunter auch toll-like Rezeptoren (TLR), die durch Antigene auf bakteriellen Zellwänden und viralen Proteinen direkt aktiviert werden können. Die Aktivierung wird durch Anwesenheit von SCF und Interleukin-33 erleichtert (Fux et al., 2014), zusammen mit Substanz P triggern die Stoffe die Ausschüttung des *vascular endothelial growth factor* (VEGF, Theoharides et al. (2010)).

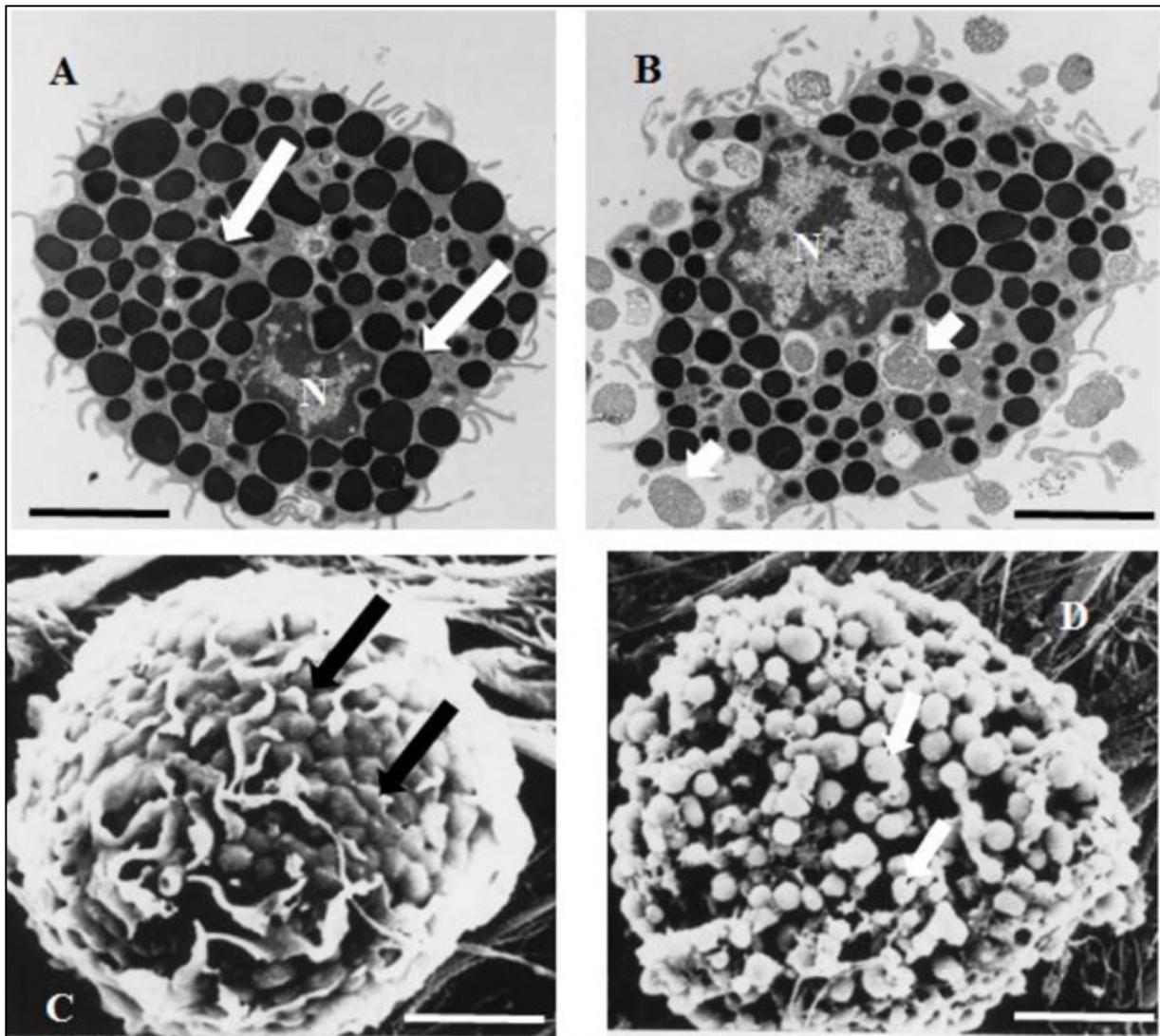


Abbildung 3: Mastzellen vor (A,C) und nach Degranulation (B,D); Pfeile zeigen auf Granula vor (A, C) und nach Exozytose (B, D). Theoharides et al. (2015)

Bei Aktivierung der Mastzelle setzt diese mittels Exozytose aus präformierten zytoplasmatischen Granula eine Reihe von Mediatoren frei (Abbildung 3), darunter Heparin, Histamin, Serotonin, Plättchen-aktivierender Faktor (PAF), Leukotriene,

Interleukine (ILN, z.B. ILN-6, ILN-9 und ILN-13), Proteasen (z.B. Tryptase, Chymase und Carboxypeptidase), Prostaglandine, Chemokine (CXCL8, CCL2 und CCL5), Tumornekrosefaktor (TNF)- α und VEGF (Olszewski et al., 2007; Theoharides et al., 2015). Die klinische Symptomatik der Mastzellaktivierung ist in Abbildung 2 ausführlich dargestellt und beinhaltet neben kardiovaskulären Symptomen (Tachykardie, Hypotonie) auch kutane (Flush, Urticaria, Angioödem) und neuropsychiatrische (Angstzustände, Nervosität, Depression) Symptome.

1.2.3 Färbeverhalten und histologische Charakterisierung

Mastzellen werden in der histologischen Aufarbeitung sowohl mit Standardfärbungen wie Hämatoxylin-Eosin, Giemsa oder Toluidinblau als auch mit Spezialfärbungen (Naphtol-AS-D-Chlorazetatesterase, CE) und mittels immunhistochemischer Verfahren identifiziert. Für letztere sind die auf der Zelloberfläche exprimierte CD-Antigene von großer Bedeutung. Spezifische immunhistochemische Antikörper gegen von Mastzellen exprimierte Muster wie CD117 (SCF-Rezeptor) und CD25 helfen, die Mastzellen von den ansonsten morphologisch ähnlichen basophilen Granulozyten eindeutig unterscheiden zu können. Ebenso werden Antikörper zum histologischen Nachweis der Mastzelltryptase verwendet.

1.3 Rezeptortyrosinkinase KIT/CD117

Zur Gruppe der Typ-III-Rezeptortyrosinkinasen gehört neben Rezeptoren für den *platelet derived growth factor* (PDGFRA und PDGFRB) auch der SCF-Rezeptor oder auch KIT-Rezeptor. Neben einem ähnlichen strukturellen Aufbau verbindet die Rezeptortyrosinkinasen die Fähigkeit zur transmembranösen Signaltransduktion von proliferativen extrazellulären Signalen.

1.3.1 Aufbau, Struktur und Signaltransduktion

Der KIT-Rezeptor wird von einem 21 Exons großen Bereich des langen Arms von Chromosom 4 (4q12), dem Proto-Onkogen *KIT*, translatiert und besteht aus 976 Aminosäuren (AS). Ein Monomer des Translationsproduktes besteht aus mehreren Domänen, die zum Teil extrazellulär, intrazellulär und, in Bereichen mit vermehrt hydrophoben AS, in der Zellmembran verankert liegen (Abbildung 4).

Der extrazelluläre Abschnitt besteht aus fünf Immunglobulin (Ig)-ähnlichen Schleifen, die den Liganden (SCF) binden (Ig-Schleifen 1-3) und für die Dimerisierung bei

Aktivierung des Rezeptors durch den Liganden wichtig sind (Ig-Schleifen 4 und 5). Der intrazelluläre Abschnitt des Rezeptormonomers setzt sich zusammen aus einer für die Autoinhibition in Abwesenheit eines Liganden verantwortlichen Juxtamembrandomäne (JM) sowie den zwei Tyrosinkinasedomänen TK1 und TK2, zwischen denen sich zusätzlich noch das intermediäre Kinaseinsert findet. Dieser Abschnitt des Monomers ist für die Signaltransduktion und Aktivierung der nachfolgenden Signaltransduktionswege bedeutsam.

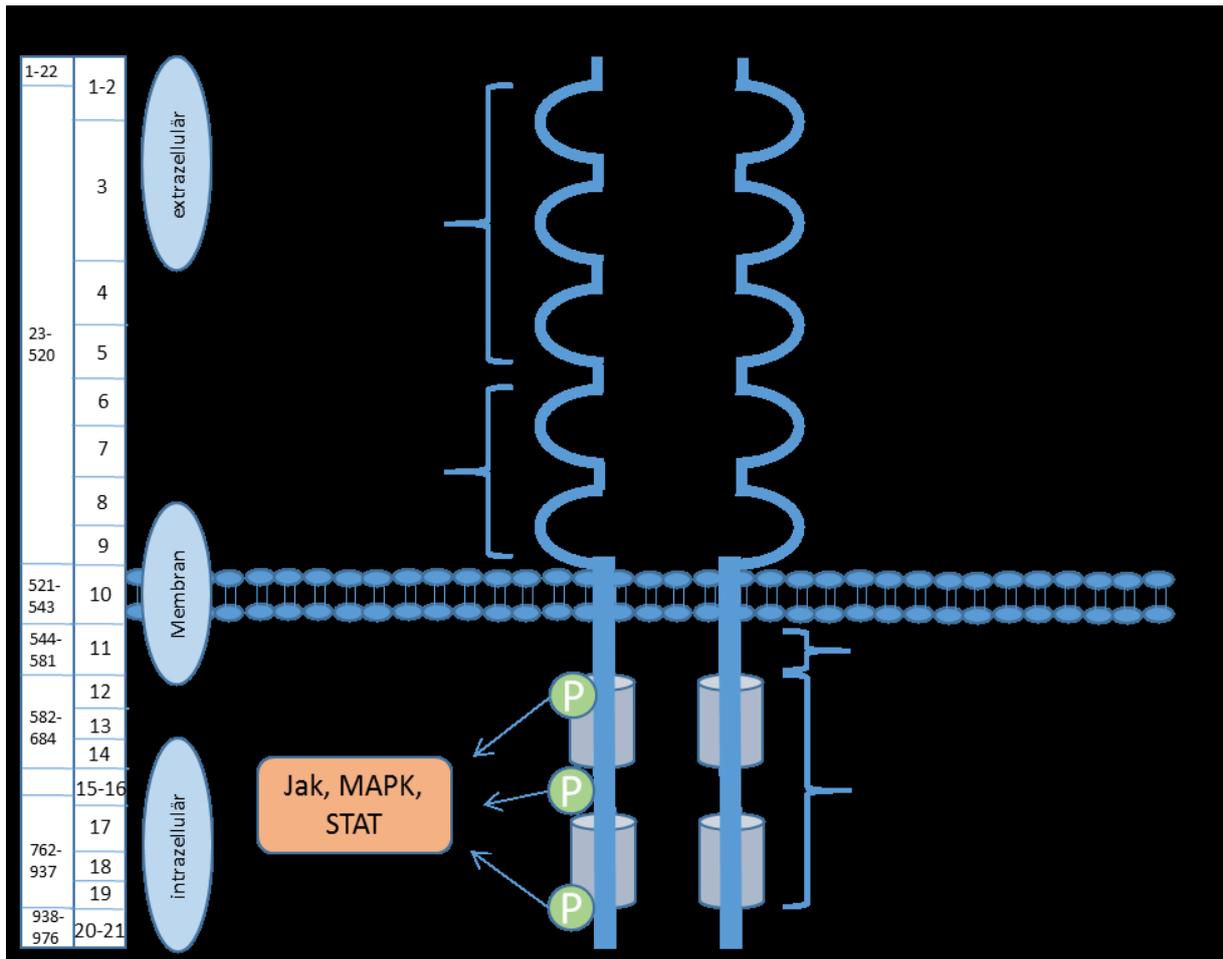


Abbildung 4: Schematische Darstellung des strukturellen Aufbaus des KIT-Rezeptors

Dargestellt sind zwei Rezeptormonomere, die bei Bindung von SCF dimerisieren. Die Abbildung zeigt den Strukturaufbau des CD117/KIT-Rezeptors mit insgesamt 5 extrazellulär vorhandenen Immunglobulin (Ig)-Schleifen, einer Transmembrandomäne, einer Juxtamembrandomäne (JM) und den Tyrosinkinasedomänen TK1 und TK2, zwischen denen das intermediäre Kinaseinsert liegt. Bei Dimerisierung werden die Pathways der Januskinase (JAK), der Mitogen-aktivierten-Proteinkinase (MAPK) und des „Signal Transducer and Activator of Transcription“ (STAT) aktiviert. Diese fördern durch unterschiedliche Signalwege im Zellkern Proliferation, Differenzierung und Wachstum. Abkürzungen: AS, Aminosäuren; P, Phosphat.

Bei Bindung eines Liganden an den extrazellulären Abschnitt zweier KIT-Rezeptor-Monomere kommt es zur Dimerisierung und Konformationsänderung der Proteine (Lemmon et al., 1997). Als direkte Folge findet eine Autophosphorylierung der Tyrosinreste an den Tyrosinkinasedomänen statt (Kazlauskas et al., 1991), die dann durch Bindung verschiedener Adaptorproteine unterschiedliche intrazelluläre Signalkaskaden auslösen wie z.B. den der Januskinase (JAK), der Mitogen-aktivierten-Proteinkinase (MAPK) und des „Signal Transducer and Activator of Transcription“ (STAT). Diese führen zu Veränderungen im Zellkern, die unter anderem Proliferation, Wachstum und Differenzierung fördern und Apoptose hemmen (Roskoski, 2005; Weiler et al., 1996).

Weiter an der Signaltransduktion unmittelbar beteiligte Proteine sind beispielsweise die PI3-Kinase, die Adapterproteine Grb2, Grb7 und die Phospholipase Cy (PLCy) (Tallquist and Kazlauskas, 2004; Thommes et al., 1999). Vielen dieser Proteine ist eine SRC-Homologie-2-Domäne (SH-2) gemeinsam, die eine hochaffine Bindung an die Tyrosinreste der TK- und Kinaseinsertdomänen des KIT-Rezeptors ermöglicht.

1.3.2 Mutationen im *KIT*-Gen

Im *KIT*-Rezeptorgen konnten schon bald nach seiner Erstbeschreibung (Yarden et al., 1987) auch Mutationen gefunden werden, die ersten wurden dabei in der Mastzelleukämie (MCL) Zelllinie HMC-1 gefunden. Es handelte sich dabei um D816V und V560G Mutationen (Buttner et al., 1998; Furitsu et al., 1993); speziell von ersterer weiß man heute, dass diese bei mehr als 80 - 90 % der Patienten mit systemischer Mastozytose (SM) nachgewiesen werden kann (Garcia-Montero et al., 2006).

Der Pathomechanismus der Mutation ist aufgrund der hohen Prävalenz unter SM-Patienten heutzutage gut bekannt. Durch Substitution der Base Adenin durch Thymin im Codon 816 im *KIT*-Gen kommt es zum Aminosäuretausch von Asparagin zu Valin (Asp816→Val). Diese Punktmutation hat zur Folge, dass im aktiven Zentrum des KIT-Rezeptors auch in Abwesenheit eines Liganden eine konstitutive Aktivierung erfolgt, die zur unkontrollierten Proliferation von Mastzellen und Vorläuferzellen führt und im Falle der Mastozytose die komplexe Stammzellerkrankung phänotypisch bestimmt (Furitsu et al., 1993; Jawhar et al., 2015). Auch andere bislang nachgewiesene Mutationen im *KIT*-Gen (i.e. D816H und D816Y) haben eine konstitutive Aktivierung der Rezeptortyrosinkinase zur Folge.

1.4 Mastozytose

Unter der Mastozytose subsumiert man Erkrankungen mit einer pathologisch vermehrten Proliferation von Mastzellen und variabler Klinik. Prinzipiell lassen sich zwei Formen der Mastozytose unterscheiden: zum einen die rein kutane Form, zum anderen die systemische Variante der Mastozytose mit variabler Beteiligung viszeraler Organe. Die systemische Erkrankung ist selten, bisher existieren keine belastbaren Daten zu Inzidenz und Prävalenz, jedoch entsteht im Moment ein Patientenregister des „European Competence Network on Mastocytosis“, in dem Daten zu Epidemiologie, Verlauf und Prognose der Mastozytose gesammelt werden sollen (Valent, 2015). Zusätzlich besteht seit 2012 bereits das „Deutsche Register für Erkrankungen der Eosinophilen und Mastzellen“.

Zwar sind hereditäre Fälle beschrieben worden, jedoch ist die Mastozytose in der Regel eine nicht-hereditäre, somatische Erkrankung mit zwei Altersgipfeln in der (frühen) Kindheit und im Erwachsenenalter. Die in der Kindheit diagnostizierten Fälle sind mehrheitlich rein kutan und remittieren oft spontan mit der Pubertät. Im Gegensatz dazu präsentieren sich die im Erwachsenenalter diagnostizierten Fälle meist als systemische Erkrankung, spontane Remissionen werden nicht beobachtet (Hartmann et al., 2016; Wiechers et al., 2015).

Für die SM wird eine Inzidenz von 1-10 Neuerkrankungen auf eine Million Menschen angenommen, sie gehört damit zu den seltenen hämatologischen Neoplasien und zeigt zudem einen höchst unterschiedlichen Verlauf (Cohen et al., 2014; Hartmann and Henz, 2001; Valent, 2013). So verläuft die Erkrankung bei den meisten Patienten indolent und hat kaum Einfluss auf die Lebenserwartung. Bei den aggressiven Verlaufsformen und der MCL ist die Prognose deutlich schlechter mit mittleren Überlebenszeiten nach Diagnosestellung von wenigen Monaten bis zu 3-4 Jahren (Pardanani, 2012).

1.4.1 WHO-Klassifikation der Mastozytose von 2016

Die aktuell gültige Unterteilung der Mastozytose in Erkrankungssubgruppen ist in Tabelle 1 aufgeführt. Es werden neben der kutanen Form mehrere systemische Verlaufsformen unterschieden, darunter die indolente SM (ISM), die *smoldering* (deutsch: schwelende) SM (SSM), die SM mit assoziierter hämatologischer Neoplasie (SM-AHN), die aggressive SM (ASM) und die MCL. Als weitere, sehr

seltene Entität ist das Mastzellsarkom (MCS) aufgeführt, welches als solider, destruktiv wachsender Tumor aus zytologisch hochgradig malignen Mastzellen definiert ist (Horny et al., 2017).

Tabelle 1: WHO-Klassifikation der Mastozytose (2016)

1. Kutane Mastozytose (CM)
2. Systemische Mastozytose (SM)
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 und Diagnose der systemischen Mastozytose

Die Diagnose einer SM erfordert das Zutreffen des Hauptkriteriums und eines Nebenkriteriums oder mindestens dreier Nebenkriterien. Die Kriterien nach internationalem Konsens sind in Tabelle 2 aufgeführt.

Die klinische Präsentation der Patienten ist höchst unterschiedlich und stark abhängig vom Subtyp der Erkrankung. Generell muss davon ausgegangen werden, dass die SM aufgrund ihrer gerade bei den indolenten Formen unspezifischen Klinik eher unterdiagnostiziert ist (Valent, 2015).

Patienten mit ISM zeigen eine Vielzahl von unterschiedlich ausgeprägten Symptomen, darunter häufig anaphylaktische Reaktionen, Hitzewallungen mit Hautrötung (engl. *flushes*), Diarrhoen, Osteopenie bis zur Osteoporose, Schmerzen, Nahrungsmittelunverträglichkeiten und andere Mediator-assoziierte Symptome.

Zur Diagnose einer SSM müssen hingegen zwei Befunde aus der Gruppe der „B-findings“ vorliegen:

- Mastzell-Infiltrat im KM >30 % und/oder Serumtryptase >200 ng/ml
- Myelodysplasie und/oder Myeloproliferation im KM
- Organomegalie und/oder Lymphadenopathie

Eine weitere Besonderheit der SM ist das häufige Vorliegen einer AHN. Hierbei kommen vor allem hämatologische Erkrankungen der myeloischen Reihe vor, am häufigsten die chronische myelomonozytäre Leukämie (CMML), weiterhin MDS/MPNu, die CEL und das MDS.

Tabelle 2: Diagnosekriterien der systemischen Mastozytose nach WHO

Hauptkriterium	- Histologischer Nachweis multifokaler, dichter Mastzellinfiltrate im KM oder in einem extramedullären Organsystem (≥ 15 MCs in Aggregaten)
Nebenkriterien	- Nachweis von ≥ 25 % spindelförmiger, atypischer oder unreifer MCs - Nachweis der <i>KIT</i> D816V Mutation - CD25 und/oder CD2 Expression der MCs - dauerhaft erhöhte Serumtryptase (> 20 ng/ml, nicht anzuwenden bei Vorliegen einer weiteren myeloischen Neoplasie)

Abkürzungen: KM, Knochenmark; MC, Mastzelle.

Eine ASM liegt hingegen vor, wenn zusätzlich zu den Diagnosekriterien *C-findings* vorliegen, die allgemein auf eine Organdysfunktion infolge der Mastozytose hinweisen:

- Zytopenie in einer oder mehreren Zellreihen (Neutrophile < $1 \times 10^9/l$, Hämoglobin < 10 g/dl oder Thrombozyten < $100 \times 10^9/l$)
- Leberfunktionsstörungen/Hepatomegalie mit erhöhten Leberwerten und/oder erhöhten Bilirubinwerten
- Splenomegalie mit Zeichen von Hypersplenismus
- portale Hypertension und/oder Aszites

- Hypalbuminämie
- Gewichtsverlust > 10 % des Körpergewichts in den letzten 6 Monaten

Mit dem Nachweis eines dieser genannten *C-findings* liegt eine ASM mit entsprechend schlechterer Prognose vor (Valent et al., 2010).

Eine MCL liegt definitionsgemäß dann vor, wenn im KM-Ausstrich mehr als 20 % der kernhaltigen Zellen atypische Mastzellen sind. Ein leukämischer Verlauf liegt zusätzlich dann vor, wenn im Blutausstrich ≥ 10 % aller kernhaltigen Zellen Mastzellen sind (Valent et al., 2014).

1.4.3 Therapie

Die Therapieregime zur Behandlung der SM sind aufgrund der großen Heterogenität der Subtypen sehr unterschiedlich und beinhalten neben abwartenden, supportiven Maßnahmen (*watch and wait*) verschiedene zytoreduktive Medikamente bis hin zur Polychemotherapie und allogenen Stammzelltransplantation (SZT) (Valent et al., 2017).

Tabelle 3 zeigt eine Zusammenstellung von etablierten *first-line* Therapien und neuen Substanzen, die als zweite Option oder zukünftiger Bestandteil der Standardregime in Frage kommen.

Die Therapieempfehlungen zur Behandlung der Subgruppen der Mastozytose basieren aufgrund der geringen Fallzahlen und des Fehlens von ausreichend aussagefähigen, kontrollierten Therapiestudien weiterhin auf Expertenmeinungen und internationalem Konsens.

Ab dem Vorliegen von *C-findings* werden zunehmend zytoreduktive Substanzen in der Therapie der SM empfohlen, hinzu kommen unter den neueren Therapieoptionen Multikinaseinhibitoren wie Midostaurin (PKC412), die neben dem KIT-Rezeptor auch andere Zielproteine neoplastischer Zellen binden können. Die allogene SZT stellt eine primär kurative Option für Patienten mit prognostisch ungünstigen Diagnosen oder bei Nichtansprechen des ersten Therapieversuchs dar.

Tabelle 3: Überblick über Therapieoptionen der systemischen Mastozytose

<i>Diagnose</i>	<i>Empfohlene „first-line“ Therapie</i>	<i>Neue Therapieoptionen</i>
ISM	Keine	Keine
SSM	Ggf. Cladribine	Ggf. Midostaurin
ISM-AHN	AHN-Therapie, ggf. SZT	Midostaurin, ggf. SZT
ASM-AHN	AHN-Therapie, ggf. SZT	AHN-Therapie + Midostaurin + SZT
ASM slow	IFN- α , Cladribine	Midostaurin, ggf. SZT
ASM rapid	Cladribine, Poly-CT, SZT	Midostaurin + Poly-CT + SZT
ASM-t	Cladribine, Poly-CT, SZT	Midostaurin + Poly-CT + SZT
cMCL	Cladribine, CT, Poly-CT	Midostaurin, CT + Midostaurin, ggf. SZT
aMCL	Poly-CT + SZT	Poly-CT + Midostaurin + SZT
MCS	Radiatio + Poly-CT	Poly-CT + Radiatio + SZT
ASM/MCL, Imatinib- sensibel	Imatinib	Masitinib, Midostaurin

Abkürzungen: ISM, indolente systemische Mastozytose; SSM, schwelende systemische Mastozytose; AHN, assoziierte hämatologische Neoplasie; ASM, aggressive systemische Mastozytose; slow, langsam progredient; rapid, rasch progredient; ASM-t, aggressive systemische Mastozytose in Transformation zur Mastzelleukämie; cMCL, chronische Mastzelleukämie; aMCL, akute Mastzelleukämie; MCS, Mastzellsarkom; SZT, Stammzelltransplantation; IFN- α , Interferon-alpha; CT, Chemotherapie. Tabelle nach Valent et al. (2017).

1.5 Molekulargenetik

Molekulargenetische Untersuchungen sind in der modernen Medizin im Allgemeinen und in der Hämatologie im Speziellen zum routinemäßigen Standard in der Diagnostik geworden. Nicht nur verändern bestimmte Mutationen oder Polymorphismen bei Erkrankungen den Verlauf und die Prognose und sind deswegen für den Arzt und den Patienten von Bedeutung, sondern einige molekulargenetische Veränderungen eignen sich auch als Ziele für eine Therapie,

die die Pathophysiologie der Erkrankung zur Grundlage ihres Wirkmechanismus macht (*targeted therapy*).

Bei der SM steht die D816V Mutation im *KIT*-Gen zunächst im Vordergrund, weil sie bei der großen Mehrheit dieser Patienten nachgewiesen werden kann. Hinzu kam in den letzten Jahren der Nachweis von häufigen somatischen Zusatzmutationen innerhalb der Gene *TET2*, *SRSF2*, *ASXL1* und *RUNX1*. Knapp 80 % der Patienten mit fortgeschrittener SM (ASM, SM-AHN oder MCL) sind multimutiert, haben also mindestens eine zusätzlich zu *KIT* D816V vorliegende weitere Mutation (Schwaab et al., 2013).

Die Gruppe der oben genannten Zusatzmutationen sowie weitere wie in *JAK2*, *CBL*, *RAS* und *IDH1* und *IDH2* konnten bereits zuvor bei Erkrankungen wie MDS, anderen MPN und MDS/MPN-Syndromen gefunden werden und sind dort z.T. mit einer signifikant schlechteren Prognose assoziiert (Meggendorfer et al., 2012; Guglielmelli et al., 2014; Haferlach et al., 2014).

1.6 Fragestellungen

Zusätzlich zur großen Heterogenität zwischen den verschiedenen Subtypen der Mastozytose generell ist auch der teilweise individuell sehr unterschiedliche Verlauf der Erkrankungen in den einzelnen Subtypen selbst auffällig. In den letzten Jahren konnten neben der *KIT* D816V Mutation auch eine Reihe von Zusatzmutationen bei SM-Patienten detektiert werden, bei denen ein signifikanter Einfluss auf die Prognose nachgewiesen werden konnte (Jawhar et al., 2015; Schwaab et al., 2013). Vor diesem Hintergrund sollten folgende Fragen in der vorliegenden Arbeit beantwortet werden:

- 1) Welche somatischen Zusatzmutationen lassen sich in welchen Kombinationen und mit welcher Häufigkeit nachweisen? Zeigen sich Assoziationen zwischen Diagnose und molekulargenetischem Status?
- 2) Welche klinischen und laborchemischen Parameter haben signifikanten Einfluss auf Verlauf und Prognose der systemischen Mastozytose?
- 3) Welche Genotypen sind unabhängige Risikofaktoren für ein verringertes Gesamtüberleben?

2 PATIENTEN, MATERIAL UND METHODEN

2.1 Patientenkollektiv

Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten 70 Proben stammen alle aus KM oder peripherem Blut (PB) von 70 Patienten mit nach aktuell gültigen WHO-Kriterien (2016) gesicherter SM. Die histologische Beurteilung bei der Diagnosestellung wurde von Referenzpathologen des European Competence Network on Mastocytosis (ECNM) durchgeführt.

Für die vorliegende Untersuchung wurden sowohl Patienten aus der III. Medizinischen Klinik der Universitätsmedizin Mannheim als auch Patienten von externen Einsendern eingeschlossen. Alle Patienten wurden über den Zweck der Forschungsarbeit informiert und haben im Rahmen der Aufnahme in das „Deutsche Register für Erkrankungen der Eosinophilen und Mastzellen“ ihr Einverständnis schriftlich erklärt.

2.2 Material

2.2.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller	Firmensitz
Axioskop 2	Zeiss	Oberkochen, D
Biofuge™	Heraeus	Hanau, D
Centrifuge 5404 R	Eppendorf	Hamburg, D
Centrifuge 5804 R	Eppendorf	Hamburg, D
Deckgläser für Objektträger	Marienfeld GmbH & Co.KG	Königshofen, D
Digital Vortex Mixer	VWR International GmbH	Darmstadt, D
Gelelektrophorese-Kammer	VWR International GmbH	Darmstadt, D
Laborfuge 400e	Heraeus	Hanau, D
LaminAir® Werkbank LB-48C	Heraeus	Hanau, D
Leucosep™ Röhrchen	Greiner Bio-One GmbH	Frickenhausen, 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 (Elektrophorese)	BioRad Laboratories GmbH	München, D
QIAcube	Qiagen	Hilden, D
Sterilwerkbank Herasafe KS	Thermo Fisher Scientific, Inc.	Waltham, USA
Thermocycler Mastercycler®	Eppendorf AG	Hamburg, D
Thermomixer compact (Heizblock)	Eppendorf	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
454 FLX Sequencer	Roche	Penzberg, D

2.2.2 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller	Firmensitz
Agarose	Biozym	Oldendorf, D
Ammoniumbicarbonat	Sigma-Aldrich	Gelenau, D
Ammoniumchlorid	Sigma-Aldrich	Gelenau, D
Colcemid (10 µg/ml)	Thermo Fisher Scientific, Inc.	Darmstadt, D
DAPI-Eindeckmedium	Vector Laboratories	Burlingame, USA
ddH ₂ O (Aqua ad iniectabilia)	B. Braun	Melsungen, D
DEPC	Sigma-Aldrich	Gelenau, D
EDTA	Sigma-Aldrich	Gelenau, D
Essigsäure (100 %)	Merck Biosciences KGaA	Darmstadt, D
Ethanol absolut	VWR International GmbH	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
Natriumcitrat	Sigma-Aldrich	Gelenau, D
PBS-Tabletten	Sigma-Aldrich	Gelenau, D
Penicillin/Streptomycin	Thermo Fisher Scientific, Inc.	Darmstadt, D
RNasin®	Promega	Mannheim, D
rubber cement	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
TRIzol®, gebrauchsfertig	Thermo Fisher Scientific, Inc.	Darmstadt, D
Tween® 20	Sigma-Aldrich	Gelenau, D

2.2.3 Lösungen

Lösung / Pufferlösung	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

2.2.4 Enzyme

Enzym	Hersteller	Firmensitz
Reverse Transkriptase	Thermo Fisher Scientific, Inc.	Darmstadt, D
Taq DNA Polymerase, (5 U/ μ L)	Thermo Fisher Scientific, Inc.	Darmstadt, D
DNase	Stemcell Technologies	Köln, D

2.2.5 Gebrauchsfertige Reaktionssysteme

Enzym	Hersteller	Firmensitz
REPLI-g Mini Kit	Qiagen	Hilden, D
Maxwell® 16 LEV simplyRNA Blood Kit	Promega	Mannheim, D
QIAamp DNA Blood Mini Kit	Qiagen	Hilden, D

2.2.6 Software

Software	Firma	Firmensitz
LightCycler™ Systems	Roche Diagnostics	Mannheim, D
Microsoft® Office™ 2016	Microsoft	Washington, USA
SPSS Statistics 23	IBM	Armonk, USA
SAS 9.2	SAS Institute	Cary, 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

2.2.7 FISH-Sonden

Sonde	Hersteller	Firmensitz
XL 5q33	MetaSystems	Altlussheim, D
XL FGFR1 BA	MetaSystems	Altlussheim, D
XL 4q12	MetaSystems	Altlussheim, D
XL t(8;14)	MetaSystems	Altlussheim, D

2.2.8 Primer für die Polymerase-Kettenreaktionen

Primer	Sequenz von 5`-3`
CK16F4	TGGCTTTCCTCGCCTCCAAG
CK17FM	TTGTGATTTTGGTCTAGCCAGGGT
CK20R	ATCTGCATCCCAGCAAGTCTTC

KIT 2F	CAGCCAGAAATATCCTCCTTACT
KIT1Bmod	CAGGATTTACATTATGAAAATCACAGG
KIT AR F1	GGA ACTCTGTGAAAGGACATTCA
KIT AR R2	TGACTGCTAAAATGTGTGATATCCC
KIT AR F2	GTGAACATCATTCAAGGCGTACT
KIT ARMS F	TGTGATTTTGGTCTAGCCAGAGT

2.3 Methoden

2.3.1 Erythrozytenlyse und Leukozytenisolation in Vollblut oder Knochenmark

Zu Beginn der Weiterverarbeitung einer Probe aus EDTA-Vollblut oder Heparin-Knochenmark stand die Lyse der Erythrozyten, um mit der Leukozytenfraktion der jeweiligen Probe weiter verfahren zu können. Der Erythrozytenlyse liegt zugrunde, dass die osmotische Resistenz der Leukozyten größer ist als die der kernlosen und mit einem schwächeren Zytoskelett ausgestatteten Erythrozyten. Durch Auffüllen der in ein Falcon-Röhrchen überführten Probe mit 1x Lysepuffer auf 45 ml, 10 min Inkubation auf Eis und anschließender Zentrifugation bei 453 g und 4 °C konnte der hellrot-flüssige Überstand der lytischen Erythrozyten vom weißlichen, kompakten Pellet der Leukozyten abgehoben werden. Bei Bedarf wurde die Zentrifugation bis zum Absetzen eines Pellets ohne Erythrozytenreste wiederholt.

Danach wurde das Leukozytenpellet mit 25 ml 1x PBS-Lösung und nochmaliger Zentrifugation bei 453 g und 4 °C für 5 min gewaschen. Nach Abheben und Verwerfen des Überstandes verblieb das Leukozytenpellet bis zur weiteren Verarbeitung auf Eis.

2.3.2 RNA-Isolation

Die Extraktion der RNA aus den zuvor isolierten Leukozyten gelang entweder mit Hilfe von Maxwell® oder der TRIzol® Methode.

RNA-Isolierung mittels Maxwell®

Aus dem gebrauchsfertigen Maxwell® simplyRNA Blood Kit wurden 200 µl Homogenisierungspuffer mit 2×10^7 Zellen für 30 s gevortext. Nach dem Aufschließen der Zellen durch mehrmaliges Aufziehen in eine Spritze (2 ml, 0,9 mm Kanüle) wurde der Ansatz mit 200 µl Lysispuffer und 25 µl Proteinase K aus dem Kit vermischt, erneut gevortext und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die

Kartuschen wurden entsprechend dem Protokoll des Herstellers mit DNase und Lysat vorbereitet, das Gerät daraufhin mit den Proben gestartet. Maxwell® arbeitet mit aufeinanderfolgenden Bindungen und Freisetzungen von paramagnetischen Partikeln in den Wells, die die Nukleinsäuren in den Reagenzkartuschen automatisiert extrahieren.

RNA-Isolation mittels TRIzol®

Die Extraktion der RNA mit TRIzol® Lösung gelingt durch das Prinzip der Phasentrennung. Als Lösung aus Guanidinisothiocyanat, Chloroform und Phenol vermag TRIzol® sowohl DNA, RNA als auch Proteine in verschiedenen Phasen zu lösen, die sich nach Zentrifugation als sichtlich unterscheidbare Schichten absetzen. Das enthaltene Guanidinisothiocyanat wirkt als Lysator und inaktiviert für den Prozess hinderliche Enzyme wie RNAsen.

Zunächst wurden 1×10^7 Zellen aus dem in Punkt 2.3.1 gewonnenen Leukozytenpellet mit 1 ml TRIzol® Lösung für 10 min bei 37 °C gemischt, bevor sie in einem zweiten Schritt mit 200 µl Chloroform gevortext und zentrifugiert wurden. Nun wurde die organische Phase, in der sich vor allem die Proteine gelöst haben, verworfen und der Überstand, in dem die RNA gelöst ist, in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Nochmals wurden 200 µl Chloroform hinzugegeben und im Anschluss unter Hinzugabe von 0,5 ml eiskaltem 100 % EtOH die RNA gefällt. Nach Inkubation bei -20 °C für 30 min und erneuter Zentrifugation wurde das RNA-Pellet mit 1 ml EtOH (75 %) gewaschen, bevor es getrocknet und mit RNase-freiem Wasser bei -20 °C gelagert werden konnte.

2.3.3 DNA-Isolation

Die Isolierung der genomischen DNA wurde mit Hilfe des QIAcube Systems realisiert. Zunächst wurden dem Schritt 2.3.1 folgend 1×10^7 Leukozyten mit 400 µl GIT/β-Mercaptoethanol-Puffer gemischt und durch mehrfaches Aufziehen und Ablassen durch eine Kanüle (2 ml Spritze; Kanüle 0,9 x 40 mm) mechanisch aufgetrennt. Weiter konnte nun nach dem Herstellerprotokoll des QIAcube verfahren werden, welches vollautomatisch die zur Extraktion der DNA notwendigen Schritte durchführte.

Zum Ende der Verarbeitung wurden die Eppendorf-Gefäße mit hochreiner DNA entweder unmittelbar weiterverarbeitet oder bei 4 °C gelagert.

2.3.4 DNA-Amplifikation

Zur Amplifikation des gesamten Genoms (WGA) wurde das REPLI-g® Mini Kit der Firma Qiagen verwendet.

Die Amplifikation vermehrt die in den 50-100 Zellen nur in geringer Konzentration vorhandene DNA mittels *multi-displacement amplification* (MDA), die gegenüber einer regulären Polymerase-Kettenreaktion den Vorteil einer geringeren Fehlerrate hat und zudem keine amplifikationsbedingte Verzerrung (*amplification bias*) verursacht (Hosono et al., 2003). Zunächst wurden durch Zugabe von Pufferlösung auf die Suspension die Zellbestandteile lysiert und die DNA denaturiert. Das Hinzufügen von Neutralisationspuffer beendete diesen Prozess, im darauffolgend hinzugegebenen „Master Mix“ waren nun die für die MDA spezifisch benötigte DNA-Polymerase sowie eine weitere für die Kettenreaktion erforderliche Pufferlösung mit *random primer* und dNTPs enthalten. Die Reaktion läuft im Gegensatz zur herkömmlichen PCR isotherm ab, weswegen im folgenden Schritt die Proben über 10 h bei 30 °C im Thermocycler inkubiert wurden. Die 3' – 5' Exonuclease-Aktivität der Polymerase sichert hierbei zusätzlich eine hohe Replikationsqualität des PCR Produktes.

Nach Abschluss des Replikationszyklus wurde die Probe für 3 min auf 65 °C erhitzt, um die DNA-Polymerase zu inaktivieren und danach bei 4 °C bis zur unmittelbaren Weiterverarbeitung gekühlt oder bei -20 °C für spätere Versuche eingefroren.

2.3.5 Qualitätskontrolle der Ribonukleinsäureproben

Um eine ausreichende Reinheit der DNA-Proben nach der Amplifikation und der in der Extraktion gewonnenen RNA sicherzustellen, wurde die Nukleinsäurekonzentrationen in allen Proben mittels Photospektrometer (Nanodrop®) ermittelt. Das Gerät und die zugehörige Software ermitteln die Absorption von Licht durch die aufgebrauchte Probenflüssigkeit im Ultraviolett-Bereich (260 nm / 280 nm), um den Reinheitsgrad und eventuelle Verunreinigungen vor allem durch Proteine feststellen zu können. Die Extinktionen wurden hierfür gegen einen Nullwert mit Wasser gemessen. Die photospektrometrisch ermittelten Werte der Extinktion (E) bei 260 nm und 280 nm ergeben einen Quotienten ($E_{260\text{nm}} / E_{280\text{nm}}$), der für eine ausreichende Reinheit der Proben-DNA zwischen 1,6 und 1,8 liegen sollte. Bei den RNA-Proben galten Quotienten zwischen 1,8 und 2,2 als Indikator für eine ausreichende Reinheit.

2.3.6 Synthese von cDNA

Um die zuvor extrahierten RNA-Proben mit Hilfe einer PCR vervielfältigen und schließlich quantifizieren zu können, wurde zunächst aus der gewonnenen RNA eine komplementäre DNA synthetisiert. Hierbei wird die im Einzelstrang vorliegende RNA durch reverse Transkription in cDNA übersetzt, die dann weiterverwendet werden kann.

Hierfür wurden die RNA-Proben nach 10 min Inkubation bei 65 °C und 3 min Abkühlung auf Eis mit dem in 2.2.3 beschriebenen cDNA-Mix erneut bei 37 °C für 2 h inkubiert, der unter anderem Pufferlösung, dNTPs, Primer und das reverse-Transkriptase-Enzym enthält. Die Terminierung der Reaktion erfolgt durch Erhitzen auf 65 °C für 5 min. Die synthetisierte cDNA wurde zur späteren Weiterverarbeitung bei -20 °C eingefroren oder direkt verwendet.

2.3.7 Qualitative Polymerase-Kettenreaktion

Wie die DNA-Amplifikation beruht auch die qualitative Polymerase-Kettenreaktion (PCR) auf der Vervielfältigung von in der Probe vorhandener Doppelstrang-DNA durch ein Polymerase-Enzym. Dieses von der Arbeitsgruppe um den US-amerikanischen Biochemiker Kary B. Mullis (Nobelpreis für Chemie 1993) erfundene und erstmals im Jahre 1985 publizierte Verfahren (Saiki et al., 1985) benutzt die vorhandene, im ersten Schritt durch Hitze (95 °C) denaturierte und dann im Einzelstrang vorliegende DNA als Vorlage (*template*). An diese Matrize hybridisieren bei bestimmten, niedrigeren Temperaturen spezifische Primer, die den zu vervielfältigenden Genabschnitt flankieren. Die *annealing*-oder Hybridisierungstemperatur der Primer ist dabei von der genauen Basenzusammensetzung der Primer abhängig und liegt in der Regel zwischen 45 °C und 65 °C. Das Erstellen der Primer setzt weiterhin voraus, dass die Basensequenz des zu untersuchenden Genbereichs bekannt ist. Nach Denaturierung und Primerhybridisierung folgt im dritten Schritt bei 72 °C der Elongationsprozess, bei dem eine üblicherweise aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* gewonnene Taq-Polymerase den Matrizenstrang in 3'OH → 5'OH Richtung liest und den komplementären Gegenstrang dabei synthetisiert. Hierzu müssen stets ausreichend Nukleosidtriphosphate vorhanden sein, um in den entstehenden DNA-Strang eingebaut werden zu können. Die Zahl der replizierten DNA-Fragmente steigt

mit jedem Zyklus exponentiell, ein PCR-Versuch besteht in der Regel aus circa 30 automatisch nacheinander ablaufenden Zyklen.

Für die Analyse des Mutationsstatus des in dieser Arbeit untersuchten *KIT*-Genabschnitts in den Proben wurde in einigen Fällen eine spezielle zweischrittige Form der PCR verwendet, die *nested-PCR* (engl. für geschachtelte PCR). Dabei wird mit der ersten PCR (*Step 1*) ein Genabschnitt um den zu untersuchenden Bereich vervielfältigt, der dem Primerpaar der zweiten, darauf folgenden PCR (*Step 2*) als Matrize dient. Die Primer des zweiten Schrittes binden *downstream*, also innerhalb des bereits im ersten Schritt synthetisierten Abschnittes, was die Sensitivität und Spezifität des Verfahrens erhöht und auch nur gering vorhandene Mengen von Gensequenzen durch die allelspezifische Amplifizierung nachweisen kann, verglichen mit der einschrittigen, konventionellen PCR.

Tabelle 4: Komponenten und Mixe der qualitativen, ein-und zweischrittigen PCR

Komponente [Konzentration]	Step 1	Step 2
H ₂ O	37 µl	33,5 µl
10 x PCR Puffer	5 µl	5 µl
MgCl ₂ [50 mM]	3 µl	3 µl
dNTPs [25 mM je dNTP]	1 µl	1 µl
Primer AR F1 [10 µM]	0,5 µl	
Primer AR R2 [10 µM]	0,5 µl	
Primer AR F2 [10 µM]		0,5 µl
Primer ARMS F [10 µM]		0,5 µl
Primer 1Bmod [10 µM]		0,5 µl
Taq-Polymerase [5 U/µl]	1 µl	1 µl
Probe	2 µl	5 µl
<i>Gesamtvolumen</i>	<i>50 µl</i>	<i>50 µl</i>

Die anderen Mutationen wurden qualitativ mittels einschrittiger, konventioneller PCR oder Sequenzierung nachgewiesen. In Tabelle 4 ist das Pipettierschema exemplarisch für die *KIT* D816V spezifische nested-PCR angegeben. Bei den übrigen, einschrittigen PCRs entfällt der Step 2. Nach Pipettieren der Komponenten

wie im Schema gezeigt durchliefen die Proben das aufgeführte PCR-Programm (Tabelle 5) im Thermocycler Mastercycler®.

Nach Abschluss der durch das Gerät automatisch durchgeführten Replikationszyklen wurden die Proben entweder direkt weiterverarbeitet oder bei 4 °C gekühlt aufbewahrt.

Tabelle 5: PCR-Programm der qualitativen PCR

Schritt	Temperatur	Dauer	Beschreibung
1	95 °C	2 min	primäre Denaturierung
2	95 °C	30 s	Denaturierung Zyklus
3	55 – 60 °C	30 s	Annealing mit primerspezifischer Temperatur
4	72 °C	2 min	Elongation Zyklus
5	72 °C	10 min	finale Elongation
6	4 °C		Kühlung bis zur Weiterverarbeitung

Die Schritte 2 bis 4 werden 25 – 30 mal wiederholt.

2.3.8 Quantitative Real Time PCR (qRT-PCR)

Das Grundprinzip der quantitativen RT-PCR entspricht dem der zuvor beschriebenen qualitativen PCR (s. 2.3.10), lediglich kann mittels dieses Verfahrens auch die Menge der in der amplifizierten Probe enthaltenen DNA/cDNA-Kopien bestimmt werden. Dies funktioniert über den Zusatz fluoreszenzmarkierter Sonden in den PCR-Mix, die an spezielle Bereiche zwischen den Primern binden. Das Fluoreszenzsignal nimmt so mit jedem Replikationszyklus zu und kann mit Hilfe parallel vervielfältigter Proben eines linearen Plasmids mit bekannter DNA-Kopienzahl ins Verhältnis gesetzt und bestimmt werden.

Für diese Arbeit wurde die qRT-PCR benutzt, um den Anteil der *KIT* D816V Mutation an allen *KIT*-Genkopien der Patienten zu quantifizieren. Die zuvor mittels Maxwell- oder Trizolaufbereitung aus zellulärer RNA generierte cDNA wurde dafür zusammen mit Plasmidverdünnungsstufen (2×10^6 bis 2×10^1) amplifiziert. Die Plasmide

enthalten ein ca. 800 bp langes Insert des *KIT*-Gens mit heterozygoter D816V Mutation. Hierdurch konnte hochsensitiv noch eine Zahl von 40 mutationstragenden Molekülen in der Probe nachgewiesen werden. Die Tabellen 6 und 7 geben Komponenten und Programm des vom LightCycler® ausgeführten Amplifikationsprozesses für die *KIT* D816V Mutation sowie den Wildtyp an.

Tabelle 6: Komponenten und PCR-Programm der quantitativen PCR zur Amplifizierung des *KIT* WT

Komponenten pro Probe (Konzentration)	PCR-Programm
10 µl H ₂ O	<ol style="list-style-type: none"> 1. 10 min 95 °C Denaturierung 2. 10 s 95 °C Denaturierung 3. 10 s 60 °C Primer Annealing 4. 26 s 72 °C Elongation 5. 30 s 40 °C Cool down <p>Die Schritte 2 bis 4 werden 45-mal wiederholt.</p>
1 µl Primer CK16F4 [10 µM]	
1 µl Primer CK20R1 [10 µM]	
1 µl UGD [2 U/µl]	
4 µl Mastermix (dNTPs, Taq-Polymerase, Puffer) aus LC Faststart Plus KIT	
0,57 µl Sondenmix aus CK18FL und CK18LC [je 20 pmol/µl]	

Tabelle 7: Komponenten und PCR-Programm der quantitativen PCR zur Amplifizierung der *KIT* D816V Mutation

Komponenten pro Probe (Konzentration)	PCR-Programm
10 µl H ₂ O	<ol style="list-style-type: none"> 1. 10 min 95 °C Denaturierung 2. 10 s 95 °C Denaturierung 3. 10 s 60 °C Primer Annealing 4. 26 s 72 °C Elongation 5. 30 s 40 °C Cool down <p>Die Schritte 2 bis 4 werden 45-mal wiederholt.</p>
1 µl Primer CK-MLC [10 µM]	
1 µl Primer CK20R1 [10 µM]	
1 µl UGD [2 U/µl]	
4 µl Mastermix (dNTP, Taq-Polymerase, Puffer) aus LC Faststart Plus KIT	
0,57 µl Sondenmix aus CK18FL und CK18LC [je 20 pmol/µl]	

Die Daten des LightCycler® Systems wurden zur Bestimmung der *KIT* D816V Allellast mittels des Quotienten $KIT\ D816V / KIT\ WT$ ins Verhältnis gesetzt (Erben et al., 2014).

2.3.9 Agarosegelelektrophorese

Zur Durchführung der Elektrophorese wird ein 2 % Agarosegel, welches einen DNA-Farbstoff (SYBR® Safe) enthält, in eine Kammer gegossen und diese mit 1 x TBE-Puffer gefüllt, bis das Gel vollständig bedeckt ist. 10 µl der PCR-Produkte werden nach Mischen mit 3 µl Ladepuffer ebenso auf das Gel aufgetragen wie ein 100-Basenpaarmarker. Die PCR-Produkte trennen sich nach Anlegen einer Spannung von 70-80 V ihrer Größe nach auf und können nach 45 min dann mittels Fluoreszenz fotografie im Molecular Imager® ChemiDoc™ und einem Bildbearbeitungsprogramm (Image Lab™) sichtbar gemacht werden. Durch den Basenpaarmarker kann zudem die Größe der aufgetrennten PCR-Produkte abgeschätzt werden.

2.3.10 Next-generation deep amplicon Sequenzierung

Die Analyse der untersuchten Proben hinsichtlich neben der *KIT* D816V Mutation vorhandener Zusatzmutationen erfolgte durch *next generation sequencing* (NGS) mittels des 454 FLX Amplicon Chemistry Systems wie zuvor beschrieben (Schwaab et al., 2013). Die vielen unterschiedlichen Methoden, die sich unter NGS subsumieren lassen, verbindet alle, dass beim NGS im Gegensatz zur herkömmlichen Sanger-Sequenzierung parallel bei Millionen von DNA-Bruchstücken eine Elongation stattfindet, die mittels Fluoreszenzbildgebung und Datenverarbeitung zu einer mehrfachen Bestimmung (*deep sequencing*) der Basenabfolge führt und die Methode so durch erhöhte Sequenziergeschwindigkeit und –genauigkeit eine neue Generation der molekulargenetischen Diagnostik begründet hat.

Grundsätzlich gliedert sich das verwendete NGS-Verfahren in vier Abschnitte. Zunächst werden bei der *library preparation* die DNA/cDNA-Kopien zufällig fragmentiert und an Oligonukleotid-Adapter sowohl am 3'-als auch am 5'-Ende gebunden. Im zweiten Schritt binden diese Adapter an ortsständige, an eine Oberfläche (*flow cell*) gebundene Oligonukleotide, die komplementär zur Adaptersequenz sind. Die DNA-Fragmente bilden hierdurch bei der sogenannten Brückenamplifikation räumlich geordnete, klonale DNA-Template Cluster und werden

in jedem Elongationszyklus Base für Base durch digitale Aufnahme der Cluster mittels fluoreszenzmarkierter Nukleotide sequenziert. Hierbei dienen die Wellenlänge des emittierten Lichts sowie die Intensität zur Identifikation der Base. Im letzten Schritt werden die gewonnenen Basenabfolgen (*reads*) mittels Informationstechnologie zusammengefügt. Es entsteht ein ganzer Streifen an mit NGS generierter DNA-Sequenz, bei dem jede Base typischerweise mehrere hundert Male bestimmt worden ist. Durch Vergleich mit einem im Verfahren generierten Referenzgenom können genetische Alterationen in den neuen *reads* entdeckt werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden bei den Proben die *mutational hot spots*, also die mutationstragenden Genloci, von 18 bei myeloischen Erkrankungen häufig mutierten Genen untersucht (Tabelle 8). Die Untersuchungen mittels NGS wurden im Münchner Leukämie Labor (MLL) durchgeführt.

Tabelle 8: Next Generation-sequenzierte Gene

Gen	sequenzierter Abschnitt (mutational hot spots)
<i>TET2</i>	gesamte kodierende Region
<i>CBL</i>	Exons 8 und 9
<i>IDH1</i>	Codon R132
<i>IDH2</i>	Codons R140 und R172
<i>KRAS</i>	Exons 2 und 3
<i>NRAS</i>	Exons 2 und 3
<i>U2AF1</i>	p.Ser34 und p.Gln154
<i>SRSF2</i>	Exon 1
<i>SF3B1</i>	Exons 11-16
<i>SETBP1</i>	Codons 800-935
<i>TP53</i>	Exons 3-9
<i>EZH2</i>	gesamte kodierende Region
<i>ETV6</i>	gesamte kodierende Region
<i>RUNX1</i>	gesamte kodierende Region
<i>ASXL1</i>	Exon 12
<i>JAK2</i>	Exons 12 und 14
<i>MLL-PTD</i>	Exons 2 bis 8
<i>NPM1</i>	Codon 280 bis Ende codierender Bereich

2.3.11 FISH

Die „Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung“ (FISH) und die Zytogenetik (s. 2.3.15) wurden verwendet, um chromosomale Aberrationen und Rearrangements im Genmaterial der untersuchten Patientenproben auszuschließen.

Mit Hilfe der FISH können Chromosomenaberrationen durch die Bindung fluoreszenzmarkierter DNA-Sonden an spezifische Bereiche der Proben-DNA mikroskopisch nachgewiesen werden. In einem ersten Schritt wurde die zu untersuchende Probe mit 10 µl der markierten FISH-Sonde auf einem Objektträger

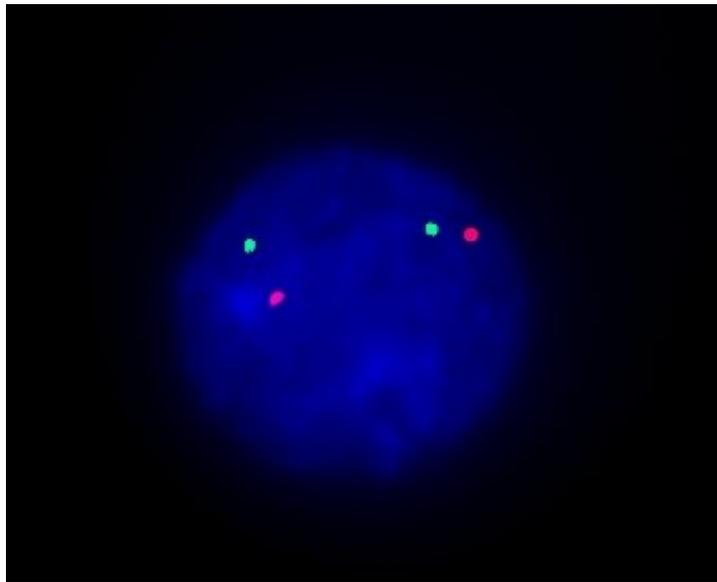


Abbildung 5: Normalbefund bei der FISH-Diagnostik mit Markierung von 5q33 und 5p15

Dargestellt sind ein mit DAPI gefärbter Zellkern, die roten Sonden binden an 5q33, die grünen Referenzsonden an 5p15.

vermischt, dieser mit Deckglas und *rubber cement* abgedichtet und zur Denaturierung für 2 min bei 75 °C inkubiert. Danach erfolgte im nächsten Schritt die Hybridisierung der Sonden an die entsprechenden Abschnitte der Proben-DNA über Nacht bei 37 °C. Nach Abschluss der Hybridisierung wurde die Probe für 2 min bei pH-Werten zwischen 7 und 7,5 mit 0,4 x SSC-Puffer bei 72 °C im Wasserbad inkubiert, um unspezifische Bindungen der Sonden zu verhindern, danach erneut mit 2x SSC Tween® 20 für 30 s bei Raumtemperatur. Ein letztes Mal wurde die Probe dann mit Aqua bidest. gewaschen, um eine Kristallbildung auf dem Objektträger zu vermeiden.

Nach dem Trocknen an der Luft wurde der Objektträger gedeckt, hierzu wurden 10 µl DAPI-Eindeckmedium auf die Probe pipettiert und ein Deckglas angebracht. Die Probe wurde nun entweder direkt mikroskopiert (vgl. Abbildung 5) oder unter Lichtabschluss bei 4 °C gelagert.

2.3.12 Zytogenetik

Zur Darstellung und Analyse der Chromosomen wurden zunächst 1-3 ml KM in 10 ml RPMI-1640 mit Zusatz von 2 % L-Glutamin (200 nM), 10 % FKS und 1 % Penicillin/Streptomycin überführt und für 24 h bei 37 °C inkubiert. Hiernach erfolgte die Zugabe von 0,6 – 0,7 µg Colcemid, welches als Spindelgift die Polymerisation des zellulären Mikrotubulsystems hemmt und somit die Ausbildung der Mitosespindel verhindert. Dadurch kann die in der Metaphase der Mitose stattfindende Chromosomentrennung nicht beendet werden, die Metaphasechromosomen werden unter dem Mikroskop sichtbar. Die Probe wurde nach Zugabe des Colcemids für 30 min bis 2 h bei 37 °C inkubiert und im Anschluss bei 1200 rpm für 10 min zentrifugiert.

Nach Abnahme des überständigen Mediums von dem Zellsediment wurden diesem 10 ml einer warmen hypotonen KCl-Lösung (KCl 75 mmol/l) hinzugegeben und wiederum 16 min bei 37 °C inkubiert. Die hypotone Lösung bewirkt eine hydropische Schwellung der Zellen durch Influx von H₂O ins Cytoplasma.

Danach wurde die Probe zentrifugiert, der Überstand verworfen und die sedimentierten Zellen unter langsamer Zugabe eines eiskalten Methanol/Eisessig-Gemischs (Verhältnis 3:1) fixiert.

Nach 1 h Fixierungszeit und zwei Waschschritten wurde das in 0,5 – 2 ml Fixativgemisch aufgenommene Pellet nun auf einen mit Ethanol (100 %ig) gereinigten Objektträger aufgetropft. Durch Tropfen aus einer Höhe von ca. 30 – 50 cm platzen die zuvor geschwellenen und fixierten Zellen auf, und die zu analysierenden Metaphasechromosomen liegen frei vor. Diese fixieren auf dem Objektträger nach Trocknung und erneuter Inkubation mit 2 x SSC-Puffer für 12 – 16 h bei 60 °C im Wasserbad und konnten dann im nächsten Schritt gefärbt werden.

Die für die Färbung verwendete Giemsa-Lösung (8 ml) wurde dafür mit 100 ml einer Phosphatpuffer-Lösung (1:9 in ddH₂O verdünnt) gemischt und die Objektträger mit den Chromosomen für 2 – 3 min in dieser Lösung gefärbt. Das Auswaschen erfolgte

mit Aqua bidest., daraufhin konnten die Proben unter dem Axioskop Fluoreszenzmikroskop im Phasenkontrast mikroskopiert und mittels der *Ikaros* Software analysiert werden.

2.3.13 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der klinischen, laborchemischen und molekulargenetischen Informationen gelang unter Zuhilfenahme der Statistiksoftwares SPSS und SAS. Zum Vergleich der Mittelwerte und Parameter der verschiedenen Messwerte wurden unterschiedliche mathematische Verfahren angewandt, um den differierenden Skalenniveaus und Hypothesenkonstellationen gerecht zu werden.

Kontinuierliche Variablen und Mediane von Verteilungen wurden mit dem Jonckheere-Terpstra-Test verglichen. Dieser nicht-parametrische Test ist eine Verallgemeinerung von Wilcoxon's Rangsummentest (U-Test nach Mann/Whitney) und vergleicht im Rahmen einer Varianzanalyse die Wahrscheinlichkeit des Zutreffens einer Alternativhypothese, dass sich zwei unabhängige Stichproben in Bezug auf eine ordinalskalierte Variable unterscheiden (Büning and Trenkler, 1998). In der vorliegenden Arbeit wurde hiermit der Einfluss der Anzahl mutierter Gene im S/A/R-Panel (unabhängige Variable) auf kontinuierlich ausgeprägte, abhängige Parameter (bspw. Albumin i.S., Trypsin i.S. etc.) auf Signifikanz getestet.

Zur Analyse kategorialer Variablen wurde hingegen der Cochran-Armitage Test benutzt. Dieser vermag als Erweiterung des Pearson χ^2 -Test einen vermuteten Trend der Korrelation einer kategorialen Expositionsvariable ($x_1 - x_j$) mit einer binär ausgeprägten zweiten Variable zu untersuchen (Buonaccorsi et al., 2014). In der vorliegenden Arbeit wurde dabei vor allem der Einfluss der Anzahl mutierter Gene im S/A/R-Panel (unabhängige Variable) auf binär ausgeprägte abhängige Variablen (bspw. Organomegalie, Hb < 10 g/dl etc.) evaluiert.

Der exakte Fisher-Test (Fisher-Yates-Test) wurde verwendet, um die Signifikanz gleichzeitig auftretender Mutationen zu ermitteln. Dieser Test kann die Unabhängigkeit von Merkmalen einer Kontingenztafel üblicherweise mit 2 x 2 oder sogar mehr Parametern beurteilen und ist eine Alternative zum Pearson χ^2 -Test.

Die Analyse des *overall survival* (OS) erfolgte mittels der Kaplan-Meier-Methode. Die Überlebenszeit wurde definiert als Differenz des Zeitpunkts der Erstdiagnose und

dem Todeszeitpunkt oder dem Zeitpunkt des letzten Kontakts. Die mit der Methode berechneten Schätzer wurden weiter mit dem log-rank Test hinsichtlich ihrer signifikanten Unterschiedlichkeit verglichen. Dieser eignet sich für Kaplan-Meier Kurven, da er nicht-parametrisch ist und auch rechtszensierte Datensätze in die Berechnung eingeschlossen werden können, was für die Analyse von Überlebenszeitkurven wichtig ist.

Als weitere ereigniszeitanalytische Methode kam die Regression nach Cox für die multiple lineare Regression und Schätzung der *hazard ratios* (HRs) zum Einsatz.

Das Signifikanzlevel beim p-Test wurde, soweit nicht anders angegeben, auf 0.05 festgelegt.

3 ERGEBNISSE

3.1 Auswertung laborchemischer, klinischer und molekulargenetischer Charakteristika des Patientenkollektivs

Die Diagnosestellung bei allen 70 eingeschlossenen Patienten erfolgte nach den gültigen WHO-Diagnosekriterien von 2016. Alle Patienten erfüllten die Kriterien einer SM-AHN, bei 26 Patienten (37 %) konnte die Diagnose einer SM-AHN, bei 34 (49 %) einer ASM-AHN und bei 10 (14 %) die einer MCL-AHN gestellt werden.

3.1.1 Deskriptive Analyse krankheitsrelevanter Parameter

Die untersuchten Patienten waren im Median 70 Jahre alt (30-81 Jahre) und zu 67 % (47/70) männlichen Geschlechts. Die Diagnosekriterien der SM betreffend fand sich eine mediane KM-Infiltration in der Histologie von 30 % (5 – 95 %), diese lag in 36 % der Fälle (23/70) über 30 %. Die Bestimmung der Tryptase im Serum (i. S.) ergab einen medianen Wert von 172 ng/ μ l (13 – 951 μ g/l), bei medianen Albuminkonzentrationen i.S. von 36 g/l (22 – 47 g/l) und medianen Werten der alkalischen Phosphatase (AP) von 266 U/l (40-1028 U/l). Der *KIT* D816V „allele burden“ (AB) im PB der Patientenproben (Erben et al., 2014) wurde im Median mit 30 % (2-76 %) bestimmt, bei 33 von 65 Patienten (50 %) lag der bestimmte Quotient > 30 % (33/65).

Die mediane Hb-Konzentration wurde mit 11,2 g/dl (6,8-15,2 g/dl) bestimmt, neben den medianen Werten der Thrombozyten mit $114 \times 10^9/l$ (15-993 $\times 10^9/l$) und der Leukozyten mit $8,4 \times 10^9/l$ (1,8-123,5 $\times 10^9/l$). Eine Hepatomegalie mit Aszites konnte bei 47 % (28/59) der Patienten nachgewiesen werden, ansonsten fand sich an nicht-hämatologischen C-findings ein Gewichtsverlust > 10 % des Körpergewichts in den letzten 6 Monaten bei 41 % (23/56) der Patienten. Eine Hepatomegalie, Splenomegalie oder Lymphadenopathie fand sich bei 34 % (21/62) der Patienten.

Das mediane Gesamtüberleben lag bei 6,7 Jahren. Es verstarben 25 von 70 Patienten im Beobachtungszeitraum. Die 3-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit wurde mit 71 % berechnet.

Tabelle 9: Klinische und laborchemische Charakteristika sowie Überlebensdaten von 70 Patienten mit *KIT* D816V+ fortgeschrittener SM und Zusatzmutationen, aufgeteilt nach Abwesenheit (0) oder Vorhandensein von 1 oder ≥ 2 mutierten Genen im *SRSF2/ASXL1/RUNX1* (S/A/R) Genpanel

N	Variablen	Patienten ges. (n = 70)	0 mutierte Gene in S/A/R (n = 25, 36 %)	1 mutiertes Gen in S/A/R (n = 27, 39 %)	≥ 2 mutierte Gene in S/A/R (n = 18, 26 %)	P*
	Alter in Jahren, Median (Spannweite)	70 (30-81)	67 (48-76)	70 (30-81)	72 (57-81)	n.s.
	männlich, n (%)	47 (67)	14 (56)	19 (70)	14 (78)	.01
C-findings						
65	Hämoglobin, g/dL; Median (Spannweite)	11.2 (6.8-15.2)	12 (7.5-15.2)	10.9 (6.8-15.1)	11.2 (7.2-15)	n.s.
	< 10 g/dL, n (%)	20 (31)	5 (22)	8 (32)	7 (41)	.02
65	Thrombozyten, x 10 ⁹ /L; Median (Spannweite)	114 (15-993)	203 (29-993)	99 (26-287)	89 (15-500)	.007
	< 100 x 10 ⁹ /L, n (%)	29 (45)	6 (26)	12 (46)	11 (69)	.0002
59	Hepatomegalie mit Ascites, n (%)	28 (47)	4 (20)	14 (61)	10 (63)	< .0001
62	Alk. Phosphatase, U/L, Median (Spannweite)	266 (40-1028)	88 (50-743)	326 (64-756)	377 (40-1028)	.001
	> 150 U/L, n (%)	40 (65)	8 (36)	18 (75)	14 (82)	< .0001
56	Gewichtsverlust (> 10 % in den letzten 6 Monaten)	23 (41)	4 (22)	10 (43)	9 (60)	< .0001
62	Albumin i.S., g/L; Median (Spannweite)	36 (22-47)	40 (25-46)	35 (22-47)	33 (26-42)	.002
	< 35 g/L, n (%)	25 (40)	3 (15)	11 (50)	11 (73)	< .0001
64	Anzahl positiver C-findings:					
	0, n (%)	11 (17)	9 (39)	2 (8)	0 (0)	.001
	1, n (%)	18 (28)	6 (26)	8 (32)	4 (24)	n.s.
	2, n (%)	13 (20)	5 (22)	5 (20)	3 (18)	n.s.
	3, n (%)	22 (34)	2 (9)	10 (40)	10 (59)	< .0001
B-findings						
64	MC Infiltration in KM-Biopsie, %; Median (Spannweite)	30 (5-95)	15 (5-70)	30 (5-95)	30 (15-80)	.0004
	> 30 %, n (%)	23 (36)	4 (17)	12 (48)	7 (44)	.001
66	Tryptase i.S., µg/L; Median (Spannweite)	172 (13-951)	97 (13-708)	259 (30-925)	191 (14-951)	.02
	> 200 µg/L, n (%)	29 (44)	5 (20)	16 (59)	8 (44)	.001
62	Organomegalie, n (%)**	21 (34)	7 (29)	8 (36)	6 (38)	n.s.

Ergebnisse

Andere Befunde						
65	Leukozyten, x10 ⁹ /L; Median (Spannweite)	8.4 (1.8-123.5)	9.1 (3.0-27)	7.9 (1.8-17.8)	8.4 (3.0-123.5)	n.s.
65	Monozyten, x10 ⁹ /L; Median (Spannweite)	0.9 (0.03-5.4)	0.4 (0.03-5.1)	0.8 (0.08—5.4)	1.1 (0.1-2.6)	n.s.
	> 1 x 10 ⁹ /L, n (%)	29 (45)	7 (30)	11 (44)	11 (65)	.001
65	Eosinophile, x10 ⁹ /L; Median (Spannweite)	0.3 (0.01-100.5)	0.3 (0.01-16.4)	0.3 (0.01-8.0)	0.8 (0.01-100.5)	n.s.
	> 1 x 10 ⁹ /L, n (%)	20 (31)	7 (30)	6 (24)	7 (41)	.04
65	KIT D816V ⁺ AB im PB, %; Median (Spannweite)	30 (2-76)	7.4 (2-76)	30.2 (3-74)	36 (10-71)	.02
	> 30 %, n (%)	33 (50)	8 (32)	13 (48)	12 (67)	.02
Outcome-Parameter						
	Medianes OS, Jahre	6.7	nicht beobachtet	3.9	2.7	< .0001
	3-Jahres-Überleben, %	71	90	73	42	.002
	Todesfälle, n (%)	25 (36)	2 (8)	11 (41)	12 (67)	.0006

*Die angegebenen p-Werte beziehen sich auf die in Abschnitt 2.3.17 erläuterten Testverfahren für die unterschiedlichen Variablenausprägungen.

**Organomegalie umfasst Hepatomegalie, Splenomegalie oder Lymphadenopathie.

Abkürzungen: Alk., alkalische; OS, overall survival; n.s., nicht signifikant; AB, allele burden; KM, Knochenmark; PB, peripheres Blut; MC, Mastzelle; i.S., im Serum; KM, Knochenmark; n, Anzahl.

Quelle: modifiziert nach Jawhar et al. (2016b)

3.1.2 Häufigkeiten der Zusatzmutationen

Alle Patienten des untersuchten Kollektivs waren positiv für die *KIT* D816V Mutation und zeigten eine SM-AHN. Die diagnostizierte AHN war in 28 Fällen (40 %) ein MDS/MPNu, bei 21 Patienten (30 %) eine CMML, bei 9 Fällen (13 %) eine chronische Eosinophilenleukämie (CEL), bei 8 (11 %) eine AML und bei 4 (6 %) eine primäre Myelofibrose (PMF). Chromosomale Aberrationen oder molekulargenetische Rearrangierung konnten mit Hilfe der FISH und Zytogenetik bei allen untersuchten Patienten ausgeschlossen werden.

Unter den getesteten Zusatzmutationen konnte mit 47 % (33/70) am häufigsten eine Mutation im *TET2* Gen nachgewiesen werden, ferner mit einer Häufigkeit von 43 % (30/70) eine Mutation in *SRSF2*, danach folgten *ASXL1* (29 %, 20/70), *RUNX1* (23 %, 16/70), *JAK2* (16 %, 11/70), *N/KRAS* (14 %, 10/70), *CBL* (13 %, 9/70), *EZH2* (10 %, 7/70), mit jeweils 4 % (3/70) Mutationen in *IDH2*, *ETV6* und *U2AF1*, und *SF3B1* in jeweils 2 % (3/70) der Fälle. In einigen Genen konnte mehr als eine Mutation im untersuchten Gen nachgewiesen werden, dies war häufiger bei *TET2* als bei *ASXL1*, *RUNX1* und *CBL* der Fall. In insgesamt 60 % (42/70) der Fälle lagen neben der *KIT* D816V Mutation noch zwei oder mehr andere Mutationen vor, jedoch zeigte sich lediglich für die zusätzlich auftretenden Kombinationen von Alterationen in den Genen *TET2/SRSF2* ($p=0.007$) und *IDH2/SRSF2* ($p=0.003$) eine Signifikanz. Abbildung 6A zeigt die genaue Häufigkeitsverteilung der Mutationen.

3.1.3 Assoziationen SM-Subtyp und Zusatzmutationen

Nach Subtypen der Diagnose SM aufgeteilt, finden sich bei Patienten mit ISM-AHN in absteigender Häufigkeit vor allem Mutationen in den Genen *JAK2*, *TET2*, *RUNX1*, *CBL*, *EZH2*, *SRSF2*, *ASXL1*, *U2AF1*, *ETV6* und *SF3B1*. Bei Patienten mit diagnostizierter ASM-AHN fanden sich hingegen nach Häufigkeit geordnet vor allem Mutationen in *TET2*, *SRSF2*, *ASXL1*, *RUNX1*, *N/KRAS*, *CBL*, *EZH2*, *IDH2*, *JAK2* und *ETV6*. Bei Patienten mit MCL-AHN fanden sich in absteigender Reihenfolge Mutationen in *SRSF2*, *TET2*, *ASXL1*, *RUNX1*, *N/KRAS*, *CBL*, *JAK2* und *IDH2*.

Umgekehrt zeigten sich Mutationen in *TET2*, *SRSF2*, *ASXL1*, *IDH2* und *N/KRAS* vor allem bei ASM/MCL-AHN, wohingegen solche in *JAK2*, *ETV6*, *U2AF1*, *EZH2* und *SF3B1* deutlich mit ISM-AHN assoziiert waren.

Abbildung 6B zeigt die Verteilung der einzelnen Mutationen in den Diagnosesubgruppen.

3.2 Analyse von Einflussfaktoren auf klinische Endpunkte und Überlebenszeitkurven

Zur Identifizierung von Einflussfaktoren auf krankheitsrelevante Parameter und das Gesamtüberleben wurden verschiedene Regressionsanalysen durchgeführt, um neben der Größe der Effekte auch deren Signifikanz bestimmen zu können.

3.2.1 Einfluss von klinischen und hämatologischen Parametern auf das Gesamtüberleben

Unter den im Patientenkollektiv erhobenen klinischen und hämatologischen Werten zeigten einige in der univariaten Regressionsanalyse ein signifikant erhöhtes Sterberisiko über den Beobachtungszeitraum. Unter den B-findings ergaben sich für eine Mastzellinfiltration in der KM-Biopsie > 30 % eine HR von 3,3 [95 % Konfidenzintervall 1,4 – 8,2] und für eine Tryptase i.S. > 200 µg/l eine HR von ebenfalls 3,3 [1,4 – 7,7] mit zugehörigen p-Werten nach dem log-rank Test von $p = 0.006$ und $p = 0.004$.

Unter den in den C-findings zusammengefassten Kriterien fand sich für eine Hämoglobinkonzentration < 10 g/dl (HR 2,3 [1,0 – 5,1], $p = 0.04$), eine Hepatomegalie mit Aszites (HR 3,4 [1,4 – 8,3], $p = 0.005$), eine Erhöhung der AP > 150 U/l (HR 5,5 [2,0 – 15,4], $p = 0.0003$), einen Gewichtsverlust über 10 % des Körpergewichts in den letzten 6 Monaten (HR 2,8 [1,2 – 6,8], $p = 0.02$) und eine erniedrigte Albuminkonzentration i.S. von < 35 g/l (HR 2,5 [1,1 – 5,6], $p = 0.02$) jeweils ein signifikant erhöhtes Risiko im univariaten Verfahren. Ebenso ergab sich eine *KIT* D816V Mutationslast von > 30 % im PB als unabhängiger Risikofaktor mit einer HR von 2,3 [1,0 – 5,4], $p = 0.04$.

In der multivariaten Analyse hingegen, in der alle zuvor genannten unabhängigen Risikofaktoren aus der ersten Regression berücksichtigt wurden, blieben ein erhöhter

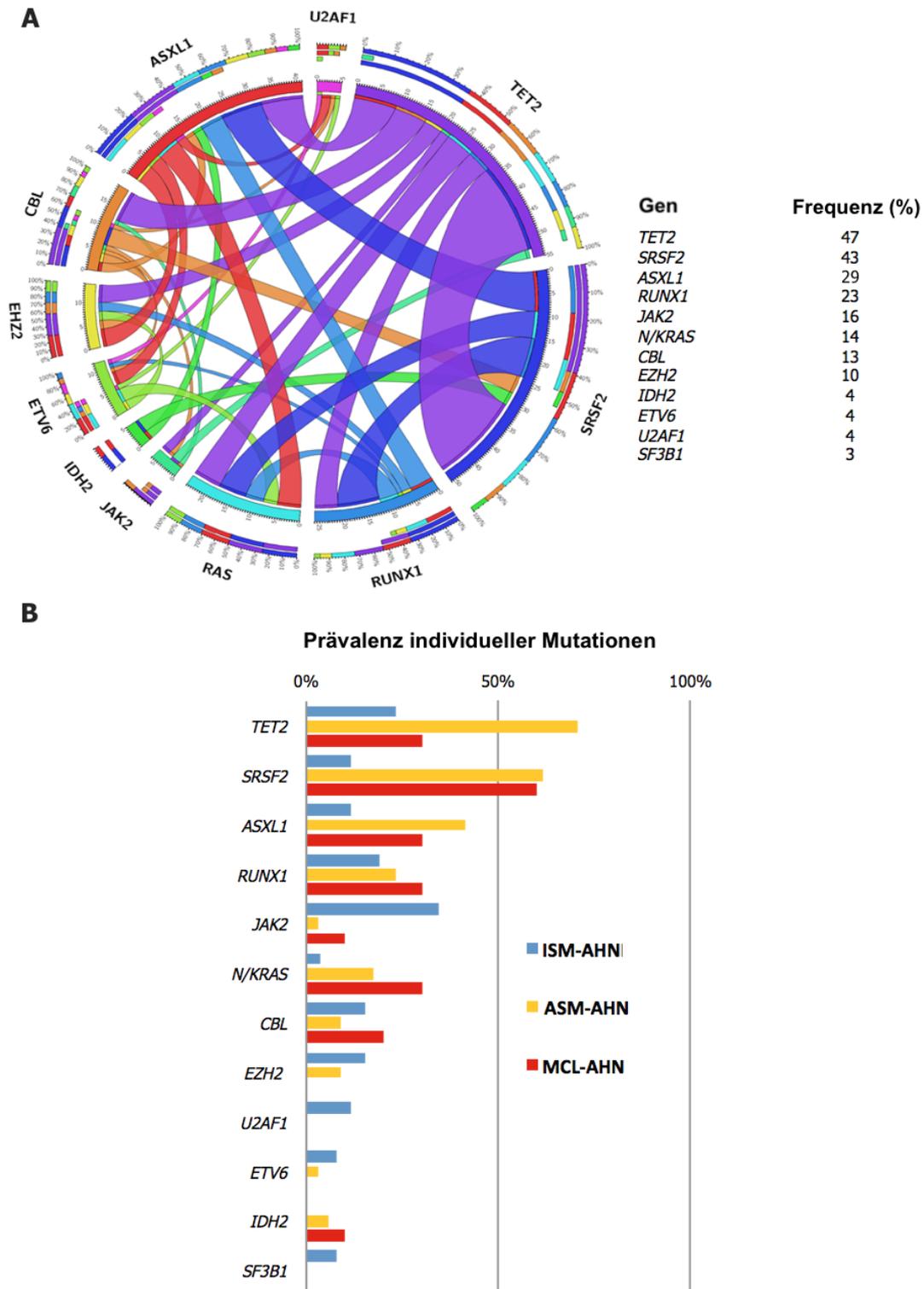


Abbildung 6: (A) Häufigkeit und Verteilung von Zusatzmutationen im untersuchten Patientenkollektiv dargestellt im Circos Diagramm (B) Prävalenz individueller Mutationsfrequenzen nach Subtypen der systemischen Mastozytose. Abbildung modifiziert nach Jawhar et al. (2016b)

Abbildung 6:

Abkürzungen: ISM, indolente systemische Mastozytose; ASM, aggressive systemische Mastozytose; MCL, Mastzelleukämie; AHN, assoziierte hämatologische Neoplasie.

Wert der AP i.S. von > 150 U/l (HR 4,9 [1,7 – 13,7], p = 0.003) und ein erhöhter Wert der Tryptase i.S. von > 200 µg/l (HR 3,6 [1,5 – 8,7], p = 0.005) als unabhängige Variablen mit prognostisch ungünstigem Effekt in der multiplen Regression.

3.2.2 Zusatzmutationen als unabhängige Risikofaktoren

Beim Blick auf den prognostischen Effekt von zusätzlich zur *KIT* D816V Mutation vorliegenden Mutationen ergaben sich im univariaten Modell zunächst signifikante Risikoerhöhungen für Mutationen in *SRSF2* (HR 5,9 [2,2 – 15,4], p < 0.0001) sowie *ASXL1* (HR 3,4 [1,5 – 7,7], p = 0.002) und *RUNX1* (HR 2,4 [1,1 -5,4], p = 0.03). Mutationen in *TET2*, *JAK2* und *N/KRAS* waren im Modell zwar mit einem ungünstigeren Outcome assoziiert, jedoch nicht signifikant (vgl. Tabelle 10 und Kaplan-Meier Kurven in Abbildung 7).

In der durchgeführten multivariaten Regressionsanalyse zeigten sich dann weiterhin *SRSF2* (HR 4,9 [1,9 – 12,9], p = 0.001) und *ASXL1* Mutationen (HR 2,6 [1,1 – 5,9], p = 0.03) als die am stärksten mit einer negativen Prognose korrelierten Genalterationen.

Tabelle 10: Ergebnisse der uni-und multivariaten Regression verschiedener klinischer, hämatologischer und molekulargenetischer Variablen auf das OS

	Univariates Modell		Multivariates Modell	
	HR [95 % KI]	P*	HR [95 % KI]	P*
Mutierte Gene				
<i>TET2</i>	1.6 [0.7-3.6]	n.s.		
<i>SRSF2</i>	5.9 [2.2-15.4]	< .0001	4.9 [1.9-12.9]	.001
<i>ASXL1</i>	3.4 [1.5-7.7]	.002	2.6 [1.1-5.9]	.03
<i>RUNX1</i>	2.4 [1.1-5.4]	.03		n.s.
<i>JAK2</i>	1.7 [0.8-3.8]	n.s.		
<i>N/KRAS</i>	1.4 [0.5-3.7]	n.s.		
<i>CBL</i>	0.9 [0.3-3.0]	n.s.		
Klinische / laborchemische Parameter				
Alter > 65 Jahre	2.4 [0.9-6.1]	n.s.		
C-findings				
Hämoglobin < 10 g/dL	2.3 [1.0-5.1]	.04		n.s.
Thrombozyten < 100 x 10 ⁹ /L	1.5 [0.7-3.5]	n.s.		
Hepatomegalie mit Ascites ²	3.4 [1.4-8.3]	.005		n.s.
Alkalische Phosphatase > 150 U/L	5.5 [2.0-15.4]	.0003	4.9 [1.7-13.7]	.003
Gewichtsverlust	2.8 [1.2-6.8]	.02		n.s.
Albumin i.S. < 35 g/L	2.5 [1.1-5.6]	.02		n.s.

B-findings			
MC Infiltration in KM-Biopsie > 30 %	3.3 [1.4-8.2]	.006	n.s.
Tryptase i.S. > 200 µg/L	3.3 [1.4-7.7]	.004	3.6 [1.5-8.7] .005
Organomegalie**	2.6 [0.9-6.9]	n.s.	
Andere Befunde			
<i>KIT</i> D816V AB im PB > 30 %	2.3 [1.0-5.4]	.04	n.s.
Monozyten > 1 x 10 ⁹ /L	1.7 [0.8-3.8]	n.s.	
Eosinophile > 1 x 10 ⁹ /L	1.4 [0.6-3.5]	n.s.	

*Die angegebenen p-Werte beziehen sich auf log-rank Tests.

**Organomegalie beinhaltet Hepatomegalie, Splenomegalie oder Lymphadenopathie.

Es werden hazard ratio (HR) und Konfidenzintervall (KI) angegeben.

Abkürzungen: OS, overall survival; n.s., nicht signifikant; KM, Knochenmark; i.S., im Serum; AB, alle burden; MC, Mastzelle; PB, peripheres Blut.

Quelle: modifiziert nach Jawhar et al. (2016b)

3.3 Prognostische Bedeutung von Mutationen im S/A/R Genpanel

In einem nächsten Schritt wurden die drei mit einer signifikant schlechteren Prognose assoziierten Mutationen in *SRSF2*, *ASXL1* und *RUNX1* in einem Panel (S/A/R Genpanel) zusammengefasst und der Effekt bestimmt, den die Anzahl mutierter Gene in diesem Panel (0 vs. 1 vs. ≥ 2) auf relevante Outcomeparameter hat.

Insgesamt fand sich bei 36 % (n = 25) der Patienten in der untersuchten Gruppe keine Mutation im S/A/R Genpanel, bei 39 % (n = 27) eine Mutation und bei 26 % (n = 18) fanden sich zwei oder mehr Mutationen.

3.3.1 Einfluss von Mutationen im S/A/R Genpanel auf klinische und hämatologische Parameter

Im Vergleich der Gruppen mit 0, 1 und ≥ 2 Mutationen im S/A/R Genpanel zeigten sich für viele krankheitsrelevante Parameter signifikant unterschiedliche Werte.

So fanden sich mit Zunahme der Anzahl der Mutationen im Panel häufiger Hämoglobinwerte < 10 g/dl, niedrigere mediane Thrombozytenzahlen, eine erhöhte Zahl an Patienten mit Hepatomegalie und Aszites, erhöhte mediane Werte der AP, häufiger ein signifikanter Gewichtsverlust sowie niedrigere mediane Albuminwerte i. S. Die Anzahl der C-findings war bei Patienten mit 3 Mutationen im S/A/R Genpanel signifikant höher als in den anderen Gruppen.

Zudem fand sich mit steigender Anzahl von Mutationen im Panel eine höhere prozentuale Mastzellinfiltration in der KM-Histologie sowie ein signifikant höherer

Anteil mit Infiltration > 30 %. Ebenso häufiger waren ein Tryptasewert i.S., Monozyten (> 1 x 10⁹/l) und Eosinophile (> 1 x 10⁹/l) erhöht.

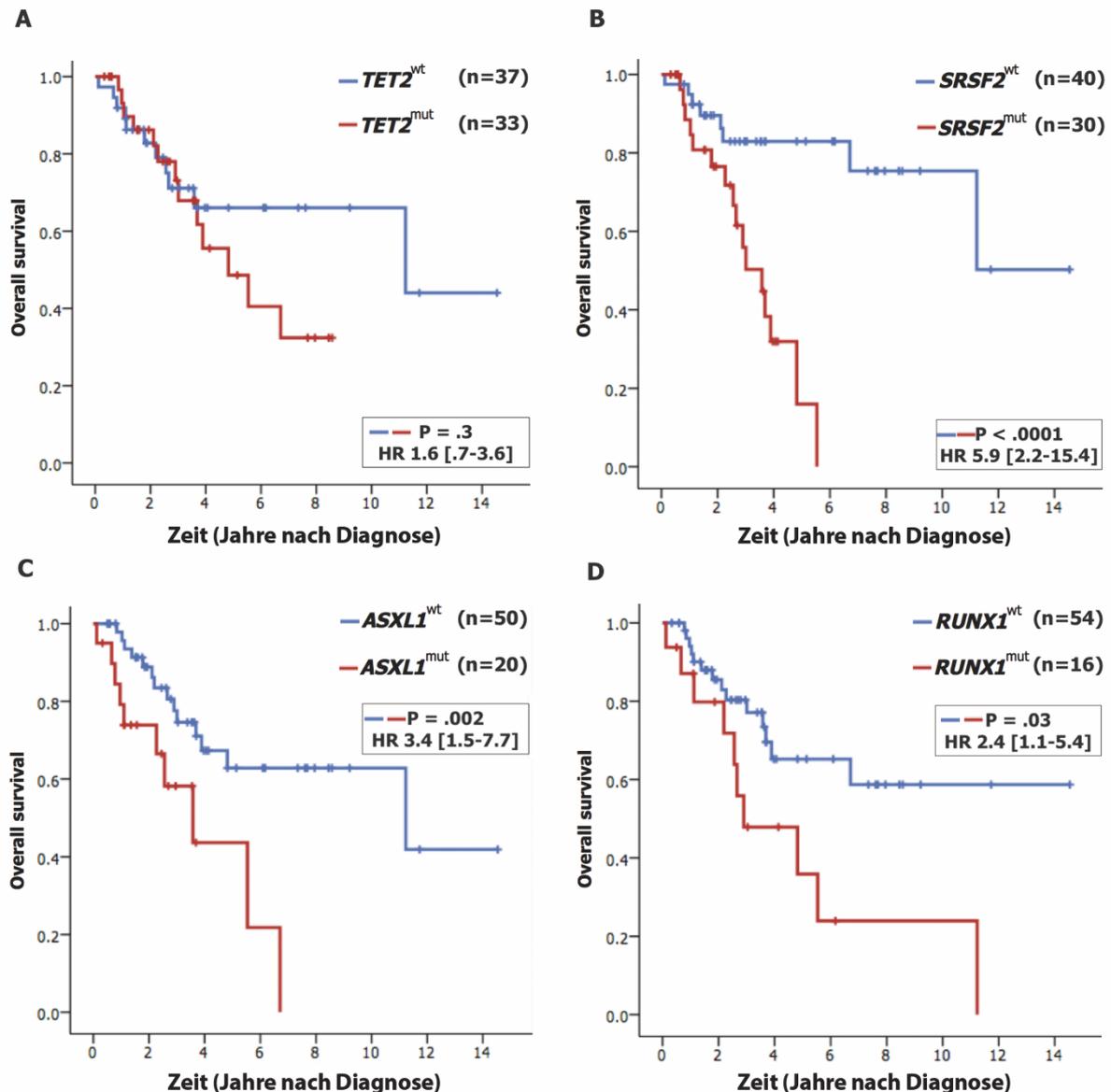


Abbildung 7: Kaplan-Meier Kurven der Überlebensdaten der Patienten in Abhängigkeit vom Mutationsstatus in (A) *TET2*, (B) *SRSF2*, (C) *ASXL1* und (D) *RUNX1*. Abbildung modifiziert nach Jawhar et al. (2016b)

Abkürzungen: wt, Wildtyp; mut, mutiert; HR, hazard ratio.

Die *KIT* D816V Mutationslast im PB, die als Marker der Krankheitsaktivität bereits untersucht wurde (Erben et al., 2014), war mit steigender Anzahl von Mutationen im untersuchten Panel signifikant häufiger im Median erhöht und ebenfalls die Häufigkeit von Befunden > 30 %. Eine genaue Auflistung aller klinischen und hämatologischen Variablen unterteilt nach Anzahl der Mutationen in S/A/R unter Angabe der p-Werte findet sich in Tabelle 9.

3.3.2 Einfluss von Mutationen im S/A/R Genpanel auf die Überlebenszeit

Die Anzahl der Mutationen im S/A/R Genpanel zeigte sich als unabhängiger Risikofaktor für eine verkürzte Gesamtüberlebenszeit.

So standen 3-Jahresüberlebensraten von 90 % in der Gruppe mit keiner S/A/R Mutation Überlebenswahrscheinlichkeiten von 73 % und 42 % in den Gruppen mit 1 oder ≥ 2 S/A/R Mutationen gegenüber. Diese Differenz war mit $p = 0.002$ signifikant. Die mediane Überlebenszeit in der Gruppe ohne Panelmutationen war ein Überleben über den Beobachtungszeitraum hinaus (6,7 Jahre im gesamten Kollektiv), 3,9 Jahre bei einer Panelmutation und 2,7 Jahre bei ≥ 2 Mutationen in S/A/R ($p < 0.0001$). Von den insgesamt beobachteten 25 Todesfällen im Beobachtungszeitraum entfielen 2 (8 %) auf die Subgruppe mit keinen S/A/R Mutationen, 11 (41 %) auf die mit 1 Mutation und 12 (67 %) auf die mit 2 oder mehr ($p = 0.0006$). Abbildung 8 zeigt die Überlebenszeitkurven für die einzelnen Subgruppen nach Anzahl der Mutationen im S/A/R Genpanel.

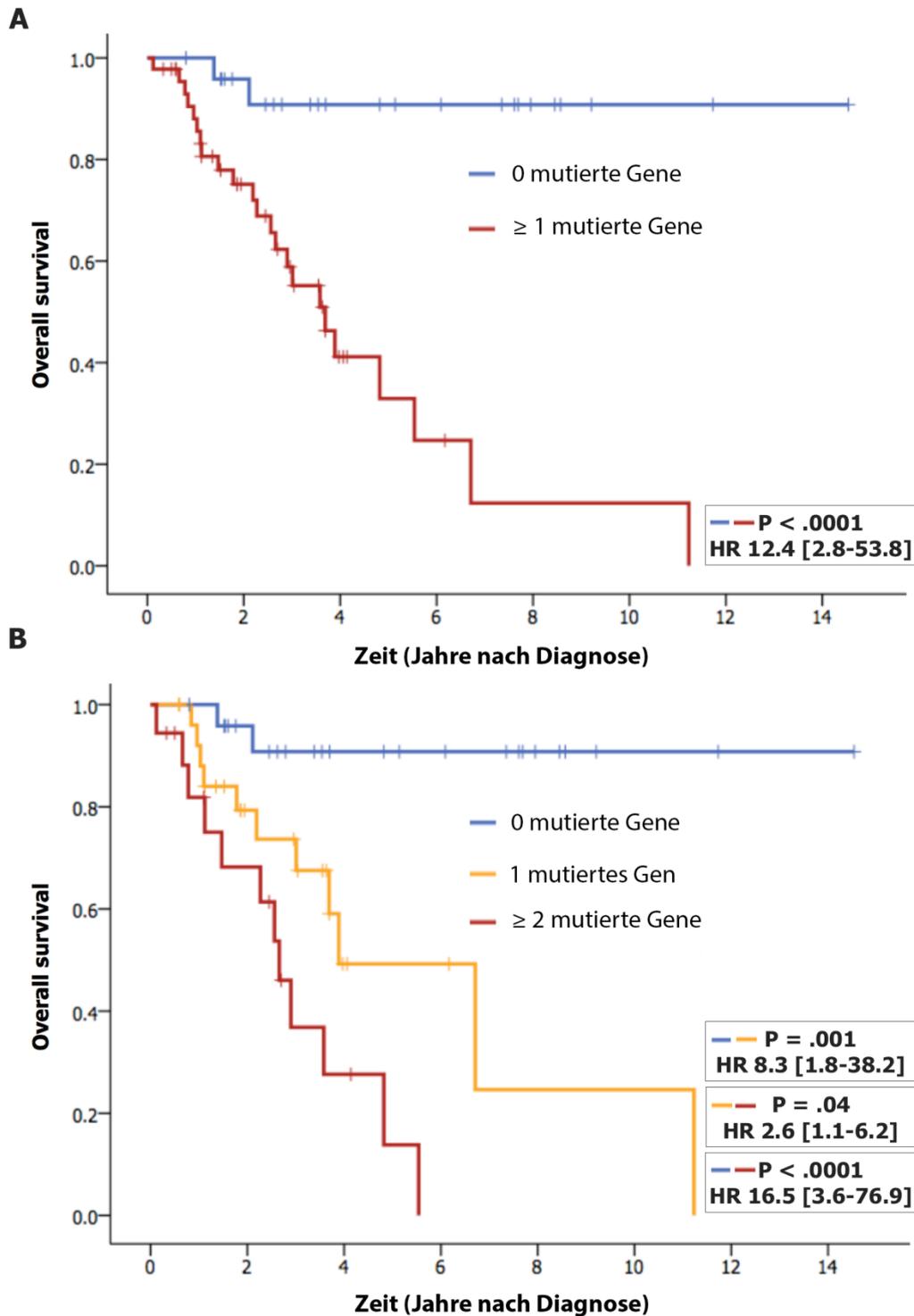


Abbildung 8: Kaplan-Meier Kurven der Überlebensdaten der Patienten in Abhängigkeit von der Anzahl der Mutationen im S/A/R Genpanel. (A) Vergleich der Überlebenszeiten mit 0 (blau) und ≥ 1 (rot) mutierten Panelgenen, (B) Vergleich der Gruppen mit 0 (blau), 1 (gelb) und ≥ 2 (rot) mutierten Panelgenen. Signifikanzen wurden paarweise nach der log-rank Methode errechnet. Neben der hazard ratio ist das 95 % Konfidenzintervall angegeben. Abbildung modifiziert nach Jawhar et al. (2016b)

Abkürzungen: HR, hazard ratio.

4 DISKUSSION

Die hämatologische Forschung hat in den letzten Jahren und Jahrzehnten durch die sich ständig und rapide weiterentwickelnden Methoden der molekulargenetischen Untersuchung einen Einblick in die komplexe Pathophysiologie verschiedenster Krankheitsentitäten erlangen können, der neben einem wichtigen Schritt in Richtung eines besseren Verständnisses vieler medizinisch und gesellschaftlich relevanter Krankheiten aber auch gezeigt hat, dass bisher gezogene Grenzen verschwimmen, neu gezogen werden müssen oder zumindest die genetische Charakterisierung einiger Entitäten nicht immer im Einklang mit dem klinischen Phänotyp zu stehen scheint.

Die Mastozytose ist vor diesem Hintergrund zum einen ein gutes Beispiel, da das Verständnis der Erkrankung seit ihrer Erstbeschreibung 1869 den Weg nahm von einer raren Unterform einer urtikariellen Hauterkrankung über die Erkenntnis der zellulären Grundlagen und der systemischen Bedeutung einiger ihrer Subtypen bis hin zur Detektion der genetischen Spezifika und der heutigen Einordnung als komplexe Erkrankung der pluripotenten Stammzellen des blutbildenden Systems. Das Verständnis der Mastozytose war somit immer eng verknüpft mit dem wissenschaftlich-technischen Stand der Forschung und bot seinerseits Ansatzpunkte für weitere Forschung und Therapie.

Zum anderen jedoch ist die Mastozytose eine sehr seltene myeloische Neoplasie, die sich zusätzlich durch eine große Heterogenität und Multikausalität auszeichnet. Durch geringe Fallzahlen, oft indolente Verläufe und eine immer noch geringe Bekanntheit unter behandelnden Ärzten der verschiedenen beteiligten Fächer muss generell von einer nicht unwesentlichen Zahl undiagnostizierter Fälle ausgegangen werden (Valent, 2015). Für die prognostisch und somit auch therapeutisch relevante Untergruppe der SM konnte eine Gruppe von Forschern in Dänemark kürzlich eine Inzidenz von knapp einer Neuerkrankung auf 1 Million Einwohner pro Jahr finden (Cohen et al., 2014). Somit sind die Bedingungen für ein umfassendes Verständnis der Pathophysiologie ungleich schwieriger als bei den großen Entitäten der myeloproliferativen Erkrankungen wie der chronischen myeloischen Leukämie (CML) oder dem MDS, die aufgrund ihrer großen Fallzahl und gesellschaftlichen Bedeutung stets früh und nach modernsten methodischen Standards erforscht werden.

Die genetische und klinische Komplexität der SM erschwert auch die Einordnung der Patienten in klar definierte Risikogruppen, die im Rahmen einer Stratifizierung zur Therapieplanung und auch aus epidemiologisch-wissenschaftlicher Perspektive wünschenswert wäre. Vor diesem Hintergrund sollte mit der vorliegenden Arbeit weiter erforscht werden, welche molekulargenetischen Muster sich bei *KIT* D816V⁺ SM bei welchen Subgruppen finden lassen und wie diese mit relevanten klinischen und prognostischen Markern assoziiert sind, um dann auf Basis etwaiger objektivierbarer Risikofaktoren einen weiteren Beitrag in Richtung molekulargenetisch unterstützter Stratifizierung für Verlauf und Therapie der SM zu leisten.

Seit 2012 besteht in der III. Medizinischen Klinik der Universitätsmedizin Mannheim ein „Register für Erkrankungen der Eosinophilen und Mastzellen“, welches deutschlandweit Fälle zusammenträgt und einer Auswertung zugänglich macht. Der Fokus liegt hierbei auf der Identifikation von Prognosemarkern aus den klinischen und laborchemischen Daten, jedoch auch auf der molekulargenetischen Analyse des Materials von externen Einsendern oder der Mannheimer Klinik. Ziel ist die zentralisierte Zusammenstellung von Krankheitsverläufen, um bessere Kriterien für Diagnose, Therapie und Prognose zu definieren und auch um neue Zielstrukturen für Therapeutika zu identifizieren. Derzeit umfasst das Register mehr als 500 Patienten und ist damit neben dem „European Competence Network on Mastocytosis“ (ECNM) eines der größten in Europa.

Aus diesem Patientenkollektiv wurden für diese Arbeit 70 Patienten gefiltert, für die alle zu untersuchenden Daten gleichermaßen verfügbar waren. Weiterhin umfasste die Auswahl an Patienten mit ASM/MCL und AHN einen Großteil (n = 44, 82 %) der zur Zeit der Arbeit im Register vorhandenen Fälle fortgeschrittener SM.

Die KM-Biopsien aller Patienten wurden durch Referenzpathologen des ECNM beurteilt. Unsere Arbeitsgruppe konnte zuvor zeigen, dass der Anteil der histologischen Fehldiagnosen bei pathologischer Begutachtung außerhalb eines Referenzzentrums beachtlich ist und deswegen bei Verdacht auf eine SM die Übersendung der KM-Biopsien an einen in der Diagnosestellung der Mastozytose erfahrenen Pathologen erfolgen sollte (Jawhar et al., 2016a).

Alle eingeschlossenen Patienten hatten eine AHN zusätzlich zur SM. Nachdem vor ungefähr 30 Jahren bereits gezeigt werden konnte, dass bei einem signifikanten

Anteil von über 30 % der SM-Erkrankungen generell eine AHN histologisch zu sichern ist (Travis et al., 1988), so ist heute bekannt, dass das Vorliegen einer AHN zumindest bei den fortgeschrittenen Formen der SM häufiger ist als die Abwesenheit derselben (Jawhar et al., 2016b; Pardanani, 2015).

Unter den diagnostizierten AHN war im untersuchten Kollektiv am häufigsten ein assoziiertes MDS/MPNu zu finden, gefolgt von der CMML und anderen myeloischen Neoplasien. Andere Studien zeigen hier mit wechselnden Häufigkeiten ähnliche Ergebnisse auf, meist zeigt sich eine CMML, ein MDS/MPNu oder ein MDS (Lim et al., 2009; Pardanani, 2015; Sperr et al., 2002). Die Diagnose der AHN wurde bei einem Großteil der untersuchten Patienten gemeinsam mit der Feststellung der SM detektiert, was in der Diagnose dieser Entität generell wichtig ist, damit durch möglichst gleichzeitige Feststellung der SM und der AHN eine sekundäre, also möglicherweise therapieinduzierte Genese der AHN ausgeschlossen wird und deswegen auch in anderen Studien gleichermaßen Berücksichtigung fand (Horny et al., 2004; Jawhar et al., 2016a; Wang et al., 2013).

Charakteristisch für die Mastozytose ist die seit langem bekannte *KIT* Mutation im Codon 816, die bei knapp 80 % aller Patienten mit SM nachgewiesen werden kann (Erben et al., 2014; Theoharides et al., 2015). Die aus der quantitativen PCR bestimmbare Mutationslast (AB) korrelierte darüber hinaus in mehreren Studien mit Subtyp der SM und Prognose (Erben et al., 2014; Hoermann et al., 2014). In Übereinstimmung mit diesen Befunden zeigte sich im untersuchten Material bei allen Patienten die *KIT* D816V Mutation. Es ließ sich zudem ebenfalls feststellen, dass der AB gemessen im PB bei den Patienten mit aggressiveren Formen der SM (ASM, MCL) höher ist als bei denen mit ISM, ebenso konnte im Rahmen der Regressionsanalysen ein signifikanter Anstieg des AB mit Anzahl der S/A/R Mutationen gezeigt werden, was die Schlussfolgerungen der zitierten Vorstudien und die bisherigen Beobachtungen unserer Arbeitsgruppe unterstreicht.

Ebenfalls seit einiger Zeit liegen vermehrt Hinweise auf das häufige Vorkommen und den adversen prognostischen Effekt von somatischen Mutationen zusätzlich zu *KIT* D816V vor (Schwaab et al., 2013; Tefferi et al., 2009; Traina et al., 2012; Ustun et al., 2016; Wilson et al., 2011). Der genaue Effekt einzelner Zusatzmutationen wurde hierbei bislang nicht umfassend herausgearbeitet, lediglich ein Zusammenhang der

Anzahl solcher mit aggressiveren Subtypen und schlechterem Verlauf (Damaj et al., 2014; Hanssens et al., 2014; Schwaab et al., 2013).

Es wurde vor diesem Hintergrund diskutiert, ob der Nachweis von Zusatzmutationen lediglich auf eine vorliegende AHN zurückzuführen sein könnte, da Zusatzmutationen zum einen auch in Studien mit ausschließlich SM gefunden werden konnten (Jawhar et al., 2015; Soverini et al., 2015), zum anderen aber auch *KIT* Mutationen nicht auf die SM-Komponente beschränkt sind (Yavuz et al., 2002). Es ist damit sehr wahrscheinlich, dass es sich bei der SM und auch der SM-AHN um komplexe Erkrankungen der gemeinsamen hämatopoetischen Progenitorzellen handelt. Auf Grundlage der bislang vorliegenden Daten muss davon ausgegangen werden, dass vorliegende Zusatzmutationen regelhaft mit einer AHN gemeinsam auftreten.

Nachfolgend soll zur Beantwortung der Arbeit zugrundeliegender Fragestellungen zunächst auf die Inzidenz und den prognostischen Effekt der Zusatzmutationen eingegangen werden.

Mutationen in *TET2*, die auch in gesunden Individuen gefunden werden konnten (Busque et al., 2012), haben zur Folge, dass die Regulierung der Genexpression auf zellulärer Ebene behindert und die Fähigkeit von hämatopoetischen Stammzellen zur Selbsterneuerung (asymmetrische Zellteilung) erhöht wird (Moran-Crusio et al., 2011). Dabei wurde kürzlich wiederholt beschrieben, dass Mutationen in *TET2* über mehrere der 12 Exons zu finden sind und als eher frühe Alteration in der Pathogenese verschiedener Malignome auftreten (Holmfeldt and Mullighan, 2011; Jawhar et al., 2015). In bislang publizierten Daten ist die Rate von *TET2*^{mut} *KIT* D816V⁺ SM mit 20 – 40 % zu finden (Schwaab et al., 2013; Traina et al., 2012). Hierbei konnte kein negativer prognostischer Effekt signifikant nachgewiesen werden (Damaj et al., 2014). Eine 2014 veröffentlichte Arbeit fand andererseits *in-vitro* eine Kooperation von *TET2* und *KIT* Mutationen und eine Transformation von humanen und murinen SM-Modellen hin zu aggressiveren Formen (De Vita et al., 2014).

In den in dieser Arbeit untersuchten Proben fanden sich in insgesamt 47 % aller untersuchten SM-Patienten Mutationen in *TET2*, davon in etwa gleich verteilt viele bei indolenten und fortgeschrittenen Formen. In Übereinstimmung mit einigen der oben aufgeführten Studienergebnisse zeigte sich trotz des häufigen Nachweises der Mutation kein signifikant adverser Effekt auf die Prognose (vgl. Abbildung 7, p = 0.3).

Im Gegensatz zu den von De Vita et al. (2014) gefundenen Hinweisen scheinen die Ergebnisse dieser Arbeit daher eher die Annahme zu stützen, dass *TET2* Mutationen zwar in der Pathogenese der SM und auch der AHN eine wichtige Rolle spielen, jedoch wahrscheinlich nur einen geringen oder keinen prognostischen Effekt vermitteln.

Das ebenfalls untersuchte *SRSF2* Gen kodiert für das gleichnamige Protein, welches als Bestandteil des Spliceosoms am Vorgang des alternativen Splicings beteiligt ist (Manley and Tacke, 1996; Will and Luhrmann, 2011). Es gehört zur Gruppe der SR-Proteine und hilft, Introns aus der transkribierten prä-mRNA zu entfernen. Mutationen in diesem Gen treten häufig in der „hot spot“ Region um Codon P95 auf und spielen bislang vor allem eine Rolle in der MPN- und MDS-Forschung (Visconte et al., 2012). Bei bis zu einem Drittel der Patienten mit SM-AHN kann eine Mutation in *SRSF2* Codon P95 nachgewiesen werden, jedoch nicht bei ISM oder SSM (Hanssens et al., 2014; Jawhar et al., 2015; Schwaab et al., 2013). Für *SRSF2* Mutationen konnte unsere Arbeitsgruppe ebenfalls zeigen, dass sie in der klonalen Entwicklung von Zellen der SM in Kultur der *KIT* D816V Mutation vorausgehen. Hierzu wurden in unserem Zellkulturlabor KM-Zellen von Patienten mit fortgeschrittener SM in einem CFU-GM Ansatz in Kultur genommen und nach Inkubation einzelzellbasiert klonale Zellen aspiriert. Diese wurden auf die *KIT*-Mutation und weitere Zusatzmutationen untersucht. Aus dem Muster der gefundenen Genotypen und der Tatsache, dass alle Zellen einer Kolonie aus einer hämatopoetischen Progenitorzelle hervorgegangen sein mussten, konnte eine logische Hierarchie der Mutationsabfolge abgeleitet werden. Andere, auch vor *KIT* auftretende Mutationen waren Alterationen in *TET2*, *ASXL1*, *RUNX1*, *EZH2*, *IDH2* und *ETV6* (Jawhar et al., 2015).

Im untersuchten Patientenkollektiv fand sich eine Mutation in *SRSF2* in 43 % aller Proben und damit nach *TET2* am zweithäufigsten. Vor allem Patienten mit ASM-AHN und MCL-AHN waren positiv für die *SRSF2*-Mutation. Dabei hatte diese auch mit Abstand den größten Effekt auf ein verringertes Gesamtüberleben mit einer HR von 5,9 ($p < 0.0001$, vgl. Abbildung 7) in der univariaten und 4,9 ($p = 0.001$, vgl. Tabelle 10) in der multivariaten Analyse. Zusammenfassend lässt sich aus diesen Ergebnissen ableiten, dass der *SRSF2* Status der Patienten mit fortgeschrittener SM mehr als der jeder anderen bislang getesteten Mutation ein wichtiger Prädiktor für Verlauf und Überleben zu sein scheint. Zudem bedingt das Vorliegen eines „mutational hot spots“ bei Codon P95 einen im Vergleich zu anderen Mutationsgenen

begrenzteren diagnostischen Aufwand bei der Bestimmung des Status. Bislang war die Bedeutung von *SRSF2* Mutationen als frühe und prognostisch relevante pathophysiologische Komponente der SM nicht bekannt, lediglich eine Assoziation mit fortgeschrittener SM (Hanssens et al., 2014).

Anders als beim P95 „hot spot“ des *SRSF2* Gens finden sich bei *ASXL1* Mutationen im gesamten Bereich des Gens, die meisten davon jedoch im letzten codierenden Exon. *ASXL1* translatiert in einen DNA-bindenden Transkriptionsfaktor mit Helix-Turn-Helix Motiv, der mit dem Retinsäure-Rezeptor interagiert und vermutlich Einfluss auf das Chromatin-Remodeling in der Zelle haben kann (Kato, 2015). Neben dem Nachweis von *ASXL1* Mutationen bei verschiedenen MPN, dem MDS und auch den MDS/MPN-Syndromen wie der CMML (Carbuccia et al., 2009; Patnaik and Tefferi, 2018) konnten Mutationen im Gen auch bei SM-AHN schon mehrfach nachgewiesen werden, mit unterschiedlichen berichteten Häufigkeiten (Schwaab et al., 2013; Traina et al., 2012). Für *ASXL1*^{mut} konnte bereits gezeigt werden, dass es als prognostisch negativer Prädiktor bei SM-AHN fungiert (Damaj et al., 2014).

Auch die in der vorliegenden Arbeit ausgewerteten Daten von *ASXL1*^{mut} *KIT* D816V⁺ fortgeschrittenen SM-Patienten (n = 20, 29 %) beschreiben den Status im *ASXL1* Gen als unabhängigen Risikofaktor für eine schlechte Prognose und unerwünschte krankheitsrelevante Parameter. Sowohl in der univariaten als auch in der multivariaten Regression erhöht *ASXL1*^{mut} das Risiko des Versterbens im Beobachtungszeitraum um den Faktor 3,4 beziehungsweise 2,6 und ist damit neben *SRSF2* eine der beiden genetischen Variablen, die in beiden Regressionsmodellen signifikante Ergebnisse zeigen konnten.

RUNX1 ist ein auf Chromosom 21 (21q22.12) gelegenes Gen, welches ähnlich wie *ASXL1* für einen Transkriptionsfaktor codiert, der vor allem für die Transkription hämatologischer Gene wichtig ist, wie Arbeiten schon in den 1990er Jahren zeigen konnten (Cameron et al., 1994). *RUNX1* Mutationen spielen bei der eine Rolle durch die Bildung eines *RUNX1*-Fusionsgens als Folge einer Translokation (Liu et al., 2018), seltener bei MPN durch inaktivierende Mutationen, die zu ungehinderter Proliferation führen können (Blyth et al., 2005). Auch bei der SM wurden Alterationen in *RUNX1* bereits beschrieben (Schwaab et al., 2013), jedoch ohne wie in unserer Untersuchung nachweisen zu können, dass *RUNX1*^{mut} in der univariaten Regressionsanalyse einen negativen prognostischen Effekt vermittelt. Im Gegensatz

aber zu *SRSF2*^{mut} und *ASXL1*^{mut} verliert diese Korrelation in der multivariaten Berechnung ihre Signifikanz.

Eine ebenfalls auf NGS basierende Untersuchung der Mayo Clinic kam Ende 2016 zu ähnlichen Ergebnissen bei 150 SM-Patienten, dass in der multivariaten Analyse Mutationen in *RUNX1* und *ASXL1* adverse prognostische Prädiktoren seien (Pardanani et al., 2016). Interessanterweise fand sich in jener untersuchten Kohorte jedoch lediglich ein Patient mit einer *SRSF2*-Mutation, weswegen – wie von den Autoren ebenfalls diskutiert – allein die offensichtlich in dieser Hinsicht sehr unterschiedliche Patientenpopulation der Untersuchung im Vergleich mit der vorliegenden Arbeit hinreichend erklären könnte, weswegen für *SRSF2* Mutationen kein Effekt gezeigt werden konnte. Ebenfalls denkbar wäre auch eine zu geringe Sensitivität der verwendeten NGS-Methode und gleichzeitig vorliegende geringe Mutationslasten des *SRSF2*^{mut}, was jedoch nicht die ganze Ausprägung der Diskrepanz in der Mutationsprävalenz erklären könnte und bei den anderen untersuchten Genen gleichfalls nicht zu derartigen Unterschieden geführt hat.

Neben den Effekten der im S/A/R Genpanel zusammengefassten Mutationen zeigten sich in der Auswertung auch klinische Parameter mit prognostischem Effekt. Wie in der Arbeit von Pardanani et al. (2016) ebenfalls beschrieben, ergaben sich Risikoerhöhungen für erniedrigte Werte des Hämoglobin, Hypalbuminämie, erhöhte AP, erhöhte Tryptase i.S. und Gewichtsverlust in der univariaten Analyse. Bei gleichzeitiger Betrachtung der Einflüsse mehrerer Variablen blieben lediglich eine erhöhte AP und Tryptase i.S. als unabhängige Risikofaktoren. In der US-amerikanischen Studie fanden sich weitere adverse prognostische Effekte für höheres Lebensalter der Erkrankten und eine Thrombozytopenie, die auch im multivariaten Verfahren ihre Signifikanz behielten. Hierfür dürfte in erster Linie das mehr als doppelt so große Patientenkollektiv ursächlich sein (n = 70 vs. n = 150).

Die größtenteils gleichsinnigen Ergebnisse der Studien weisen auf das Vorliegen relevanter prognostischer Prädiktoren innerhalb der heterogenen Gruppe der fortgeschrittenen Mastozytose hin. Die Tryptase beispielsweise als Marker der Mastzellaktivität ist schon lange als Diagnose- und Verlaufsparemeter bekannt, die vorliegenden Ergebnisse stützen diese Einschätzung. Auch für den adversen Effekt einer Hypalbuminämie und eines Aszites erscheint die pathophysiologische Erklärung sinnvoll, dass eine aggressivere SM mit Infiltration der das Albumin

synthetisierenden Leber einhergeht und so zu Funktionseinschränkungen der Syntheseleistung und veränderten Druckverhältnissen in den Gefäßen des portalen Zuflusses führen kann.

Der in beiden Arbeiten größtenteils ebenfalls kohärent gezeigte negative Einfluss von Zusatzmutationen insbesondere im Panel aus S/A/R bestätigt zunächst die bereits zuvor vorliegenden schlechteren Prognosedaten der multimutierten SM im Vergleich zu solcher mit lediglich der *KIT*-Mutation (Jawhar et al., 2015; Schwaab et al., 2013). Mit der Verkleinerung des primären Fokus auf die drei relevantesten Zusatzmutationen wäre zur besseren Stratifizierung der SM-Patienten eine Aufnahme des Mutationsstatus in die Diagnosekriterien oder ein Scoringssystem denkbar. Pardanani et al. schlagen einen solchen Score vor, der neben dem Genotyp auch klinische Risikofaktoren berücksichtigt. Sie konnten zeigen, dass sich nach Stratifizierung Gruppen von SM-Patienten ergeben, deren Überlebenszeiten signifikant differieren. Eine Risikoabschätzung wäre damit für jeden SM-Patienten nach standardisierter Erfassung der molekulargenetischen, laborchemischen und klinischen Parameter möglich und würde wie bei anderen hämatologischen Entitäten einen Korridor zur Therapieentscheidung vorgeben.

Die identifizierten Risikomutationen sind bereits als solche bei anderen myeloischen Erkrankungen wie der PMF und der CMML bekannt, was unter der Hypothese einer gemeinsamen pathophysiologischen Grundlage auf der Ebene von Progenitorzellen durchaus vorstellbar scheint (Itzykson et al., 2013; Vannucchi et al., 2013).

Erst kürzlich konnte unsere Arbeitsgruppe zudem in einer Analyse der zytogenetischen Charakteristika bei 109 SM-Patienten nicht nur den unabhängigen Effekt des S/A/R Status auf die Prognose bestätigen, sondern auch chromosomale Aberrationen als zusätzlichen Risikofaktor identifizieren. So ergaben sich für ungünstige Karyotypen (≥ 3 Abnormalitäten, Monosomie 7, del(5q) bei AML) unabhängig von anderen Risikofaktoren deutlich reduzierte Überlebenszeiten im Vergleich zu günstigen oder normalen Karyotypen (4 vs. 39 Monate medianes Überleben). Somit sollten bei der Stratifizierung auch zytogenetische Charakteristika bedacht werden, auch wenn zu chromosomalen Aberrationen bei SM bislang noch wenig Daten vorliegen (Naumann et al., 2018).

Das präzisere Verständnis der pathophysiologischen Grundlagen bei SM hat in den letzten Jahren auch zu neuen Therapieansätzen geführt. Angelehnt an die

Fortschritte bei der Behandlung anderer hämatologischer Erkrankungen mit Hilfe neuer Substanzen, die gezielt biologische Eigenschaften der entarteten Zellen ausnutzen („targeted therapy“), konnte kürzlich Midostaurin (PKC412) für die Behandlung der Mastozytose im April 2017 zunächst von der US-amerikanischen Food and Drug Administration (FDA) zugelassen werden. Dieser Multikinaseinhibitor bindet sowohl die mutierte als auch nicht-mutierte Variante des KIT-Rezeptors (Growney et al., 2005) und konnte in einer offenen Multicenter Studie mit 116 Patienten eine Ansprechrate von 60 % erreichen. Ebenso konnte ein Rückgang mindestens einer Mastozytose-bedingten Organbeteiligung bei 45 % der Patienten beobachtet werden, im Median reduzierten sich auch krankheitsdefinierende und prognoserelevante Parameter wie Mastzellinfiltration im KM (-59 %) und Tryptase i.S. (-58 %). Diese vielversprechenden Ergebnisse veranlassen die Autoren zu einem positiven Ausblick in Richtung einer multimodalen Therapie der SM mit zytoreduktiven Agenzien neben der „targeted therapy“ und der Möglichkeit einer allogenen SZT (Gotlib et al., 2016).

Die Ergebnisse um die Wirksamkeit von Midostaurin bei SM und den prognostischen Wert des S/A/R Genpanels zusammenfassend konnte unsere Arbeitsgruppe weiterhin demonstrieren, dass auch in einer Kohorte unter Therapie mit Midostaurin der genotypische Status in S/A/R mit der Ansprechrate und dem Gesamtüberleben unter dieser neuen, zielgerichteten Therapie signifikant korreliert. Auch Therapieabbruch wegen eines Krankheitsprogresses und kein Ansprechen des *KIT* D816V AB waren deutlich häufiger bei Patienten mit S/A/R^{mut} zu finden, was die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit auch im Therapiesetting unterstreicht (Jawhar et al., 2017).

Neben Midostaurin wird auch Avapritinib (BLU-285) als mögliches Therapeutikum bei fortgeschrittener SM untersucht. Avapritinib zeichnet sich durch eine potente und sehr spezifische Inhibierung von „activation loop“ Tyrosinkinase der Klasse III wie KIT und PDGFRA aus und konnte sowohl *in-vitro* als auch *in-vivo* bereits vielversprechende Ergebnisse bei SM und dem ebenfalls mit *KIT*-Mutationen assoziierten gastrointestinalen Stromatumor (GIST) zeigen (Evans et al., 2017; Rose, 2018).

Nachdem mit der Inhibierung des KIT-Rezeptors die Therapie erfolgreich erweitert werden konnte, stellt sich die Frage, ob auch andere molekulare Ziele für eine

spezifische Therapie in Frage kommen. Da der Nachweis von Zusatzmutationen wie in dieser Arbeit gezeigt prognostisch relevant ist und diese auch in der klonalen Entwicklung von der Progenitorzelle zur den Phänotyp der Erkrankung bestimmenden Mastzelle eine große Rolle spielen (Jawhar et al., 2015), wäre hier prinzipiell ein therapeutischer Angriffspunkt zu suchen. Für den Splicingfaktor SRSF2 konnte in einer Arbeit gezeigt werden, dass er im murinen Modell mit der heterozygoten P95H Mutation eine akute Leukämie induzieren kann, bei der die leukämische Last und das Gesamtüberleben nach Gabe eines Spliceosom-modulierenden Stoffes (E7107) verbessert werden konnte. Der Effekt des Therapeutikums war bei *SRSF2*^{mut} Leukämien zudem signifikant größer als bei denen mit *SRSF2*^{wt} (Lee et al., 2016).

Zwar fehlt bei den im S/A/R Panel erfassten Mutationen eine eindeutige molekular anzugehende Zielstruktur wie beim konstitutiv aktivierten KIT-Rezeptor, jedoch können die Ergebnisse zur Spliceosom-Modulation bei *SRSF2*^{mut} Leukämien aufzeigen, dass auch auf die Pathophysiologie dieser Mutationen eventuell therapeutisch Einfluss genommen werden könnte.

Diese Optionen müssen in weiteren Studien mit dem Ziel der Entwicklung eines standardisierten therapeutischen Algorithmus untersucht werden, um das Gegenstück zur diagnostischen Stratifizierung zu bieten, welche der Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit war.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Die Mastozytose als eigenständige Erkrankung in der Gruppe der myeloischen Neoplasien bezeichnet eine pathologische Vermehrung von Mastzellen vor allem im Knochenmark, der Haut und viszeralen Organen mit variabler Klinik, die von rein kutanen Manifestationsformen bis hin zu systemischen Formen und leukämischem Verlauf mit deutlich eingeschränkter Prognose reicht. Bei der großen Mehrheit der Patienten lässt sich eine Punktmutation im *KIT*-Gen nachweisen, die über die konstitutive Aktivierung der Tyrosinkinase zur enthemmten Proliferation der Mastzellen führt. Die systemische Mastozytose ist eine sehr seltene Erkrankung mit einer Inzidenz um 1 / 1 Million Menschen. Die Therapie der Erkrankung ist stark abhängig vom Subtyp und umfasst neben rein symptomorientierten Maßnahmen auch zytoreduktive Medikamente, die Behandlung mit Tyrosinkinaseinhibitoren und die allogene Stammzelltransplantation.

Seit einiger Zeit ist bekannt, dass die Heterogenität in Verlauf und Prognose der systemischen Formen auch auf das Vorliegen von zusätzlich zur *KIT*-Mutation auftretenden genetischen Alterationen zurückgeführt werden kann. In der klonalen Entwicklung der Mastozytosezellen gehen andere somatische Mutationen der *KIT* D816V Mutation voraus, die als spät hinzutretende Veränderung vor allem den Phänotyp dieser komplexen Erkrankung der hämatopoetischen Vorläuferzellen bestimmt.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war daher, die genaue Inzidenz und Verteilung verschiedener Zusatzmutationen bei *KIT* D816V positiver systemischer Mastozytose zu bestimmen und den Einfluss klinischer, laborchemischer und molekulargenetischer Variablen auf krankheitsrelevante Parameter und das Gesamtüberleben zu quantifizieren. Außerdem sollte durch Identifikation von Risikofaktoren für einen schlechteren Verlauf versucht werden, die heterogene Gruppe der Patienten mit fortgeschrittener Mastozytose besser zu stratifizieren.

Es konnte gezeigt werden, dass die am häufigsten neben *KIT* D816V vorliegenden Zusatzmutationen in den Genen *TET2*, *SRSF2*, *ASXL1*, *RUNX1* und *JAK2* auftraten und mit aggressiveren Formen der systemischen Mastozytose assoziiert waren. Für Mutationen in *SRSF2*, *ASXL1* und *RUNX1* konnte weiterhin gezeigt werden, dass sie signifikant mit adversen klinischen und laborchemischen Markern korrelieren und die

Überlebenszeit verringern, wobei der Effekt bei Mutationen in *SRSF2* am größten war. Die Anzahl der Mutationen im Panel aus *SRSF2/ASXL1/RUNX1* (S/A/R) hatte im untersuchten Patientenkollektiv signifikanten Einfluss auf die Prognose. So zeigte sich in der Gruppe mit zwei oder mehr Mutationen in S/A/R eine mediane Überlebenszeit von 2,7 Jahren, bei einer S/A/R-Mutation 3,9 Jahre und bei keiner Mutation im Panel eine mediane Überlebenszeit, die über den Beobachtungszeitraum hinausging. Darüber hinaus konnte auch für Erhöhungen der alkalischen Phosphatase und der Tryptase ein schlechteres *outcome* festgestellt werden.

In Übereinstimmung mit Arbeiten zu den oben genannten Mutationen im Kontext anderer Erkrankungen wie dem myelodysplastischen Syndrom oder myeloproliferativen Neoplasien unterstreichen diese Ergebnisse die pathophysiologische Bedeutung genetischer Veränderungen auf Ebene der gemeinsamen hämatologischen Progenitorzellen auch bei der Mastozytose. Der für fortgeschrittene Mastozytoseerkrankungen typische Nachweis einer parallel auftretenden assoziierten hämatologischen Neoplasie, für die gezeigt werden konnte, dass sie sowohl die *KIT* D816V Mutation als auch Zusatzmutationen trägt, macht eine gemeinsame komplexe genetische Pathogenese der Erkrankungen wahrscheinlich.

Die prognostische Einordnung der systemischen Mastozytose mit Zusatzmutationen mittels des S/A/R Genpanels könnte zusätzlich zu den Diagnosekriterien der *World Health Organisation* dazu beitragen, zukünftig bessere Therapieentscheidungen bei dieser seltenen Erkrankung zu treffen.

6 LITERATURVERZEICHNIS

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.

Büning, H., and Trenkler, G. (1998). *Nichtparametrische statistische Methoden* (Walter de Gruyter).

Buonaccorsi, J.P., Laake, P., and Veierød, M.B. (2014). On the power of the Cochran–Armitage test for trend in the presence of misclassification. *Statistical Methods in Medical Research* 23, 218-243.

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.

Cohen, S.S., Skovbo, S., Vestergaard, H., Kristensen, T., Moller, M., Bindsløv-Jensen, C., Fryzek, J.P., and Broesby-Olsen, S. (2014). Epidemiology of systemic mastocytosis in Denmark. *British journal of haematology* 166, 521-528.

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 Vita, S., Schneider, R.K., Garcia, M., Wood, J., Gavillet, M., Ebert, B.L., Gerbault, A., Roers, A., Levine, R.L., Mullally, A., *et al.* (2014). Loss of function of TET2 cooperates with constitutively active KIT in murine and human models of mastocytosis. *PloS one* 9, e96209.

Ehrlich, P. (1878). *Beiträge zur Theorie und Praxis der histologischen Färbung*. I. Teil: Die chemische Auffassung der Färbung. II. Teil: Die Anilinfarben in chemischer, technologischer und histologischer Beziehung (Thesis, Leipzig, 65pp).

Ellis, J.M. (1949). Urticaria pigmentosa; a report of a case with autopsy. *Archives of pathology* 48, 426-435.

English, D., and Andersen, B.R. (1974). Single-step separation of red blood cells. Granulocytes and mononuclear leukocytes on discontinuous density gradients of Ficoll-Hypaque. *Journal of immunological methods* 5, 249-252.

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. *Annals of hematology* 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.

Evans, E.K., Gardino, A.K., Kim, J.L., Hodous, B.L., Shutes, A., Davis, A., Zhu, X.J., Schmidt-Kittler, O., Wilson, D., Wilson, K., *et al.* (2017). A precision therapy against cancers driven by KIT/PDGFR mutations. *Science translational medicine* 9.

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.

Fux, M., Pecaric-Petkovic, T., Odermatt, A., Hausmann, O.V., Lorentz, A., Bischoff, S.C., Virchow, J.C., and Dahinden, C.A. (2014). IL-33 is a mediator rather than a trigger of the acute allergic response in humans. *Allergy* 69, 216-222.

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.

Gotlib, J., Kluijn-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. (1994). [The mast cell]. *Der Hautarzt; Zeitschrift für Dermatologie, Venerologie, und verwandte Gebiete* 45, 55-63; quiz 64.

Growney, J.D., Clark, J.J., Adelsperger, J., Stone, R., Fabbro, D., Griffin, J.D., and Gilliland, D.G. (2005). Activation mutations of human c-KIT resistant to imatinib mesylate are sensitive to the tyrosine kinase inhibitor PKC412. *Blood* 106, 721-724.

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.

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.

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., Escribano, L., Grattan, C., Brockow, K., Carter, M.C., Alvarez-Twose, I., Matito, A., Broesby-Olsen, S., Siebenhaar, F., Lange, M., *et al.* (2016). Cutaneous manifestations in patients with mastocytosis: Consensus report of the European Competence Network on Mastocytosis; the American Academy of Allergy, Asthma & Immunology; and the European Academy of Allergology and Clinical Immunology. *The Journal of allergy and clinical immunology* 137, 35-45.

Hartmann, K., and Henz, B.M. (2001). Mastocytosis: recent advances in defining the disease. *The British journal of dermatology* 144, 682-695.

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.

Holmfeldt, L., and Mullighan, C.G. (2011). The role of TET2 in hematologic neoplasms. *Cancer cell* 20, 1-2.

Horny, H.P., Arber, A.D., Peterson, L.C., Tefferi, A., Metcalfe, D.D., Bennett, J.M., Bain, B.J., Escribano, L., and Valent, P. (2017). In: Swerdlow SH, *et al.*, eds. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Revised 4th edition.

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.

Hosono, S., Faruqi, A.F., Dean, F.B., Du, Y., Sun, Z., Wu, X., Du, J., Kingsmore, S.F., Egholm, M., and Lasken, R.S. (2003). Unbiased whole-genome amplification directly from clinical samples. *Genome research* 13, 954-964.

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

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

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.

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.

Katoh, M. (2015). Functional proteomics of the epigenetic regulators ASXL1, ASXL2 and ASXL3: a convergence of proteomics and epigenetics for translational medicine. *Expert review of proteomics* 12, 317-328.

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.

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.

Lee, S.C., Dvinge, H., Kim, E., Cho, H., Micol, J.B., Chung, Y.R., Durham, B.H., Yoshimi, A., Kim, Y.J., Thomas, M., *et al.* (2016). Modulation of splicing catalysis for therapeutic targeting of leukemia with mutations in genes encoding spliceosomal proteins. *Nature medicine* 22, 672-678.

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.

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.

Liu, H., Wang, S.A., Schlette, E.J., Xu, J., Jorgensen, J.L., Cameron Yin, C., Li, S., Jeffrey Medeiros, L., and Tang, G. (2018). Myeloid neoplasms with t(16;21)(q24;q22)/RUNX1-RUNX1T3 mimics acute myeloid leukemia with RUNX1-RUNX1T1. *Annals of hematology*.

Manley, J.L., and Tacke, R. (1996). SR proteins and splicing control. *Genes & development* 10, 1569-1579.

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.

- Moran-Crusio, K., Reavie, L., Shih, A., Abdel-Wahab, O., Ndiaye-Lobry, D., Lobry, C., Figueroa, M.E., Vasanthakumar, A., Patel, J., Zhao, X., *et al.* (2011). Tet2 loss leads to increased hematopoietic stem cell self-renewal and myeloid transformation. *Cancer cell* 20, 11-24.
- Naumann, N., Jawhar, M., Schwaab, J., Kluger, S., Lubke, J., Metzgeroth, G., Popp, H.D., Khaled, N., Horny, H.P., Sotlar, K., *et al.* (2018). Incidence and prognostic impact of cytogenetic aberrations in patients with systemic mastocytosis. *Genes, chromosomes & cancer* 57, 252-259.
- Nettleship, E. (1869). Chronic urticaria, leaving brown stains. *Brit Med J* 2, 323.
- Olszewski, M.B., Groot, A.J., Dasty, J., and Knol, E.F. (2007). TNF trafficking to human mast cell granules: mature chain-dependent endocytosis. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 178, 5701-5709.
- Pardanani, A. (2012). Systemic mastocytosis in adults: 2012 Update on diagnosis, risk stratification, and management. *American journal of hematology* 87, 401-411.
- Pardanani, A. (2015). Systemic mastocytosis in adults: 2015 update on diagnosis, risk stratification, and management. *American journal of hematology* 90, 250-262.
- Pardanani, A., Lasho, T., Elala, Y., Wassie, E., Finke, C., Reichard, K.K., Chen, D., Hanson, C.A., Ketterling, R.P., and Tefferi, A. (2016). Next-generation sequencing in systemic mastocytosis: Derivation of a mutation-augmented clinical prognostic model for survival. *American journal of hematology* 91, 888-893.
- Patnaik, M.M., and Tefferi, A. (2018). Chronic myelomonocytic leukemia: 2018 update on diagnosis, risk stratification and management. *American journal of hematology* 93, 824-840.
- Rose, S. (2018). Rapid Responses to Avapritinib (BLU-285) in Mastocytosis. *Cancer discovery* 8, 133.
- Roskoski, R., Jr. (2005). Signaling by Kit protein-tyrosine kinase--the stem cell factor receptor. *Biochemical and biophysical research communications* 337, 1-13.
- Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A., and Arnheim, N. (1985). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science (New York, NY)* 230, 1350-1354.
- 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.
- Soverini, S., De Benedittis, C., Mancini, M., Rondoni, M., Papayannidis, C., Padella, A., Specchia, G., Zanotti, R., Pagano, L., and Guadagnuolo, V. (2015). Genome-wide molecular portrait of aggressive systemic mastocytosis and mast cell leukemia depicted by whole exome sequencing and copy number variation analysis (*Am Soc Hematology*).

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.

Tallquist, M., and Kazlauskas, A. (2004). PDGF signaling in cells and mice. *Cytokine & growth factor reviews* 15, 205-213.

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.

Theoharides, T.C., Valent, P., and Akin, C. (2015). Mast Cells, Mastocytosis, and Related Disorders. *The New England journal of medicine* 373, 163-172.

Theoharides, T.C., Zhang, B., Kempuraj, D., Tagen, M., Vasiadi, M., Angelidou, A., Alysandratos, K.D., Kalogeromitros, D., Asadi, S., Stavrianeas, N., *et al.* (2010). IL-33 augments substance P-induced VEGF secretion from human mast cells and is increased in psoriatic skin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 4448-4453.

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.

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.

Ustun, C., Arock, M., Kluin-Nelemans, H.C., Reiter, A., Sperr, W.R., George, T., Horny, H.P., Hartmann, K., Sotlar, K., Damaj, G., *et al.* (2016). Advanced systemic mastocytosis: from molecular and genetic progress to clinical practice. *Haematologica* 101, 1133-1143.

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. (2015). Diagnosis and management of mastocytosis: an emerging challenge in applied hematology. *Hematology American Society of Hematology Education Program 2015*, 98-105.

Valent, P., Akin, C., and Metcalfe, D.D. (2017). Mastocytosis: 2016 updated WHO classification and novel emerging treatment concepts. *Blood* 129, 1420-1427.

Valent, P., Sotlar, K., Sperr, W.R., Escribano, L., Yavuz, S., Reiter, A., George, T.I., Kluin-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., 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.

Visconte, V., Makishima, H., Maciejewski, J.P., and Tiu, R.V. (2012). Emerging roles of the spliceosomal machinery in myelodysplastic syndromes and other hematological disorders. *Leukemia* 26, 2447-2454.

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.

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.

Wiechers, T., Rabenhorst, A., Schick, T., Preussner, L.M., Forster, A., Valent, P., Horny, H.P., Sotlar, K., and Hartmann, K. (2015). Large maculopapular cutaneous lesions are associated with favorable outcome in childhood-onset mastocytosis. *The Journal of allergy and clinical immunology* 136, 1581-1590.e1583.

Will, C.L., and Luhrmann, R. (2011). Spliceosome structure and function. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 3.

Wilson, T.M., Maric, I., Simakova, O., Bai, Y., Chan, E.C., Olivares, N., Carter, M., Maric, D., Robyn, J., and Metcalfe, D.D. (2011). Clonal analysis of NRAS activating mutations in KIT-D816V systemic mastocytosis. *Haematologica* 96, 459-463.

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.

Yavuz, A.S., Lipsky, P.E., Yavuz, S., Metcalfe, D.D., and Akin, C. (2002). Evidence for the involvement of a hematopoietic progenitor cell in systemic mastocytosis from single-cell analysis of mutations in the c-kit gene. *Blood* 100, 661-665.

Eigene Publikationen:

Jawhar, M., Schwaab, J., Naumann, N., Schnittger, S., **Kluger, S.**, Sotlar, K., Horny, H.-P., Metzgeroth, G., Haferlach, T., Valent, P., et al. (2015). Genomic landscape in KIT D816V+ advanced systemic mastocytosis. *Clinical Lymphoma Myeloma and Leukemia* 15, S55-S56.

Jawhar, M., Schwaab, J., Schnittger, S., Meggendorfer, M., Pfirrmann, M., Sotlar, K., Horny, H.P., Metzgeroth, G., **Kluger, S.**, Naumann, N., et al. (2016). 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., Naumann, N., **Kluger, S.**, Schwaab, J., Metzgeroth, G., Evans, E.K., Gardino, A., Lengauer, C., Hofmann, W.K., Cross, N.C.P., et al. (2016). Inhibitory Effects of Midostaurin and Blu-285 on Myeloid Progenitor Cells Derived from Patients with Multi-Mutated KIT D816V+Advanced Systemic Mastocytosis. *Blood* 128.

Jawhar, M., Schwaab, J., Meggendorfer, M., Naumann, N., **Kluger, S.**, Horny, H.P., Sotlar, K., Haferlach, T., Fabarius, A., Hofmann, W.K., et al. (2016). Mast cell leukemia: clinical heterogeneity, molecular aberrations and prognostic factors. *Oncology Research and Treatment* 39, 24-24.

Jawhar, M., Schwaab, J., Naumann, N., **Kluger, S.**, Horny, H.P., Sotlar, K., Haferlach, T., Metzgeroth, G., Fabarius, A., Valent, P., et al. (2016). Impact of Molecular Markers on Response and Resistance in Midostaurin-Treated Patients with Advanced Systemic Mastocytosis. *Blood* 128.

Naumann, N., **Kluger, S.**, Schwaab, J., Metzgeroth, G., Evans, E., Gardino, A., Lengauer, C., Hofmann, W.K., Cross, N.C.P., Fabarius, A., et al. (2017). Inhibitory effects of midostaurin and BLU-285 on myeloid progenitor cells derived from patients with KIT D816V+advanced systemic mastocytosis. *Oncology Research and Treatment* 40, 197-197.

Naumann, N., Jawhar, M., Schwaab, J., **Kluger, S.**, Lubke, J., Metzgeroth, G., Popp, H.D., Khaled, N., Horny, H.P., Sotlar, K., et al. (2018). Incidence and prognostic impact of cytogenetic aberrations in patients with systemic mastocytosis. *Genes, chromosomes & cancer* 57, 252-259.

7 ANHANG

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: WHO-Klassifikation der myeloischen Neoplasien und Leukämien (2016)	2
Abbildung 2: Klinische Effekte der Mastzelldegranulation	3
Abbildung 3: Mastzellen vor (A,C) und nach Degranulation (B,D); Pfeile zeigen auf Granula vor (A, C) und nach Exozytose (B, D).....	4
Abbildung 4: Schematische Darstellung des strukturellen Aufbaus des KIT-Rezeptors	6
Abbildung 5: Normalbefund bei der FISH-Diagnostik mit Markierung von 5q33 und 5p15	27
Abbildung 6: (A) Häufigkeit und Verteilung von Zusatzmutationen im untersuchten Patientenkollektiv dargestellt im Circos Diagramm (B) Prävalenz individueller Mutationsfrequenzen nach Subtypen der systemischen Mastozytose	36
Abbildung 7: Kaplan-Meier Kurven der Überlebensdaten der Patienten in Abhängigkeit vom Mutationsstatus in (A) <i>TET2</i> , (B) <i>SRSF2</i> , (C) <i>ASXL1</i> und (D) <i>RUNX1</i>	39
Abbildung 8: Kaplan-Meier Kurven der Überlebensdaten der Patienten in Abhängigkeit von der Anzahl der Mutationen im S/A/R Genpanel. (A) Vergleich der Überlebenszeiten mit 0 (blau) und ≥ 1 (rot) mutierten Panelgenen, (B) Vergleich der Gruppen mit 0 (blau), 1 (gelb) und ≥ 2 (rot) mutierten Panelgenen	41

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: WHO-Klassifikation der Mastozytose (2016).....	9
Tabelle 2: Diagnosekriterien der systemischen Mastozytose nach WHO.....	10

Tabelle 3: Überblick über Therapieoptionen der systemischen Mastozytose	12
Tabelle 4: Komponenten und Mixe der qualitativen, ein-und zweischrittigen PCRs .	22
Tabelle 5: PCR-Programm der qualitativen PCR.....	23
Tabelle 6: Komponenten und PCR-Programm der quantitativen PCR zur Amplifizierung des <i>KIT</i> WT	24
Tabelle 7: Komponenten und PCR-Programm der quantitativen PCR zur Amplifizierung der <i>KIT</i> D816V Mutation.....	24
Tabelle 8: Next Generation-sequenzierte Gene	26
Tabelle 9: Klinische und laborchemische Charakteristika sowie Überlebensdaten von 70 Patienten mit <i>KIT</i> D816V+ fortgeschrittener SM und Zusatzmutationen, aufgeteilt nach Abwesenheit (0) oder Vorhandensein von 1 oder ≥ 2 mutierten Genen im <i>SRSF2/ASXL1/RUNX1</i> (S/A/R) Genpanel.....	32
Tabelle 10: Ergebnisse der uni-und multivariaten Regression verschiedener klinischer, hämatologischer und molekulargenetischer Variablen auf das OS ..	37

8 LEBENS LAUF

PERSONALIEN

Name und Vorname: Kluger, Sebastian Ulrich Hartmut

Geburtsdatum: 31. August 1992

Geburtsort: Düsseldorf

Familienstand: ledig

Vater: Dr. rer. nat. Klaus Kluger

Mutter: Ilse Blank-Kluger

SCHULISCHER WERDEGANG

2002 – 2011 Erzbischöfliches St. Ursula-Gymnasium Düsseldorf

02. Juli 2011 Abitur

UNIVERSITÄRER WERDEGANG

WS 2011/12 Beginn des Studiums der Humanmedizin an der
Universität Heidelberg, Medizinische Fakultät Mannheim

11/2012 Stipendiat der Studienstiftung des deutschen Volkes

17.09.2013 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (M1)

2014 -2018 Studium Health Economics (M.Sc.) an der
Universität Heidelberg

06.04.2017 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (M2)

09.05.2018 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (M3)

15.05.2018 Approbation als Arzt

PRAKTISCHES JAHR UND BERUFLICHER WERDEGANG

05/2017 – 07/2017	Klinik und Poliklinik für Chirurgie, Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München
08/2017 – 10/2017	Klinik für Innere Medizin, Diakonissen-Stiftungs-Krankenhaus Speyer
11/2017 – 01/2018	Department of Otolaryngology, Harvard Medical School, Boston, USA
02/2018 – 05/2018	Klinik für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde, Kopf- und Halschirurgie, Universitätsklinikum Mannheim
seit 07/2018	Assistenzarzt, Klinik für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde, Kopf- und Halschirurgie, Universitätsklinikum Mannheim

9 DANKSAGUNG

Zunächst danke ich Herrn Prof. Dr. Wolf-Karsten Hofmann als Direktor der Klinik für die Möglichkeit, meine Arbeit im wissenschaftlichen Labor der III. Medizinischen Klinik der Universitätsmedizin Mannheim anzufertigen.

Herrn Prof. Dr. Andreas Reiter danke ich für den Vorschlag und die Überlassung des Themas dieser Arbeit und die ausgezeichnete Einbindung in seine Forschungsgruppe.

Meinem Betreuer Herrn Dr. Mohamad Jawhar danke ich besonders für seine zahlreichen Hilfestellungen und die Geduld, die er mir neben seinen Verpflichtungen in Forschung und Klinik entgegengebracht hat sowie für die Durchsicht meiner Arbeit und die vielen Hinweise, die zur Vollendung notwendig waren.

Frau Prof. Dr. Alice Fabarius danke ich für die zahlreichen wertvollen Hinweise zu dieser Arbeit und ihre große Unterstützung im Promotionsverfahren.

Ein besonderer Dank gilt auch Frau Dr. Nicole Naumann, die mit ihrem umfassenden Fachwissen, ihrer großen praktischen Erfahrung und ihrer stets aufmunternden Art mir bei der Lösung vieler Probleme zur Seite stand und die gleichzeitig ganz maßgeblich für die immer angenehme Atmosphäre in Labor und Büro verantwortlich war.

Frau Susanne Brendel danke ich für die kompetente Hilfe an der Sterilbank und die vielen gemeinsam verbrachten Pausen abseits derselben.

Herrn Max Mahlke, M.Sc. danke ich für den fachkundigen Rat den statistisch-mathematischen Teil dieser Arbeit betreffend.

Mein Dank gilt ebenso der Studienstiftung des deutschen Volkes, die mir durch ihre vielfältige Förderung in unvergleichlicher Weise Möglichkeiten in Studium und Promotion eröffnet und meine Studienzeit ganz maßgeblich geprägt hat.

Für ihre immerwährende Unterstützung gilt mein besonderer Dank meinen Eltern Herrn Dr. Klaus Kluger und Frau Ilse Blank-Kluger, die mich das Lernen gelehrt und mich auf meinem Weg bedingungslos unterstützt haben.