

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

Prognostische Biomarker und neue Therapieoptionen bei seltenen myeloischen Neoplasien

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

vorgelegt von
Johannes Lübke

aus
Cloppenburg
2020

Dekan: Herr Prof. Dr. med. Sergij Goerd
Referent: Herr apl. Prof. Dr. med. Andreas Reiter

*Meinen Eltern
Mechthild Lübke und Günter Lübke
und meinem Bruder
Henrik Lübke*

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	III
1 Einleitung	1
1.1 Myeloische Neoplasien	1
1.2 Die Biologie der Mastzelle	2
1.2.1 Entdeckung und Namensgebung der Mastzelle	2
1.2.2 Ontogenese, Differenzierung des Phänotyps und Lokalisation der Mastzelle	3
1.2.3 Mediatoren und Funktion der aktivierten Mastzelle	3
1.2.4 Färbeverhalten der Mastzelle	4
1.3 Mastozytose	5
1.3.1 Definition und Epidemiologie	5
1.3.2 Entstehung und Pathogenese	6
1.3.3 Klassifikation und Diagnose nach WHO	8
1.3.4 Prognose und Prognosefaktoren	11
1.3.5 Therapie	11
1.4 Die Biologie des eosinophilen Granulozyten	17
1.4.1 Entdeckung und Namensgebung des eosinophilen Granulozyten	17
1.4.2 Ontogenese, Differenzierung und Lokalisation des eosinophilen Granulozyten	17
1.4.3 Mediatoren und Funktion des eosinophilen Granulozyten	18
1.4.4 Biochemische Basis der pathophysiologischen Interaktion zwischen eosinophilen Granulozyten und Mastzellen	18
1.5 Eosinophilie	19
1.5.1 Definition und Epidemiologie	19
1.5.2 Entstehung und Pathogenese	20
1.5.3 Klassifikation und Diagnose nach WHO	20
1.5.4 Prognose und Prognosefaktoren	24
1.5.5 Therapie	26
1.6 Zielsetzung der Arbeit	27
2 Material und Methoden	29
2.1 Material	29
2.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien	29
2.1.2 Chemikalien	30
2.1.3 Enzyme	30
2.1.4 Gebrauchsfertige Reaktionssysteme	31
2.1.5 Software	31
2.1.6 Puffer und Lösungen	31
2.2 Methoden	32
2.2.1 Isolierung mononukleärer Zellen aus Knochenmark	33
2.2.2 Kryokonservierung	35
2.2.3 Auftauen der Zellen	35
2.2.4 Bestimmen der Lebendzellzahl	36
2.2.5 CFU-GM Assay	36
2.2.6 Amplifikation von Kolonie-DNA	38
2.2.7 Qualitätskontrolle der DNA	39
2.2.8 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	39
2.2.9 Agarosegelelektrophorese	41
2.2.10 Didesoxysequenzierung	42
2.2.11 Leukozytenisolation aus peripherem Blut (oder Knochenmark)	42
2.2.12 Isolation von RNA mittels Maxwell®	43
2.2.13 Isolation von RNA mittels TRIzol®	43

2.2.14	Synthese der cDNA	44
2.2.15	Allelspezifische quantitative real-time Polymerase-Kettenreaktion (rt-qPCR).....	44
2.2.16	RNA-Seq Analyse.....	46
2.2.17	<i>STAT5B</i> N642H Tetra-Primer ARMS Assay.....	47
2.2.18	T-Zell Selektion und Kultivierung	48
2.2.19	Statistische Auswertung	49
3	<i>Ergebnisse</i>	50
3.1	Auswertung des Patientenkollektivs mit fortgeschrittener systemischer Mastozytose	50
3.1.1	Deskriptive Analyse der klinischen, laborchemischen und histologischen Parameter	50
3.1.2	Molekulare und zytogenetische Aberrationen	51
3.1.3	Detektion von <i>KIT</i> D816V in CFU-GM durch Sanger-Sequenzierung	57
3.1.4	<i>In vitro</i> Effektivität von Midostaurin und Avapritinib	57
3.1.5	Verschiedene Antwortmuster der Kolonien auf Midostaurin und Avapritinib	60
3.1.6	Einfluss von Midostaurin und Avapritinib auf zusätzliche somatische Mutationen	60
3.1.7	Korrelation der <i>in vivo</i> und <i>in vitro</i> Effekte von Midostaurin hinsichtlich des Anteils <i>KIT</i> D816V positiver CFU-GM Kolonien sowie molekularen und klinischen Charakteristika .	61
3.2	Auswertung des Patientenkollektivs mit Eosinophilie	64
3.2.1	Detektion und Prävalenz der Mutation <i>STAT5B</i> N642H bei Patienten mit Eosinophilie .	64
3.2.2	Deskriptive Analyse der klinischen und laborchemischen Parameter	65
3.2.3	Mutationsanalyse bei <i>STAT5B</i> N642H positiven Mutationsstatus.....	67
3.2.4	Einfluss von Zusatzmutationen bei Patienten mit Eosinophilie und <i>STAT5B</i> N642H positivem Mutationsstatus auf das Gesamtüberleben	68
3.2.5	Klonale Mutationshierarchie bei Patienten mit Eosinophilie	69
4	<i>Diskussion</i>	71
5	<i>Zusammenfassung</i>	83
6	<i>Literaturverzeichnis</i>	85
7	<i>Anhang</i>	106
8	<i>Lebenslauf</i>	114
9	<i>Danksagung</i>	115

Abkürzungsverzeichnis

AHN	assoziierte hämatologische Neoplasie
ALL	akute lymphatische Leukämie
ASM	aggressive systemische Mastozytose
ASXL1	<i>additional sex combs like 1</i>
CCD	<i>coiled-coil-Domäne</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CEL	chronische Eosinophilenleukämie
CEL-NOS	chronische Eosinophilenleukämie, <i>not otherwise specified</i>
CFU-GM	<i>colony-forming-unit-granulocyte-macrophage</i>
CFU-eo	CFU-Eosinophile
CFU-eo/ba	CFU-Eosinophile/Basophile
CM	kutane Mastozytose
CMML	chronische myelomonozytäre Leukämie
CNL	chronische Neutrophilenleukämie
DBD	DNA-Bindungsdomäne
ECP	<i>eosinophil cationic protein</i>
EDN	<i>eosinophil-derived neurotoxin</i>
EPO	<i>eosinophil peroxidase</i>
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
-eo	mit Eosinophilie
GM-CSF	<i>granulocyte/macrophage colony stimulationg factor</i>
Hb	Hämoglobin
HE	Hypereosinophilie
HES	hypereosinophiles Syndrom
HSC	<i>hematopoietic stem cell</i>
i.S.	im Serum
ISM	indolente systemische Mastozytose
JAK	Januskinase
KIT	Stammzellefaktor-Rezeptor KIT
KM	Knochenmark
LD	Linkerdomäne
MBP	<i>major basic protein</i>
MCL	Mastzelleleukämie
MDS	myelodysplastisches Syndrom
MDS/MPN	myelodysplastische/myeloproliferative Neoplasie
MLN-eo	myeloische und lymphatische Neoplasie mit Eosinophilie und Rearrangierung von <i>PDGFRA</i> , <i>PDGFRB</i> , <i>FGFR1</i> oder mit <i>PCM1- JAK2</i> Fusionsgen
MNC	mononukleäre Zellen
MPN	myeloproliferative Neoplasien
NGF	<i>nerve growth factor</i>
NLS	<i>nuclear localization signal</i>

nt	Nukleotide
NTD	N-terminale Domäne
ORR	<i>overall response rate</i>
OS	<i>overall survival</i>
PB	peripheres Blut
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion
PKC	Proteinkinase C
RUNX1	<i>runt related transcription factor 1</i>
RTK	Rezeptor-Tyrosinkinase
SCF	<i>stem cell factor</i>
SM	systemische Mastozytose
SSM	schwelende systemische Mastozytose
STAT	<i>signal transducer and activator of transcription</i>
TAD	Transaktivierungsdomäne
TET2	<i>tet methylcytosine dioxygenase 2</i>
TGF	<i>transforming growth factor</i>
TKD	Tyrosinkinase-Domäne
TKI	Tyrosinkinase-Inhibitor
T-LGL	T-Zell Leukämie der großen granulären Lymphozyten
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>

1 Einleitung

Der deutsche Pathologe Rudolf Virchow beobachtete 1847 bei einer seiner Patientinnen eine starke Vermehrung ihrer weißen Blutzellen und beschrieb dieses krankhafte Phänomen als „weißes Blut“. Damit prägte Virchow den Namen der Leukämie. Etymologisch gesehen kommt der Name aus dem Griechischen (griech. *leukós*; leuchtend, glänzend, hell). Der Begriff der Leukämie subsumiert seit jeher neoplastische Erkrankungen des Blutes bzw. des blutbildenden Systems, die durch eine Proliferation myeloischer oder lymphatischer Blutzellen charakterisiert sind, sich jedoch grundlegend hinsichtlich ihrer Ätiologie, Epidemiologie und Therapie unterscheiden.

1.1 Myeloische Neoplasien

Der erste weltweite Konsensus zur Klassifikation von Erkrankungen der Mastzellen stammt aus dem Jahr 2001 (Jaffe *et al.*, 2001; Valent *et al.*, 2001b). 2008 wurden die *World Health Organization* (WHO)-Kriterien überarbeitet (Horny *et al.*, 2008). Die Mastozytosen wurden in dieser Klassifikation den myeloproliferativen Neoplasien (MPN) zugeordnet. Während sich die Gliederung der Subentitäten der Mastozytose im Vergleich zur vorangegangenen WHO-Klassifikation von 2008 nicht unterscheiden (Vardiman *et al.*, 2009), wird die Mastozytose aufgrund ihrer besonderen klinischen und pathologischen Eigenheiten nach der neuesten WHO-Klassifikation von 2016 als eigene Entität innerhalb der myeloischen Neoplasien geführt (Abbildung 1).

Die aktuell gültige Gliederung klassifiziert neben den Mastozytosen auch Erkrankungen mit Eosinophilie. Als eigene Entität innerhalb der Gruppe myeloischer Neoplasien sind die „myeloischen und lymphatischen Neoplasien mit Eosinophilie und Rearrangierung von *PDGFRA*, *PDGFRB*, *FGFR1*, oder mit *PCM1-JAK2* Fusionsgen“ (MLN-eo) zu nennen, wobei letzteres Fusionsgen als provisorische Entität in die Klassifikation von 2016 aufgenommen wurde (Abbildung 1). Als Subentität ist zudem die chronische Eosinophilenleukämie, *not otherwise specified* (CEL-NOS) den MPN zugeordnet (Horny *et al.*, 2016).

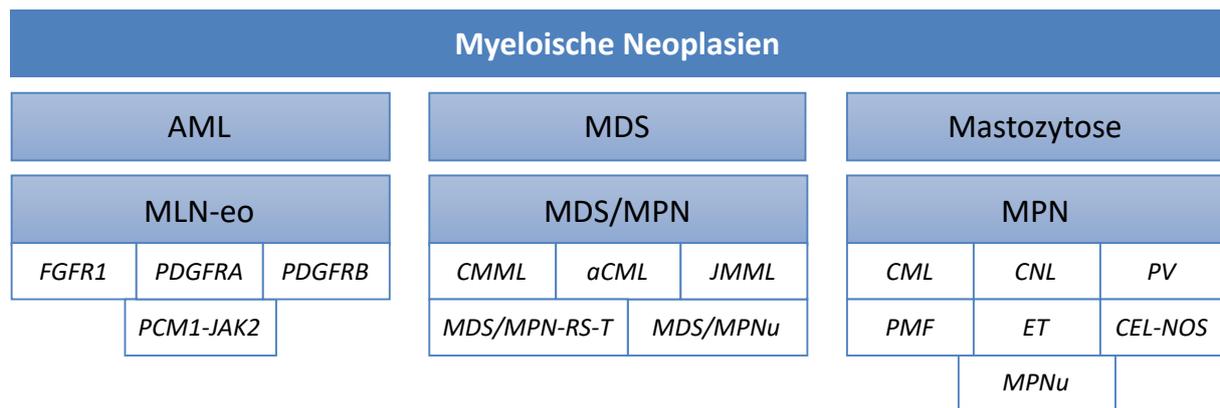


Abbildung 1: Die WHO 2016 Klassifikation der myeloischen Neoplasien.

Abkürzungen: aCML, atypische chronische myeloische Leukämie; AML, akute myeloische Leukämie; CEL-NOS, chronische Eosinophilenleukämie, *not otherwise specified*; CML, chronische myeloische Leukämie; CMML, chronische myelomonozytäre Leukämie; CNL, chronische Neutrophilenleukämie; ET, essentielle Thrombozythämie; JMML, juvenile myelomonozytäre Leukämie; MDS, myelodysplastisches Syndrom; MDS/MPN, myelodysplastische/myeloproliferative Neoplasie; MDS/MPN-RS-T, myelodysplastische/myeloproliferative Neoplasie mit Ringsideroblasten und Thrombozytose; MDS/MPNu, unklassifizierbare myelodysplastische/myeloproliferative Neoplasie; MLN-eo, myeloische und lymphatische Neoplasie mit Eosinophilie und Rearrangierung von *PDGFRA*, *PDGFRB*, *FGFR1* oder mit *PCM1-JAK2* Fusionsgen; MPN, myeloproliferative Neoplasie; MPNu, unklassifizierte myeloproliferative Neoplasie; PMF, primäre Myelofibrose; PV, Polycythaemia vera; WHO, *world health organization*.

1.2 Die Biologie der Mastzelle

Die Mastzelle ist eine Zelle der körpereigenen Immunabwehr und spielt in zahlreichen pathophysiologischen Zusammenhängen eine bedeutende Rolle, wie z.B. bei Immunglobulin E (IgE)-vermittelten Allergien, bei der Urtikaria und bei systemischen Mastozytosen (SM). Zudem wurden Mastzellmediatoren eine wichtige Rolle bei Alterungsprozessen zugesprochen (Gunin *et al.*, 2011).

1.2.1 Entdeckung und Namensgebung der Mastzelle

Die Präsenz granulierter Zellen verschiedener Spezies im sowohl ungefärbten gesunden, aber auch im entzündlichen Bindegewebe geht auf eine Beschreibung von Friedrich von Recklinghausen (Schüler von Rudolf Virchow) im Jahr 1863 zurück (v. Recklinghausen, 1863). Mehrere Jahre später, 1878, beschrieb Paul Ehrlich in seiner Dissertation „Beiträge zur Theorie und Praxis der histologischen Färbung“ Mastzellen in einem mit Anilinfarbstoff angefärbten Bindegewebe (Ehrlich, 1878). Ehrlich vermutete, dass die Granula-reichen Zellen entweder umgebende Zellen mit

Nährstoffen versorgen oder dass die Zellen bei lokal gesteigerten Nährstoffangebot die Fähigkeit zur Phagozytose besitzen. Aufgrund dieser Annahmen prägte er den Begriff „Mastzelle“.

1.2.2 Ontogenese, Differenzierung des Phänotyps und Lokalisation der Mastzelle

Vielfach konnte gezeigt werden, dass sich Mastzellen aus CD34 (*cluster of differentiation*) und CD117 positiven ($CD34^+/CD117^+$) pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen (*hematopoietic stem cell*, HSC) im Knochenmark (KM) entwickeln (Dahlin *et al.*, 2016; Kirshenbaum *et al.*, 1989; Kirshenbaum *et al.*, 1991; Kitamura *et al.*, 1977). Die ersten Mastzell-Progenitorzellen wurden 2005 im Darm und im KM von adulten Mäusen identifiziert (Arinobu *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2005; Jamur *et al.*, 2005). Nicht die ausdifferenzierten Mastzellen emigrieren aus dem KM, sondern die Progenitorzellen, welche kurze Zeit im KM verweilen, um dann temporär im Blutkreislauf zu zirkulieren, bevor sie in das periphere Zielgewebe immigrieren (Gurish und Austen, 2012). Dort findet die Differenzierung zur langlebigen, gewebständigen, 10-15 μm großen Mastzelle mit charakteristischem Phänotyp im Kontext der gewebespezifischen Mediatoren (z.B. *stem cell factor*, SCF; Interleukin-3, -4, -9; Interferon- γ ; *transforming growth factor*, TGF; *nerve growth factor*, NGF; *granulocyte/macrophage colony stimulation factor*, GM-CSF) statt (Marshall, 2004; Okayama und Kawakami, 2006). Charakteristisch sind die schon von Paul Ehrlich beschriebenen zytoplasmatischen Granula der Mastzellen, die verschiedene von den Zellen selbst produzierte Substanzen beherbergen (siehe 1.2.3). Mastzellen finden sich im Gewebe vor allem an den Grenzflächen zur Oberfläche exponiert, womit sie als eine der ersten Zellen eine Immunantwort auf den Kontakt mit Antigenen induzieren (Galli *et al.*, 2005; Galli und Tsai, 2010; Weber *et al.*, 2003). Am häufigsten kommen sie in den Schleimhäuten von Nase, Auge und Gastrointestinaltrakt, sowie in der Haut und in der Lunge vor (Grabbe *et al.*, 1994; Theoharides *et al.*, 2015).

1.2.3 Mediatoren und Funktion der aktivierten Mastzelle

Die aktivierte Mastzelle sezerniert eine Reihe verschiedener Mediatoren, die in Abbildung 2 zusammenfassend dargestellt sind (Komi *et al.*, 2017; Metcalfe, 2008; Theoharides *et al.*, 2015). Dies wird als Degranulation bezeichnet. Man kann dabei

präformierte, in zytoplasmatischen Granula gespeicherte Substanzen von neu produzierten abgrenzen. Einzelne Mediatoren können auch selektiv sezerniert werden (Theoharides *et al.*, 2007). Über die Sekretion von mitochondrialer DNA interagieren sie sowohl autokrin als auch parakrin im Kontext inflammatorischer Reaktionen (Zhang *et al.*, 2012). Zudem transportieren Exosomen von Mastzellen bspw. microRNA und gewinnen damit Einfluss auf die allergische Antwort von Effektor-T-Zellen auf genetischer Ebene (Bryniarski *et al.*, 2013). Als auslösende Faktoren kommen u.a. verschiedenste Bakterien-, Viren- bzw. Pilzstämmen oder Medikamente und endogene Zytokine in Frage.

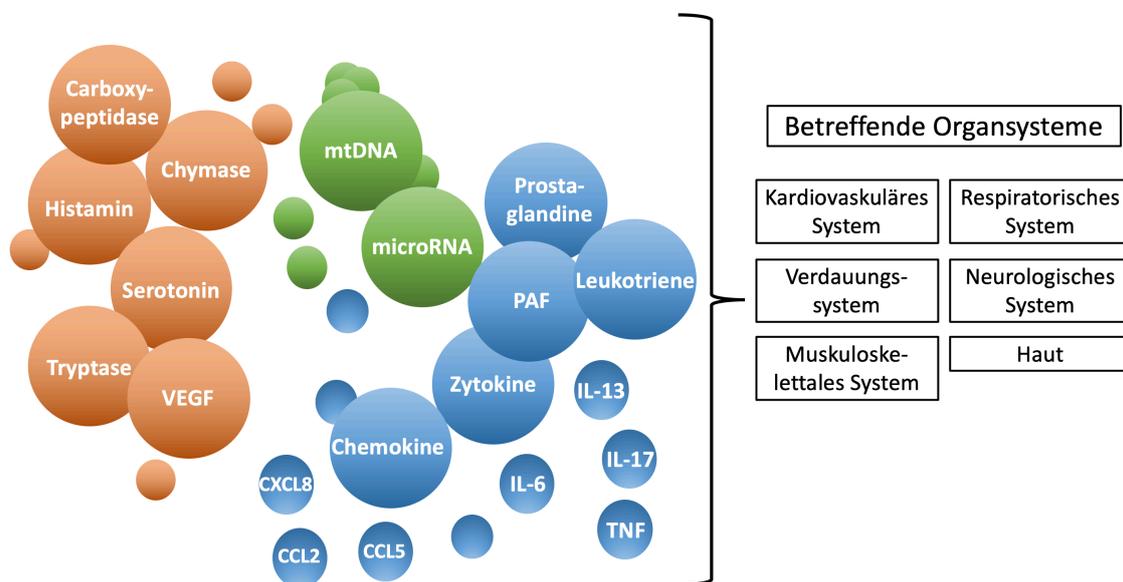


Abbildung 2: Auswahl klinisch relevanter Mediatoren der aktivierten Mastzelle und deren Auswirkungen auf diverse Organsysteme.

In orange illustriert sind präformierte Mediatoren der Mastzelle (u.a. Histamin, Serotonin, VEGF oder Proteasen wie Chymase, Tryptase, Carboxypeptidase), in grün Substanzen, deren Aufbau aus Nukleinbasen besteht (u.a. mtDNA, microRNA) und in blau von den Mastzellen neu zu synthetisierende Mediatoren (u.a. Prostaglandine, Leukotriene, PAF, Zytokine wie IL-6, IL-13, IL-17 oder TNF, Chemokine wie CCL2, CCL5 oder CXCL8). Auf der rechten Seite sind die Organsysteme abgebildet, auf welche die Mediatoren je nach Lokalisation und betreffendem Organsystem unterschiedliche Auswirkungen zeigen.

Abkürzungen: VEGF, *vascular endothelial growth factor*; mtDNA, mitochondriale DNA; IL, Interleukin; TNF, *tumor necrosis factor*.

1.2.4 Färbeverhalten der Mastzelle

Grundlage für das konventionelle Anfärben der Mastzellen waren lange Zeit ausschließlich basische Farbstoffe, die in der Entdeckung des Zelltyps eine große Rolle

gespielt haben. Dazu gehören sowohl die Giemsa-Färbung als auch die Spezialfärbungen mit Toluidinblau und Naphthol-AS-D-Chloracetat-Esterase (CAE). Die Abgrenzung sowohl zwischen typischen und atypischen Mastzellen als auch die Differenzierung gegenüber anderen Entzündungszellen, insbesondere den basophilen Granulozyten, ist anhand dieser Standardfärbemethoden aufgrund der eingeschränkten Spezifität nicht ausreichend. Ergänzend zum Einsatz kommen daher immunhistochemische Verfahren mit monoklonalen Antikörpern, die eine sehr viel spezifischere Markierung der Zellen, z.B. gegen die Tryptase, erlauben. Auch Antikörper gegen CD-Antigene – immunphänotypische Oberflächenmerkmale der Zellen aus Glykoproteinen – kommen zum Einsatz. In Abgrenzung zu basophilen Leukozyten exprimieren Mastzellen CD117, atypische Mastzellen zudem CD2 und CD25 (Horny *et al.*, 1998; Horny und Valent, 2002).

1.3 Mastozytose

1.3.1 Definition und Epidemiologie

Mastozytosen sind eine seltene und heterogene Gruppe von Erkrankungen der hämatopoetischen Stammzelle, gekennzeichnet durch eine pathologisch gesteigerte Mastzell-Proliferation und konsekutive Akkumulation der Mastzellen in einem oder mehreren Organsystemen. Haut und Knochenmark sind am häufigsten betroffen, seltener Milz, Leber, Lymphknoten oder der Gastrointestinaltrakt. Das variable klinische und morphologische Erscheinungsbild bedingt ein weites Spektrum unterschiedlicher Krankheitsentitäten. Grob lassen sich die kutanen Manifestationsformen der Mastozytose, mehrheitlich in der Kindheit diagnostiziert, von den systemischen Formen mit extrakutaner Beteiligung, mehrheitlich bei Erwachsenen, unterscheiden (Escribano *et al.*, 2002; Lennert und Parwaresch, 1979; Metcalfe, 1991; Valent *et al.*, 2003; Valent *et al.*, 2001a).

Die Mastozytose gilt als seltene Erkrankung (*orphan disease*) und tritt fast immer sporadisch auf, nur ganz selten ist sie familiär bedingt (Hartmann *et al.*, 2005; Rosbotham *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 2006). Über einen Beobachtungszeitraum von 13 Jahren (1997-2010) bestimmte eine dänische Forschergruppe die Inzidenz der SM (ungeachtet der Subentität) auf 0,89 pro 100.000 Einwohner pro Jahr (Cohen *et al.*, 2014). In der Metropolregion Rhein-Neckar mit 2,4 Millionen Einwohnern zeigte sich kürzlich eine Inzidenz von 2 Personen pro Jahr und eine Prävalenz von 4,6 auf

1.000.000 Einwohnern bei männlicher Prädominanz (2:1). Frauen waren mit 67,2 Jahren bei Erkrankungsbeginn im Median signifikant jünger als Männer mit 69,5 Jahren ($p = 0,024$) (präliminäre Daten). Die klinische Heterogenität der Erkrankung wird bei Betrachtung der Lebenserwartung der Subentitäten der SM (von indolenten mit normaler und fortgeschrittener Verlaufsformen mit stark reduzierter Lebenserwartung zwischen zwei und vier Jahren) deutlich und weist klinisch auf einen multikausalen Ursprung der hämatologischen Stammzellerkrankung hin (Lim et al., 2009). Die klinisch-phänotypische, prognostische sowie therapeutische Charakterisierung des Erkrankungsbildes SM ist damit ungleich anspruchsvoller als bei vielen anderen myeloischen Neoplasien.

1.3.2 Entstehung und Pathogenese

Extrazelluläre Botenstoffe können über Rezeptor-Tyrosinkinase (RTK) Einfluss auf die Regulation von Zellproliferation, -differenzierung und -überleben gewinnen (Signaltransduktion). Der schematische Aufbau, die Aktivierung und die Signaltransduktion sind in Abbildung 3 gezeigt. Anhand ihrer Proteinstruktur lassen sich RTK in vier verschiedene Typen (Typ I bis Typ IV) einteilen.

Der KIT-Rezeptor (CD117) wird den Typ-III-Rezeptoren zugeordnet (Geissler et al., 1988; Qiu et al., 1988; Yarden et al., 1987). Kodiert wird dieser durch das *KIT*-Gen, einem Protoonkogen. Das *KIT*-Gen liegt auf Position 12 des langen Armes von Chromosom 4 und umfasst 21 Exons (Chabot et al., 1988; Giebel et al., 1992). Der Rezeptor wird von 976 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 145 kDa gebildet und lässt sich im Wesentlichen in drei Areale untergliedern: der Liganden-bindenden, N-terminalen, der glykosylierten Extrazellulärregion mit fünf Immunglobulin (Ig)-ähnlichen Domänen (Masson und Ronnstrand, 2009), der transmembranösen Domäne sowie dem zytoplasmatischen, C-terminalen Anteil mit Juxtamembran- und Tyrosinkinase-Domäne (TKD), welche durch eine ATP-bindende Region sowie einer Phosphotransferase-Domäne konstituiert ist (Mol et al., 2003).

Der entscheidende Wachstumsfaktor für die Proliferation von Mastzellen ist der SCF, welcher den KIT-Signalweg und damit entscheidend Proliferation, Differenzierung, Angiogenese, Migration und Überleben der Mastzellen über die Bindung an den N-terminalen Teil des Tyrosinkinase-Rezeptors (CD117) reguliert (Komi et al., 2017). Das den SCF kodierende Gen liegt auf dem langen Arm des Chromosoms 12 (Geissler et al., 1991). Es kommt eine 31 kDa, membran-gebundene (*membrane-bound form*,

mSCF) sowie eine 18 kDA, lösliche Form des SCF (*soluble SCF*, sSCF) vor, die durch divergierendes Spleißen der *messenger* RNA (mRNA) und anschließender enzymatischer Spaltung entstehen (Anderson *et al.*, 1991; Besmer *et al.*, 1993; Toksoz *et al.*, 1992). Beide Formen üben verschiedene Mechanismen hinsichtlich des Zellüberlebens und der -proliferation aus.

Die Bindung dieser Liganden führt zur Homodimerisierung zweier Rezeptormonomere, woran vor allem die Immunglobulin-ähnlichen Domänen vier und fünf der extrazellulären Einheit des Rezeptors beteiligt sind (Lemmon *et al.*, 1997; Lennartsson und Ronnstrand, 2012; Omura *et al.*, 1997). Die Konformationsänderung des Rezeptors bedingt die Autophosphorylierung der Tyrosylreste. Verschiedene Signaltransduktionsmoleküle können nun an diese phosphorylierten Tyrosylreste binden und dadurch selbst aktiviert werden, um dann ihrerseits auf diverse Effektormoleküle Einfluss zu gewinnen (Lennartsson und Ronnstrand, 2012). Aktiviert werden z.B. die *Pathways* der Januskinase (JAK), der *mitogen-activated protein kinase* (MAPK) und des *signal transducer and activator of transcription* (STAT).

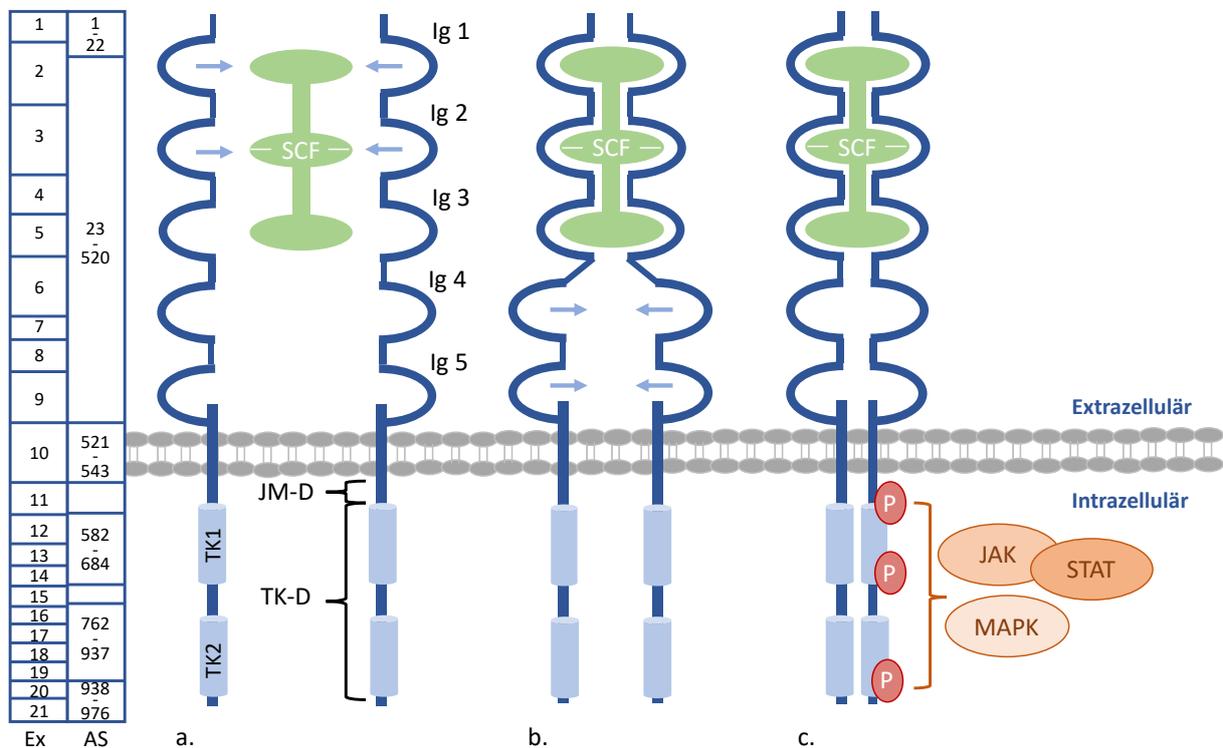


Abbildung 3: Schematischer Aufbau, Aktivierung und Signaltransduktion des KIT-Rezeptors.

a. Es sind zwei inaktive Rezeptormonomere dargestellt. Ein Rezeptormonomer besteht aus fünf extrazellulären, Immunglobulin (Ig)-ähnlichen Domänen, einer in der Zellmembran

verankerten transmembranösen Domäne, einer Juxtamembrandomäne (JM-D) und den Tyrosinkinasedomänen TK1 und TK2 (zusammengefasst Tyrosinkinasedomäne, TK-D).

b. Die Immunglobulin (Ig)-Schleifen 1-3 sind für die Bindung des dimeren Liganden (Stammzellfaktor, SCF) entscheidend.

c. Die Ig-Schleifen 4-5 sind für die Homodimerisierung des Rezeptors zuständig. Nachfolgende *Pathways* (Januskinase, JAK; *mitogen-activated protein kinase*, MAPK; *signal transducer and activator of transcription*, STAT) werden aktiviert und steuern Zellproliferation, -differenzierung und -überleben. Die kodierenden Aminosäuren (AS) und die entsprechenden Exons (Ex) sind links abgebildet.

Abkürzung: P, Phosphat.

Als Treibermutation der SM gilt die Substitution von Valin für Aspartat (D→V) in der Phosphotransferase-Domäne an Codon 816 (Exon 17) des *KIT*-Gens, die konsekutiv zu einer Liganden-unabhängigen Autophosphorylierung von Tyrosinseitenketten im katalytischen Zentrum des Rezeptors führt (Metcalf, 2008). Die aktivierende *KIT* D816V Mutation kann in über 80-90 % der SM-Patienten detektiert werden, unabhängig davon, ob eine indolente (ISM) oder eine fortgeschrittene Variante (*advanced SM*, advSM) der SM vorliegt (Chatterjee *et al.*, 2015; Garcia-Montero *et al.*, 2006; Horny *et al.*, 2007). Die Heterogenität der Erkrankung kann durch die *KIT* D816V Mutation alleine nicht erklärt werden. Bei einem Großteil der Patienten mit advSM lassen sich eine Reihe weiterer somatischer Mutationen (z.B. in *ASXL1*, *SRFS2*, *RUNX1* oder *TET2*) finden (Jawhar *et al.*, 2016c; Schwaab *et al.*, 2013; Verstovsek, 2013).

1.3.3 Klassifikation und Diagnose nach WHO

Eine erste systematische Klassifizierung der Mastzellerkrankung wurde von den Kieler Pathologen Lennert und Parwaresch 1979 vorgenommen (Lennert und Parwaresch, 1979). Die aktuell gültige Klassifikation nach WHO wurde zuletzt 2016 überarbeitet (Horny *et al.*, 2016). Diese findet Darstellung in Tabelle 1.

Tabelle 1: WHO-Klassifikation der Mastozytose.

Kutane Mastozytose (CM)
a. Urticaria pigmentosa (UP)/makulopapulöse kutane Mastozytose (MPCM)
b. Diffuse kutane Mastozytose (DCM)
c. Mastozytom der Haut

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

Mastzellsarkom (MCS)

Tabelle modifiziert nach Arber *et al.*, 2016.

Tabelle 2: Diagnostische WHO-Kriterien der Systemischen Mastozytosen.

Hauptkriterium
a. Histologischer Nachweis multifokaler, dichter Infiltrate von Mastzellen im KM oder in einem extramedullären Organsystem (≥ 15 Mastzellen in entsprechenden Aggregaten)

Nebenkriterium
a. $> 25\%$ aller Mastzellen im kompakten Infiltrat des KM-Ausstriches weisen einen atypischen Phänotyp auf (spindelförmig oder unreif)
b. Detektion der aktivierenden (<i>gain-of-function</i>) <i>KIT</i> D816V Punktmutation
c. Mastzellen im Knochenmark, im Blut oder im extramedullärem Organsystem exprimieren einen abberanten Immunphänotyp: CD25 und/oder CD2
d. Serumtryptase-Spiegel überschreitet 20 ng/ml

B-findings (<i>borderline benign</i>)
a. $> 30\%$ Mastzellinfiltration in Knochenmarksbiopsien und Serumtryptase-Spiegel > 200 ng/ml
b. Zeichen einer Dysplasie oder Proliferation, nicht ausreichend für die Diagnose einer AHN
c. Organomegalie und/oder Lymphadenopathie ohne Funktionseinschränkung

C-findings (<i>consider cytoreduction</i>)
a. Zytopenien (≥ 1) im Blutbild (ANC $< 1,0 \times 10^9/L$, Hb < 10 g/dL oder Thrombozyten $< 100 \times 10^9/L$)
b. Palpable Hepatomegalie mit Leberfunktionsstörung, Aszites und/oder portaler Hypertension
c. Palpable Splenomegalie mit assoziiertem Hypersplenismus
d. Gastrointestinale Mastzellinfiltration mit Malabsorption und Gewichtsverlust
e. Skelettale Beteiligung mit großen Osteolysen und/oder pathologischen Frakturen

Abkürzungen: AHN, assoziierte hämatologische Neoplasie; ANC, Gesamtzahl neutrophiler Granulozyten (engl. *absolute neutrophil count*); Hb, Hämoglobin KM, Knochenmark.

Tabelle modifiziert nach Scherber *et al.*, 2018.

Für die Diagnose einer SM müssen mindestens ein Haupt- und ein Nebenkriterium bzw. mindestens drei Nebenkriterien erfüllt werden (Tabelle 2).

Die ISM ist mit 90% der Fälle die häufigste Variante der systemischen Mastozytose (Horny *et al.*, 2007). Selten kann die Erkrankung in eine advSM (SM mit assoziierter hämatologischer Neoplasie, SM-AHN; aggressive SM, ASM; Mastzelleukämie, MCL) übergehen (Escribano *et al.*, 1998). Das klinische Erscheinungsbild der ISM besteht aus anaphylaktischen Reaktionen, Diarrhoen, Osteoporose mit pathologischen Frakturen, Nahrungsmittelunverträglichkeiten, Pruritus und Flush. Es ist geprägt durch die wiederkehrende Freisetzung von Mastzellmediatoren wie Histamin und Heparin (Valent, 2015).

Bei Vorliegen von mindestens zwei B-findings kann eine schwelende SM (SSM) diagnostiziert werden (Pardanani, 2016).

Die SM-AHN (70-80% der advSM) findet man eher bei älteren Patienten (Scherber und Borate, 2018). Die chronische myelomonozytäre Leukämie (CMML), die myeloproliferative/myelodysplastische Neoplasie (MDS/MPN), die CEL-NOS, das myelodysplastische Syndrom (MDS) und die myeloproliferative Neoplasie (MPN) sind mit der SM typischerweise assoziiert (Damaj *et al.*, 2014; Valent *et al.*, 2001a; Wang *et al.*, 2013). Nur selten differenziert sich die AHN lymphatisch, am häufigsten zeigen sich hier die chronische lymphatische Leukämie (CLL) und das Multiple Myelom (Sotlar *et al.*, 2012). Klinisch zeigt sich abhängig von der assoziierten Neoplasie ein heterogenes Erscheinungsbild mit Veränderungen des Blutbildes (z.B. Monozytose, Eosinophilie, Dysplasie u.a.m.).

Liegt mindestens ein *C-finding* vor, kann eine ASM diagnostiziert werden (Pardanani, 2016). Sie macht 5 % der SM-Subentitäten aus (Horny *et al.*, 2007).

Die MCL ist die seltenste und aggressivste Form der SM (Georgin-Lavialle *et al.*, 2013; Lim *et al.*, 2009). Definiert wird die Erkrankung durch mehr als 20 % Mastzellen im Knochenmarkausstrich. Für die Diagnosestellung einer MCL sind wie bei der SM-AHN keine C-findings erforderlich, liegen aber häufig vor. Finden sich zudem mehr als 10 % atypische Mastzellen im Blut, spricht man von einer leukämischen MCL in Abgrenzung zur sehr viel häufigeren aleukämischen Variante (> 90 %) (Pardanani, 2016). Die chronische MCL ist durch die Abwesenheit von C-findings definiert. Zu 70 % liegt neben der MCL auch eine AHN (MCL-AHN) vor. Als sekundäre MCL (sMCL) bezeichnet man die Progression von ASM bzw. SM-AHN in eine MCL (Jawhar *et al.*, 2017b).

1.3.4 Prognose und Prognosefaktoren

Die Prognose der SM hängt vor allem von der Subentität und deren individuellen klinischen und molekularen Charakteristika ab (Pardanani *et al.*, 2009). Patienten mit ISM zeigen kein signifikant reduziertes Gesamtüberleben im Vergleich zu gesunden Kontrollgruppen, welche in Kriterien wie Geschlecht und Alter übereinstimmen (Lim *et al.*, 2009; Valent *et al.*, 2001a). Bei den advSM – SM-AHN, ASM und MCL – ist die Prognose aufgrund des deutlich aggressiveren Krankheitsverlaufs schlechter (Lim *et al.*, 2009; Pardanani, 2015; Sperr und Valent, 2012; Tefferi und Pardanani, 2004; Valent *et al.*, 2007; Valent *et al.*, 2001a). Bei der SM-AHN ist sie zudem abhängig von der AHN (Wang *et al.*, 2013). So zeigen Patienten mit SM-MPN mit 31 Monaten ein deutlich längeres medianes Überleben als Patienten mit SM-CMML (15 Monate) oder SM-MDS (13 Monate) (Pardanani, 2016). Die MCL zeigt ein medianes Überleben von nur wenigen Monaten (Lim *et al.*, 2009; Noack *et al.*, 2004; Valentini *et al.*, 2008). Die ungünstige Prognose bei MCL wurde kürzlich in einer amerikanischen Kohorte (n = 75) bestätigt (Budnik und Milano, 2019). Nach 12, 36 bzw. 60 Monaten lebten noch 43 %, 23 % bzw. 17 % der Patienten.

Allerdings ist die Diagnosestellung durch die Heterogenität, Multikausalität und Seltenheit der Erkrankung schwierig und oft fehlerhaft, sodass die korrekte Diagnose häufig erst mit erheblicher Verzögerung – bisweilen mehrere Jahre bei indolenten Verläufen – gestellt wird. Das Gesamtüberleben zwischen *de novo* MCL und sMCL unterscheidet sich nicht. Derzeit gibt es keine distinkten Parameter, die das Risiko für eine Progression in eine sMCL vorhersagen können (Jawhar *et al.*, 2017b).

Es sind verschiedene Faktoren bekannt, die das Gesamtüberleben von Patienten mit advSM beeinflussen. Eine erhöhte alkalische Phosphatase (AP), Mutationen im sogenannten S/A/R Gen-Panel (*SRSF2*, *ASXL1*, *RUNX1*) als auch ein ungünstiger Karyotyp sind starke negative prognostische Parameter (Jawhar *et al.*, 2016a; Jawhar *et al.*, 2016c; Naumann *et al.*, 2018b).

1.3.5 Therapie

Das klinisch und morphologisch heterogene Erscheinungsbild der SM bedingt, dass die Therapieentscheidungen individuell dem Allgemeinzustand des Patienten, der klinischen Symptomatik, der Subentität, der Organdysfunktion und den molekularen

Markern angepasst werden müssen. Die indolenten Formen der SM sind häufig bereits durch symptomatische Therapien (u.a. H1- und H2-Blocker, Mastzellstabilisatoren) ausreichend gut eingestellt, während bei den advSM nebst symptomatischer auch häufig eine zytoreduktive Therapie nötig wird. Dabei sind bisher mit unterschiedlichem, häufig aber nur mäßigem Erfolg verschiedenste zytoreduktive Substanzen, inklusive klassischer Chemotherapeutika wie 2-Chlordesoxyadenosin (Cladribin; 2-Cda), Interferon-alpha (Inf- α), Cytarabin oder Fludarabin, verwendet worden (Valent *et al.*, 2017b). Als einzige kurative Therapiemöglichkeit steht heute bei geeignetem Patienten und passendem Spender die allogene Stammzelltransplantation zur Verfügung. Neure Substanzen umfassen Tyrosinkinase-inhibitoren (TKI) wie Midostaurin (PKC 412) und Avapritinib (BLU 285). Bei *KIT* D816V negativen oder unbekanntem Mutationsstatus ist der TKI Imatinib als *first-line* Therapie in den USA zugelassen (Zulassung durch die *Food and Drug Administration*, FDA im Jahr 2006). Die seltenen Varianten *KIT* F522C und *KIT* K509I stellen Ausnahmen dar, in denen Imatinib wirksam ist (Akin *et al.*, 2004; de Melo Campos *et al.*, 2014).

Midostaurin (PKC 412):

Midostaurin ist ein N-Benzoyl-Derivat des Alkaloids Staurosporin, welches aus dem Bakterium *Streptomyces staurosporeus* isoliert werden kann (Funato *et al.*, 1994; Furusaki *et al.*, 1978). Caravatti synthetisierte 1986 als Erster das schwer lösliche Midostaurin (Abbildung 4) mit einem molekularen Gewicht von 570,649 g/mol und einer Halbwertszeit von 471 Stunden (Caravatti *et al.*, 1994).

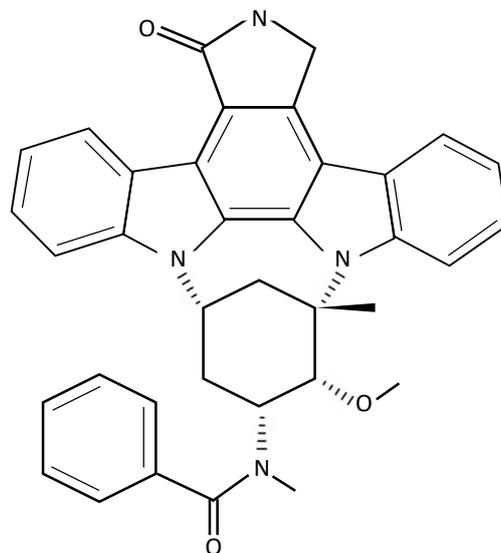


Abbildung 4: Chemische Struktur von Midostaurin (PKC 412).

Midostaurin inhibiert als Multi-Target-Kinase-Inhibitor die katalytischen Domänen diverser RTK, darunter *FLT3*, *PDGFRA/B* (*platelet derived growth factor receptor*), *VEGF* (*vascular endothelial growth factor*), *KIT* – einschließlich der *KIT* D816V Mutation – sowie verschiedene Vertreter der Proteinkinase-C-Serin-Threonin-Kinasen. Es hemmt damit konsekutiv die mitogenen Signale der entsprechenden Wachstumsfaktoren, inhibiert die Proliferation und induziert Apoptose (Fabbro *et al.*, 2000; Gallogly und Lazarus, 2016).

Midostaurin durchlief nach seiner chemischen Synthese verschiedene Entwicklungsstufen, die in Abbildung 5 festgehalten sind. Die ersten *in vivo* Studien zu Midostaurin begannen 1994 und betrachteten vor allem die hemmende Wirkung auf die Proteinkinase C (PKC) in soliden Tumoren und B-Zell-Neoplasien (Eder *et al.*, 2004; Propper *et al.*, 2001; Virchis *et al.*, 2002). Auch wenn die klinischen Studien die vielversprechenden Daten präklinischer Arbeiten nicht belegen konnten, wurden erhebliche Fortschritte in der pharmakokinetischen Analyse des Medikaments vollzogen. Aufgrund der antivaskulären Eigenschaften (inhibiert den VEGF-Rezeptor) wurde es als Angiogenese-Hemmer bei diabetischer Retinopathie zwischen 1999 und 2002 in Studien – allerdings mit nur mäßigem Erfolg – eingesetzt. Eine suffiziente Verbesserung der Sehschärfe und des Makulaödems mit einer ausreichend hohen lokalen Konzentration des Arzneimittels stand im Rahmen einer Systemtherapie den (gastrointestinalen) Nebenwirkungen entgegen (Campochiaro, 2004; Wang *et al.*, 2008).

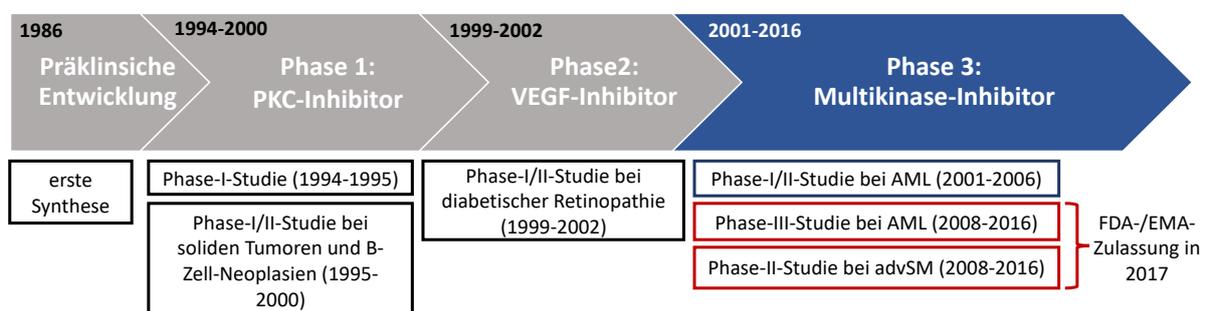


Abbildung 5: Timeline der wesentlichen Entwicklungsstufen von Midostaurin (PKC 412).

Midostaurin wurde ursprünglich als PKC-C Inhibitor entwickelt und pharmakologische Eigenschaften in einer Phase-I-Studie 1994-1995 getestet, bevor es in Phase-I/II-Studien bei Patienten mit soliden Tumoren und B-Zell-Neoplasien zum Einsatz kam. Danach durchlief es Phase-I/II-Studien als VEGF-Inhibitor bei Diabetikern mit Retinopathie (1999-2002). Einen Durchbruch konnte man mit Midostaurin schließlich in der Behandlung der *FLT3* mutierten

AML und der advSM erzielen, die zur Zulassung von Midostaurin durch die *U.S. Food and Drug Administration* (FDA) und *European Medicines Agency* (EMA) im Jahr 2017 geführt hat. Abkürzungen: advSM, *advanced systemic mastocytosis*; AML, akute myeloische Leukämie. Abbildung modifiziert nach Stone *et al.*, 2018.

Bis heute stehen dagegen katalytische Domänen anderer RTK im Vordergrund der Betrachtung. Dazu zählt die *FLT3*-Tyrosinkinase, die entweder infolge von internen Tandemduplikationen (ITD) oder von Punktmutationen im *activation loop* der TKD an den Positionen 835 und 836 Liganden-unabhängig überaktiviert sein kann, und damit anti-apoptotische sowie proliferative Signalwege induziert (Dicker *et al.*, 2010; Hassanein *et al.*, 2016; Naoe und Kiyoi, 2013). Die Blasten differenzieren sich nicht mehr zu funktionsfähigen Zellen des Blutes aus. In der RATIFY-Studie konnte gezeigt werden, dass die zusätzliche Gabe von Midostaurin zu Daunorubicin und Cytarabin das Mortalitätsrisiko bei Patienten mit neu diagnostizierter *FLT3* positiver AML signifikant um 23 % verringert (Stone *et al.*, 2017; Stone *et al.*, 2018).

In einer multizentrischen, einarmigen Phase-II-Studie wurde Midostaurin (100 mg; 2x pro Tag) 116 Patienten mit advSM (ASM, n = 16; SM-AHN, n = 57; MCL, n = 16) bis zur Progression der Erkrankung oder intolerabler Toxizität verabreicht. Die Gesamtansprechrate (ORR, *overall response rate*) als *a priori* definierten Wirksamkeitsendpunkt der 89 Patienten starken primären Population lag bei 60 %, unabhängig vom *KIT*-Mutationsstatus (82 % der Patienten mit positiven Mutationsstatus), der Subentität der advSM oder vorheriger Therapien. Fünfundvierzig Prozent hatten eine deutliche Remission (*major response*), 15 % eine partielle Remission (*partial response*). Von der Auswertung exkludiert wurden Patienten mit nicht messbaren C-findings wie Aszites oder osteolytischen Läsionen. Das mediane Gesamtüberleben (*overall survival*, OS) wurde auf 28,7 Monate bestimmt, wobei das mediane OS bei Patienten mit ASM nicht erreicht wurde und bei MCL-Patienten bei 9,4 Monaten lag. Demgegenüber steht eine zu erwartende Überlebenszeit von 2-6 Monaten im Vergleich zu einer „historischen“ Kontrolle. Das mittlere progressionsfreie Überleben lag insgesamt bei 14,1 Monaten. Zu den häufigsten möglichen unerwünschten Wirkungen gehörten Nausea, Emesis und Diarrhoen. Grad 3/4 Neutropenien, Anämien und Thrombozytopenien traten je zu 24 %, 41 % und 29 % auf. Bei 56 % der Patienten wurde aufgrund dieser Nebenwirkungen die Dosis angepasst, die in 32 % der Fälle wieder auf die Ausgangsdosis erhöht wurde („Re-Eskalation“) (Gotlib *et al.*, 2016).

Midostaurin inhibiert im Gegensatz zu anderen TKI zusätzlich die IgE-abhängige Freisetzung von Histamin aus Mastzellen (Krauth *et al.*, 2009; Peter *et al.*, 2016). Aufgrund der überzeugenden prospektiven Studien wurde Midostaurin mit dem Handelsnamen Rydapt® im April 2017 von der FDA und im September 2017 von der EMA (*European Medicines Agency*) zur Behandlung der advSM (ASM, SM-AHN, MCL) bei erwachsenen Patienten als Monotherapie sowie in Kombinationstherapie bei *FLT3* positiver AML zugelassen. Die übliche Tagesdosis liegt bei der advSM bei 100 mg (4 Kapseln) zweimal täglich, welche vorzugsweise in einem Abstand von 12 Stunden mit einer Mahlzeit einzunehmen sind.

Avapritinib (BLU 285):

Avapritinib (für die chemische Struktur vgl. Abbildung 6) ist ein hochpotenter selektiver Kinase-Inhibitor mit Wirkung gegen die *activation-loop*-Mutationen *KIT* D816V sowie *PDGFRA* D842V (Evans *et al.*, 2017).

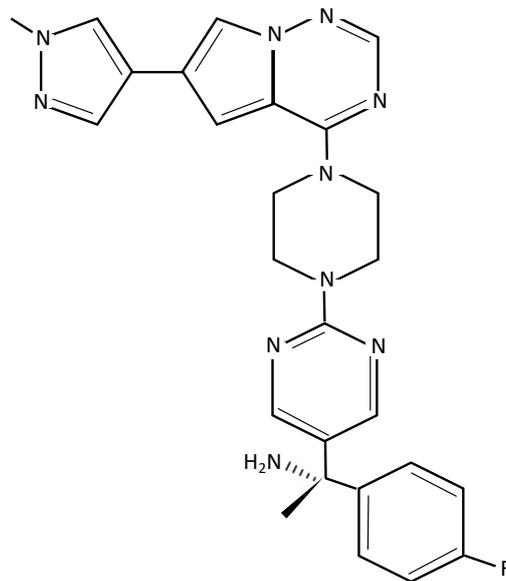


Abbildung 6: Chemische Struktur Avapritinib (BLU 285).

Abbildung modifiziert nach Evans *et al.*, 2017.

Die chemische Wirksamkeit von Avapritinib ist eine Zehnerpotenz höher als die von Midostaurin, wodurch eine stärkere Inhibition bei verbessertem Nebenwirkungsprofil ermöglicht wird. Der Kinombaun illustriert die höhere individuelle Bindungspotenz von Avapritinib im Gegensatz zu Midostaurin bei 3 μM (Abbildung 7). In präklinischen Studien wies Avapritinib vielversprechende Ansätze auf: So hemmt Avapritinib die *KIT* D816V Autophosphorylierung und damit die Phosphorylierung der abhängigen

Substrate Akt und Stat3 in der humanen leukämischen Mastzell-Zelllinie HMC1.2 (*KIT* V560G/D816V). Zudem inhibiert es Proliferation und induziert Apoptose in der Mastrozytom-Zelllinie P815 (*KIT* D816Y) der Maus. Als gut verträgliches, oral bioverfügbares Medikament wurde daraufhin ein *in vivo* P815-Maus-Xenograft-Modell etabliert. Es zeigte sich eine Regression der Tumormasse, welche mit einer Inhibition der *KIT* D816V Autophosphorylierung korrelierte (Evans *et al.*, 2014). In einer klinischen Phase-I-Studie konnte bei 24/30 Patienten die *KIT* D816V Mutation detektiert werden. Avapritinib wurde in einer Konzentration von 30 bis 400 mg einmal täglich verabreicht und wies in allen Konzentrationsdosen eine klinische Aktivität hinsichtlich einer schnellen und dauerhaften Reduktion der Mastzelllast im Knochenmark sowie der *KIT* D816V Allellast auf. Auch konnte eine Reduktion von Hautläsionen, eine Verbesserung der Malabsorption, eine Gewichtszunahme und ein Anstieg des Serumalbumins gezeigt werden. Die häufigsten Nebenwirkungen waren periorbitale Ödeme (43 %), Anämie, Diarrhoe, Fatigue, periphere Ödeme (je 27 %), Kopfschmerzen (23 %), Thrombozytopenie und Übelkeit (je 20 %). Damit konnte die Wirksamkeit von Avapritinib unabhängig von der Subentität der advSM dargelegt werden, auch bei bereits mit Midostaurin vorbehandelten Patienten (Rose, 2018).

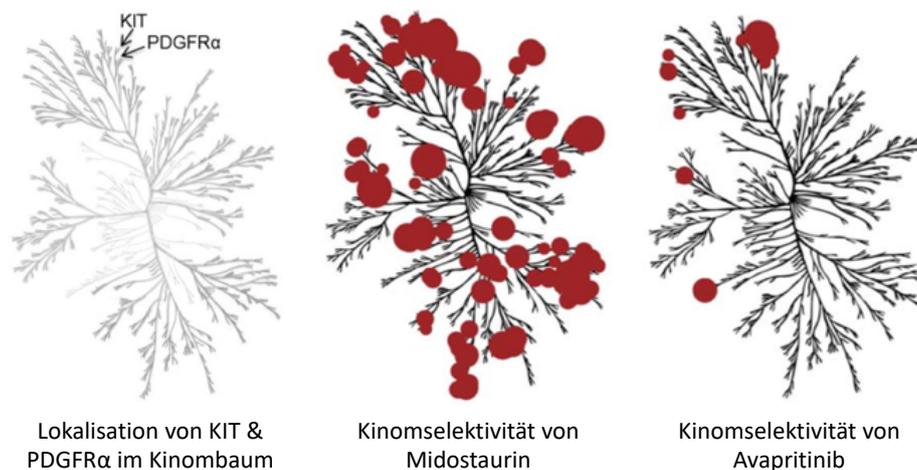


Abbildung 7: Kinomselektivität von Midostaurin (PKC 412) und Avapritinib (BLU 285) im Vergleich.

Das Dendrogramm stellt die Gesamtheit der Kinasen einer Zelle, den Kinombaum, dar. Jeder Ast des Dendrogramms steht für eine individuelle Kinase des Menschen. Avapritinib (BLU 285) hemmt hochpotent die *activation-loop*-Mutationen in *KIT* und *PDGFRα*. Der Kinombaum links illustriert die räumliche Nähe zwischen beiden Kinasen. Die Kinomselektivität (bei 3 μM gescreent) von Midostaurin (PKC 412; mittig) und Avapritinib (rechts) unterscheidet sich erheblich. Die roten Kreise am Kinombaum verdeutlichen die durch die Substanzen gebundenen Kinasen; die Größe der Kreise zeigt die individuelle Bindungspotenz. Die halb-

maximale Inhibition (IC_{50}) des KIT-Rezeptors wird mit Midostaurin bei 2,9 nM erreicht, bei Avapritinib schon bei 0,27 nM.

Abbildung aus Evans *et al.*, 2017.

1.4 Die Biologie des eosinophilen Granulozyten

Der eosinophile Granulozyt wurde frühzeitig und für lange Zeit als Effektorzelle im Endstadium entzündlicher Reaktionen angesehen, welche in Verbindung mit parasitären Manifestationen standen (Butterworth, 1977). Neuere Erkenntnisse, aufgrund immunbiologischer und molekulargenetischer Fortschritte, lassen den Eosinophilen dagegen als multifunktionellen Granulozyten mit breitem Aufgabenfeld klassifizieren.

1.4.1 Entdeckung und Namensgebung des eosinophilen Granulozyten

Die Entdeckung des eosinophilen Granulozyten geht auf Wharton Jones zurück, der ihn 1846 als granulierende Zelle beschrieb. Paul Ehrlich vermochte die eosinophilen Granulozyten mit dem Farbstoff Eosin anzufärben und erwähnte diese erstmalig 1879 auf einem Kongress in Berlin (Kay, 2016).

1.4.2 Ontogenese, Differenzierung und Lokalisation des eosinophilen Granulozyten

Eosinophile Granulozyten entwickeln sich aus pluripotenten, myeloischen Stammzellen, die Zellkolonien (*colony-forming-units*, CFU) bilden, und uni- (CFU-Eosinophile, CFU-eo) oder bipotente (CFU-Eosinophile/Basophile, CFU-eo/ba) Stammzellen hervorbringen. Aus diesen differenzieren sich im Rahmen der Eosinophilopoese zuerst Eosinophiloblasten, bevor es zur Ausbildung des adulten eosinophilen Granulozyten kommt (Denburg *et al.*, 1985). An dieser Entwicklung sind vor allem Transkriptionsfaktoren (z.B. GATA-1, PU.1), Wachstumsfaktoren (IL-5, GM-CSF und IL-3) und wachstumshemmende Zytokine beteiligt (McNagny und Graf, 2002). Die Mobilisation aus dem Knochenmark wird vor allem durch IL-5 und Eotaxin gesteuert (Sanderson, 1992; Valent *et al.*, 2012a). Das Wachstum, Überleben und die Funktion der eosinophilen Granulozyten im peripheren Blut (PB) wird schließlich durch eine Reihe von sogenannten negativen Regulatoren beeinflusst, die als Rezeptoren auf der Zelloberfläche exprimiert sind. Die reife, 12-17 μm große Zelle mit zweigelapptem Nukleus und bikonvexen, azidophilen Granula immigriert unter

physiologischen Umständen mithilfe von Adhäsionsmolekülen in den Thymus, in die Brustdrüse, in den Uterus und vornehmlich in den Gastrointestinaltrakt (Mishra *et al.*, 1999), wo sie mit einer Halbwertszeit von bis zu zwei Wochen eine deutlich längere Lebenszeit erreicht als im PB (ca. 8 Stunden).

1.4.3 Mediatoren und Funktion des eosinophilen Granulozyten

Eosinophile Granulozyten beinhalten in ihren azidophilen Granula im Wesentlichen vier Proteine. Das *Major basic protein* (MBP) macht mehr als die Hälfte der Enzyme der Granula aus und bildet den kristallinen Kern (Weller, 1994). In der Matrix kommt daneben das *Eosinophil cationic protein* (ECP), die *Eosinophil peroxidase* (EPO) und das *Eosinophil-derived neurotoxin* (EDN) vor (Gleich und Adolphson, 1986).

Das in den Granula reifende MBP, ein argininreiches basisches Polypeptid, spielt aufgrund der direkten Toxizität – induziert durch eine erhöhte Permeabilität der Lipiddoppelmembran – in der Bekämpfung parasitärer Infektionen, insbesondere von Helminthen, eine gewichtige Rolle (Wasmoen *et al.*, 1988). ECP zeigt neben antibakterieller Aktivität auch eine unterstützende Wirkung auf die Degranulation der Mastzelle – genau wie MCP (Lehrer *et al.*, 1989; Piliponsky *et al.*, 2001; Venge *et al.*, 1999). Die antibakterielle Aktivität von ECP ist durch die Bildung von transmembranösen Poren gegeben (Young *et al.*, 1986). Das etwa 25 % der Proteine ausmachende EPO katalysiert die Oxidation von Halogeniden (z.B. Brom, Iod), Pseudohalogeniden (Thiocyanat) und Stickoxidverbindungen (Nitrit) zu reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und reaktiven Stickstoffmetaboliten (Agosti *et al.*, 1987; MacPherson *et al.*, 2001; Wu *et al.*, 1999). EDN, wie ECP der Familie der Ribonukelasen zugehörig, zeigt sich als kationisches Toxin ebenfalls antimikrobiell (Gleich *et al.*, 1986).

1.4.4 Biochemische Basis der pathophysiologischen Interaktion zwischen eosinophilen Granulozyten und Mastzellen

In einer Studie zur allergischen Inflammation wurden die immunpathologischen Mechanismen für die Aktivierung von eosinophilen Granulozyten durch die Chymase aus Mastzellen evaluiert. Die Chymase zeigte einen dosisabhängigen Effekt auf die Apoptoserate von eosinophilen Granulozyten und die Freisetzung von Eosinophilen-gereiften Zytokinen (IL-6) und Chemokinen (CXCL8, CCL2, CXCL1), erhöhte die

Oberflächenexpression des Adhäsionsmoleküls CD18 (für Zelladhäsion und Leukodiapedese) und stimulierte die chemokinetische Migration der eosinophilen Granulozyten (Wong *et al.*, 2009).

Umgekehrt gewinnt aber auch der Eosinophile als multifunktionaler Granulozyt im immunmodulierenden Kontext Einfluss auf die Mastzelle. Die Bedeutung des SCF auf Mastzellen hinsichtlich der Reifung, der Proliferation und des Überlebens ist in 1.3 hervorgehoben. Die Inkubation von eosinophilen Granulozyten mit Chymase führt zur Freisetzung des vorgebildeten SCF (Piliponsky *et al.*, 2002). Mastzellen aus humanen Nabelschnurblut schütten unter aktivierender Inkubation von MBP Histamin, PGD-2, GM-CSF, TNF- α und IL-8 aus (Piliponsky *et al.*, 2002). Die Aktivierung der Mastzelle ähnelt dabei der Aktivierung durch andere polybasische Komponenten (Substanz P, Compound 48/80, Bradykinin) (Piliponsky *et al.*, 2001). Neben MBP stimuliert auch ECP, aber nicht EDN, die konzentrationsabhängige Freisetzung von Histamin aus aufgereinigten Mastzellen der Ratte (Zheutlin *et al.*, 1984). Eosinophile Granulozyten bilden und segregieren NGF, welcher in einem autokrinen Mechanismus selbige wiederum stimuliert (Solomon *et al.*, 1998). Das hinsichtlich Differenzierung und Überleben von Neuronen wichtige Neurotrophin NGF begünstigt im Kontext einer immunmodulatorischen Funktion das Überleben und die Aktivierung von Mastzellen (Bullock und Johnson, 1996; Horigome *et al.*, 1994). In einer Art symbiotischen Wechselwirkung kommunizieren damit der eosinophile Granulozyt und die Mastzelle miteinander.

1.5 Eosinophilie

1.5.1 Definition und Epidemiologie

Die eosinophilen Granulozyten machen etwa 3-5 % der Leukozyten im PB aus, absolut sind das 350-500 / μ l (Brigden und Graydon, 1997; Rothenberg, 1998). Bei Werten über dem Grenzwert (> 500 / μ l) spricht man abhängig vom Ausmaß der absoluten Erhöhung der Eosinophilen von einer milden (500-1500 / μ l), mäßigen (1500-5000 / μ l) oder schweren (> 5000 / μ l) Eosinophilie. Eine Hypereosinophilie (HE) ist mit > 1,5 x 10⁹ /L Eosinophilen im PB, bestätigt durch zwei Messungen im einmonatigen Abstand, definiert. Die Eosinophilie kann grundsätzlich in primäre (nicht-reaktive, klonale), sekundäre (reaktive, nicht-klonale) und idiopathische Formen unterschieden

werden (Tefferi *et al.*, 2006). Die Ätiologie der Eosinophilie bedingt das klinische Erscheinungsbild.

Durch Auswertungen der SEER- (Surveillance, Epidemiology and End Results) Datenbank im Zeitraum zwischen 2001 und 2005 konnte unter Verwendung der Rubrik 9964/3 (Hypereosinophiles Syndrom inklusive chronische Eosinophilenleukämie) der internationalen Klassifikation für onkologische Erkrankungen eine alters-adjustierte Inzidenz von 0,036 pro 100.000 Personen pro Jahr bestimmt werden. Auf 1,47 erkrankte Männer kommt eine erkrankte Frau. Das mediane Alter wurde mit 52,5 Jahren bestimmt und die höchste Inzidenz lag zwischen 65 und 74 Jahren (Crane *et al.*, 2010).

1.5.2 Entstehung und Pathogenese

Die Ursache der sekundären, reaktiven Form der Eosinophilie liegt außerhalb der Zelllinie (extrinsisch). Dazu gehören Erkrankungen aus dem atopischen Formenkreis, Infektionen parasitärer, bakterieller, viraler oder auch mykotischer Natur, Autoimmunerkrankungen, Hypersensitivitätsreaktionen auf Medikamente oder Nahrungsmittel, genetische Erkrankungen, Immundefizienzsyndrome u.a.m.

Während bei der *KIT* D816V positiven SM eine eindeutige Treibermutation der Erkrankung diagnostiziert werden kann, finden sich bei primärer Eosinophilie mit intrinsischer Ursache (Ursache innerhalb der Zelllinie) rezurrenente Punktmutationen (bspw. *JAK2*, *STAT5b*) mit dem Hinweis einer zugrunde liegenden myeloischen Erkrankung seltener (Pardanani *et al.*, 2016). Häufiger sind Fusionsgene wie *FIP1L1-PDGFR* auszumachen.

Durch IL-5, IL-3 und GM-CSF aktivierte eosinophile Granulozyten können durch die Freisetzung inflammatorischer Mediatoren (insb. MBP, ECP, EPO, EDN) Organschäden induzieren (Lopez *et al.*, 1992; Weller, 1994).

1.5.3 Klassifikation und Diagnose nach WHO

Eine zusammenfassende Darstellung von Erkrankungen der Eosinophilen ist in Tabelle 3 zu entnehmen. Finden sich im KM > 20 % Eosinophile, liegt im Gewebe nach Beurteilung des Pathologen eine extensive Gewebsinfiltration vor oder findet sich eine ausgeprägte Ablagerung von eosinophilopoetischen Zytokinen, sind die Kriterien einer gewebsspezifischen HE erfüllt. Neben der familiären HE (HE_{FA}) und idiopathischen HE

unklarer Signifikanz (HE_{US}) werden mit der sekundären (HE_R) und primären HE (HE_N) zwei weitere Subentitäten unterschieden. Es handelt sich bei der HE_R und HE_N um prädiagnostische Beurteilungen des Erkrankungsverlaufs, die durch weitere Diagnostik einer finalen Entität zugeordnet werden sollten (Valent *et al.*, 2012b).

Als eigene Entität innerhalb der Gruppe myeloischer Neoplasien sind die MLN-eo zu nennen. Durch Bildung eines Fusionsgens infolge von Deletionen und Translokationen kommt es zu einer konsekutiv aktivierten Tyrosinkinaseaktivität. Das weitaus häufigste Fusionsgen von bisher mehr als 70 entdeckten Tyrosinkinasen-Fusionsgenen entsteht durch eine submikroskopische, 800 kb große Deletion auf Chromosom 4q12, welche das *CHIC2* Gen betrifft (Cools *et al.*, 2003a; Griffin *et al.*, 2003). Die Fusion des *FIP1L1* Gens mit dem *PDGFRA* Gen führt zur Störung der autoinhibitorischen Juxtamembrandomäne von *PDGFRA* mit konstitutiver Aktivierung *PDGFRA*-gekoppelter Signalwege (*gain-of-function*). Die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)-Analytik weist das Fusionsgen indirekt über die *CHIC2* Deletion nach, die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) detektiert das *FIP1L1-PDGFRA* Fusionsgen (Pardanani *et al.*, 2003). Beide Methoden sind gleichwertig. Männer sind deutlich häufiger (> 95 %) von diesem Fusionsgen betroffen als Frauen, die Ursache ist bisher unbekannt (Reiter und Gotlib, 2017). Als Surrogatparameter für das Fusionsgen kann die Serumtryptase dienen, die sich bei *PDGFR* Fusionsgenen mäßig erhöht (15-50 µg/L) zeigt (Klion *et al.*, 2003), weshalb der Ausschluss einer SM differentialdiagnostisch immer sowohl molekulargenetisch als auch histologisch erfolgen sollte. Nachdem sekundäre Ursachen der Eosinophilie sowie das *FIP1L1-PDGFRA* Fusionsgen ausgeschlossen wurden, sollte das Auftreten weiterer rekurrenter Fusionsgene untersucht werden, die durch zytogenetische Aberrationen auf Chromosom 4q12 (*PDGFRA*), 5q31-33 (*PDGFRB*) oder auf 8p11-12 (*FGFR1*) detektiert werden können (Gotlib, 2017; Tefferi *et al.*, 2010). Neben *FIP1L1* sind noch sieben weitere *PDGFRA* Fusionspartner in der Literatur beschrieben: *BCR*, *ETV6*, *KIF5B*, *CDK5RAP2*, *STRN*, *TNKS2* und *FOXP1*. Für *PDGFRB* sind neben dem 1994 initial entdeckten *ETV6-PDGFRB* Fusionsgen, über 30 zusätzliche Fusionspartner identifiziert worden, die eine geringe Prävalenz (< 1 %) aufweisen (Golub *et al.*, 1994; Jawhar *et al.*, 2017a; Reiter und Gotlib, 2017). Die häufigsten *FGFR1* Fusionspartner von über 14 beschriebenen Partnern sind *ZMYM2*, *BCR*, *CNTRL* und *FGFR1OP* (Guasch *et al.*, 2000; Popovici *et al.*, 1999; Xiao *et al.*, 1998). Bei Vorliegen eines

solchen Fusionsgens in IL-3 abhängigen Ba/F3 Zelllinien konnte ein Wachstumsfaktor unabhängiges Wachstum und die Induktion einer myeloproliferativen Neoplasie identifiziert werden (Smedley *et al.*, 1999). Das Fusionsgen *PCM1-JAK2* beruht auf der Translokation t(8;9)(p22;p24) (Murati *et al.*, 2005; Reiter *et al.*, 2005). Die *ETV6-JAK2* und *BCR-JAK2* Fusionsgene sind bisher in nur wenigen Fällen beschrieben worden (Griesinger *et al.*, 2005; He *et al.*, 2016; Peeters *et al.*, 1997).

Eine HE unter Ausschluss oben genannter Fusionsgene sowie weiterer myeloischer Neoplasien (z.B. MPNs, AML, SM) klassifiziert die CEL-NOS.

Am häufigsten ist die klonale Eosinophilie mit myeloproliferativen Neoplasien (MLN-eo) oder myelodysplastischen/myeloproliferativen Neoplasien (MDS/MPN-eo), weniger häufig mit akuten Leukämien (AML) und B- bzw. T-Zell akuten lymphatischen Leukämien (ALL)/lymphoblastischen Lymphomen assoziiert (Tefferi *et al.*, 2010; Valent *et al.*, 2012a).

Eine über sechs Monate bestehende HE mit durch Eosinophilie verursachter Organinfiltration/-schädigung kann als hypereosinophiles Syndrom (HES; primäres HES, HES_N; sekundäres HES, HES_R) diagnostiziert werden. Die Häufigkeit der Diagnose eines HES als Ausschlussdiagnose ist in den letzten Jahren aufgrund der zunehmenden Anzahl an Fällen, bei denen klonale Marker entdeckt werden konnten, deutlich zurückgegangen (Reiter und Gotlib, 2017). Bei fehlendem Organschaden kann die Diagnose einer HE_{US} gestellt werden.

Bei Nachweis eines abnormen T-Zell-Immunphänotyps und/oder einer *in vitro* Th2-Zytokin-Produktion, liegt eine lymphozytäre Form der Hypereosinophilie (L-HES; T-Zell assoziiertes HES) vor, welche nicht in die WHO-Klassifikation aufgenommen wurde, aber häufig in der Literatur beschrieben wird (Arber *et al.*, 2016; Reiter und Gotlib, 2017; Roufosse *et al.*, 2004). Die L-HES vereint klonale und reaktive Prozesse, indem der aberrante T-Zell Klon eosinophilopoetische Wachstumsfaktoren produziert, die zu einer Rekrutierung eosinophiler Granulozyten führt. Immunologisch sind die abnormen T-Zellen durch einen doppelt negativen, unreifen (z.B. CD3⁺CD4⁻CD8⁻) Phänotyp bei regelhaften T-Zell-Rezeptor-Rearrangement charakterisiert (Brugnoni *et al.*, 1996; Cogan *et al.*, 1994; Simon *et al.*, 1996). Zusätzlich zeichnen sich CD3⁻ CD4⁺ Zellen durch eine erhöhte CD5 Expression, einem Verlust vom CD7-Antigen und/oder der Expression von CD27 aus (Bank *et al.*, 2001; Roufosse *et al.*, 2004). Die T-Zellen produzieren ein Typ-2 Zytokin Muster (Roufosse *et al.*, 1999).

Tabelle 3: WHO-Klassifikation von Erkrankungen der Eosinophilen.

Myeloische und lymphatische Neoplasien mit Eosinophilie und Rearrangierung von *PDGFRA*, *PDGFRB*, *FGFR1* oder *PCM1-JAK2* Fusionsgen

Diagnostische Kriterien einer MPN^a mit Eosinophilie, assoziiert mit *FIP1L1-PDGFR A*

- Myeloische oder lymphatische Neoplasie mit prominenter Eosinophilie **und**
- Vorliegen des *FIP1L1-PDGFR A* Fusionsgens oder einer abweichenden Rearrangierung mit *PDGFRA*^b

Diagnostische Kriterien für myeloische/lymphatische Neoplasien, assoziiert mit dem *ETV6-PDGFRB* Fusionsgen oder einer abweichenden Rearrangierung von *PDGFRB*

- Myeloische oder lymphatische Neoplasie, häufig mit prominenter Eosinophilie sowie teilweise bestehender Neutrophilie oder Monozytose **und**
- Anwesenheit der Translokation t(5;12)(q31-q33;p12) oder einer abweichenden Translokation oder der Nachweis der *ETV6-PDGFRB* Fusion oder Rearrangierung von *PDGFRB*

Diagnostische Kriterien einer MPN oder akuten Leukämie mit Eosinophilie, assoziiert mit *FGFR1* Rearrangierung

- Myeloproliferative oder myelodysplastische/myeloproliferative Neoplasie mit prominenter Eosinophilie sowie teilweise bestehender Neutrophilie oder Monozytose **oder**
- Akute myeloische Leukämie oder frühe T- oder B-Zell Vorläufer lymphoblastische(s) Leukämie/Lymphom oder akute Leukämie mit gemischtem Phänotyp (gewöhnlich mit Eosinophilie im PB oder KM assoziiert) **und**
- Vorliegen der Translokation t(8;13)(p11;q12) oder einer abweichenden Translokation, die zu einer Rearrangierung von *FGFR1* in myeloischen, lymphatischen oder beiden Zellreihen führt

Diagnostische Kriterien für myeloische/lymphatische Neoplasien, assoziiert mit dem *PCM1-JAK2* Fusionsgen

- Myeloische oder lymphatische Neoplasie, häufig assoziiert mit prominenter Eosinophilie **und**
- Vorliegen der Translokation t(8;9)(p22;p24.1) oder einer abweichenden Translokation, die zu einer Rearrangierung von *JAK2* führt

CEL-NOS

- Eosinophilie ($> 1,5 \times 10^9 /L$) **und**
- WHO Kriterien der *BCR-ABL1* positiven CML, PV, ET, PMF, CNL, CMML, aCML werden nicht erfüllt **und**
- Keine Rearrangierung von *PDGFRA*, *PDGFRB* oder *FGFR1*, kein *PCM1-JAK2*, *ETV6-JAK2* oder *BCR-JAK2* Fusionsgen **und**
- Anzahl der Blasten im PB oder KM < 20 % sowie Ausschluss der Inversion inv(16)(p13.1q22), der Translokation t(16;16)(p13;q22) und anderer Merkmale der AML **und**
- Vorliegen einer klonalen zytogenetischen bzw. molekularen Aberration, oder Blastenanstieg ≥ 2 % im PB bzw. ≥ 5 % im KM

HES

- Ausschluss einer sekundären (reaktiven) Eosinophilie **und**
- Ausschluss einer L-HES **und**
- Ausschluss einer CEL-NOS **und**

- Ausschluss von durch WHO definierten Neoplasien, welche mit Eosinophilie assoziiert sind (z.B. MDS, MPNs, MDS/MPNs oder AML) **und**
- Ausschluss Eosinophilie-assoziiierter MPNs oder AML/ALL mit Rearrangierung von *PDGFRA*, *PDGFRB* oder *FGFR1*, oder *PCM1-JAK2* Fusionsgen **und**
- Eosinophile $> 1,5 \times 10^9$ /L über sechs Monate bestehend, sowie Organschädigung. Bei fehlender Organschädigung: idiopathische Hypereosinophilie.

^aPatienten mit myeloproliferativer Neoplasie (MPN), akuter myeloischer Leukämie (AML), oder lymphoblastischer/m Leukämie/Lymphom mit Eosinophilie und einem *FIP1L1-PDGFRB* Fusionsgen werden ebenso dieser Kategorie zugeordnet. ^bFalls keine molekulare Analyse durchgeführt werden kann, sollte die Diagnose durch eine möglicherweise bestehende MPN mit hämatologischen Merkmalen einer chronischen Eosinophilenleukämie, *not otherwise specified* (CEL-NOS), welche mit Splenomegalie, einem erhöhten Vitamin-B12 im Serum (i.S.), einem Anstieg der Tryptase i.S. und einer erhöhten Anzahl an Mastzellen im Knochenmark assoziiert ist, erhärtet werden. ^cFälle von Fusionsgenen, die typischerweise nur mit *BCR-ABL1* B-lymphoblastischer/m Leukämie/Lymphom assoziiert sind, sind ausgeschlossen. ^dDa die Translokation t(5;12)(q31~q33;p12) nicht immer zu einem *ETV6-PDGFRB* Fusionsgen führt, ist eine Bestätigung durch molekulare Analysen wünschenswert. Falls keine molekulare Analyse durchgeführt werden kann, sollte die Diagnose durch eine möglicherweise bestehende MPN mit assoziierter Eosinophilie und einer Translokation mit Bruchpunkt bei 5q31~q33 erhärtet werden. ^eAndere Varianten führen zur Fusion von *JAK2* mit den alternativen Partnergenen *ETV6* [t(9;12)(p24.1;p13.2)] oder *BCR* [t(9;22)(p24.1;q11.2)].
Abkürzungen: aCML, atypische chronische myeloische Leukämie; CML, chronische myeloische Leukämie; CMML, chronische myelomonozytäre Leukämie; CNL, chronische Neutrophilenleukämie; ET, essentielle Thrombozythämie; HES, Hypereosinophiles Syndrom; KM, Knochenmark; PB, peripheres Blut; PMF, primäre Myelofibrose; PV, Polycythaemia vera; WHO, *World Health Organization*.

Tabelle modifiziert nach Reiter *et al.*, 2017.

1.5.4 Prognose und Prognosefaktoren

Patienten mit einer HE_{US} sollten auf das *FIP1L1-PDGFRB* Fusionsgen und bei Negativität auf *KIT* D816V und *JAK* V617F Mutationen aufgrund der diagnostischen, prognostischen und therapeutischen Relevanz systematisch gescreent werden. Diese Patienten können einer zielgerichteten Therapie mit einem TKI (Imatinib, Midostaurin bzw. Ruxolitinib) zugeführt werden. Patienten mit den Fusionspartnern *PDGFRA* und *PDGFRB* haben aufgrund des häufigen Ansprechens (> 95-99 %) auf den TKI Imatinib eine sehr gute Prognose (s. 1.6.5).

Patienten mit MLN-eo haben insbesondere bei Detektion eines *FGFR1*-Fusionsgens aufgrund des aggressiven klinischen Verlaufs eine schlechtere Prognose. Innerhalb von 1-2 Jahren kommt es regelhaft zu einer Transformation in eine Blastenphase bzw. eine sekundäre akute Leukämie, die häufiger myeloischer Art ist (Reiter und Gotlib, 2017).

Eine absolute Eosinophilenzahl von $\geq 2 \times 10^9 / \mu\text{L}$ ist bei *KIT* D816V und/oder *JAK* V617F positiven Patienten mit einem signifikant schlechteren Überleben (20 Monate vs. nicht erreicht; $p = 0,002$) verbunden (Schwaab *et al.*, 2015). Die Höhe der absoluten Eosinophilenzahl lässt keine Aussage über die zugrundeliegende Ätiologie (primäre oder sekundärer Eosinophilie) zu (Schwaab *et al.*, 2016).

Die oben genannte Definition des HES geht auf Chusid *et al.* aus dem Jahre 1975 zurück. Von 51/57 Patienten konnten die Überlebensdaten ausgewertet werden, die eine durchschnittliche Überlebenszeit von 9 Monaten zeigten. Dabei überlebten ca. 25 % der Patienten wenigstens zwei Jahre. Blasten im peripheren Blut, eine Leukozytenzahl $> 100.000 / \mu\text{l}$ und eine begleitende kardiale Manifestation der Erkrankung konnten in der Arbeit als negative Prognosemarker identifiziert werden (Chusid *et al.*, 1975). In einer kürzlich erschienenen Publikation aus der *Mayo Clinic* mit 98 eingeschlossenen HES-Patienten erwiesen sich in multivariaten Regressionsanalysen ein Alter > 60 Jahre, ein Hb-Wert < 10 g/dl, eine kardiale Beteiligung und eine Hepatosplenomegalie als Faktoren mit schlechtem Gesamtüberleben. Aus diesen Faktoren etablierte Pardanani *et al.* ein prognostisches Modell für das Gesamtüberleben. In univariaten Analysen zeigten sich zudem eine Leukozytenzahl unter Norm und Mutationen in *TET2*, *ASXL1*, *KIT*, *IDH2*, *JAK2*, *SF3B1* und *TP53* als negative Marker für das Überleben (Pardanani *et al.*, 2016).

Die Prognose für Patienten mit CEL-NOS ist schlecht. Das zeigt sich auch in einer Studie aus dem Jahr 2012, indem das klinische Überleben von zehn Patienten mit CEL-NOS gezeigt worden ist. Das mediane Überleben vom Zeitpunkt der Diagnose betrug 22,2 Monate. Die Hälfte der untersuchten Patienten (50 %) zeigten nach median 20 Monaten (Spannweite 1,6-41,9 Monate) vom Zeitpunkt der Diagnose ausgehend eine Transformation, die nach median 2 Monaten (1,6-6,1 Monate) tödlich verlief (Helbig *et al.*, 2012).

Wenngleich bei L-HES häufig ein indolenter Erkrankungsverlauf beobachtet werden kann, zeigt die seltene Entwicklung eines T-Zell Lymphoms bzw. eines Sézary Syndroms das maligne Potenzial der Erkrankung auf (Lefevre *et al.*, 2014; Roufosse *et al.*, 2004). Eine Progression zum Lymphom können im Verlauf erworbene akkumulierte zytogenetische Veränderungen (z.B. partielle 6q und 10p Deletionen, Trisomie 7) in T-Zellen sowie die Proliferation von Lymphozyten mit CD3⁻ CD4⁺ positiven Phänotyp bedingen (Bank *et al.*, 2001; Brugnani *et al.*, 1997; Kitano *et al.*, 1997; Roufosse *et al.*, 2000).

Die Eosinophilie ($> 350 /\mu\text{l}$) zeigte bei Patienten mit MDS ein signifikant schlechteres Gesamtüberleben ($p < 0,05$) als bei einer Vergleichskohorte mit MDS ohne Eosinophilie ohne die leukämiefreie Zeit zu beeinflussen (Wimazal *et al.*, 2010).

1.5.5 Therapie

*FIP1L1-PDGFR*A positive Patienten werden mit dem TKI Imatinib, in der Regel mit 3 x 100 mg wöchentlich, behandelt (Baccarani *et al.*, 2007; Jovanovic *et al.*, 2007; Legrand *et al.*, 2013; Pardanani *et al.*, 2012). Fast alle Patienten erreichten eine komplette hämatologische und eine molekulare Remission ($> 80-90\%$). Bisher gibt es keine prädiktiven Marker für eine andauernde komplette molekulare Remission, sodass Auslassversuche nicht außerhalb von Studien durchgeführt werden sollten (Reiter und Gotlib, 2017). Analog zum Erwerb der *BCR-ABL1* T315I Mutation bei CML, kann es durch den Erwerb der T674I und D842V Mutation innerhalb der ATP-Bindungsdomäne von *PDGFR*A zu einer Imatinib Resistenz kommen. Auch neuere TKI (Nilotinib, Sorafenib, Midostaurin) zeigen trotz sehr guten *in vitro* Ergebnissen bisher nur eine begrenzte klinische *in vivo* Aktivität gegenüber T674I (Cools *et al.*, 2003b; Lierman *et al.*, 2006; Metzgeroth *et al.*, 2012; Stover *et al.*, 2005). Deshalb sollte die Möglichkeit der allogenen Stammzelltransplantation diskutiert werden.

Analog zum *FIP1L1-PDGFR*A Fusionsgen werden auch *PDGFRB* Fusionsgene mit einer Dosis von 100-400 mg Imatinib täglich behandelt. Sechszwanzig Patienten mit einer Rearrangierung von *PDGFRB* zeigten während einer medianen Verlaufsbeobachtung von 10,2 Jahren und 6,6-jähriger medianer Behandlungsdauer mit Imatinib eine Ansprechrate von 96 % und ein zehnjähriges Gesamtüberleben von 90 %. Kein Patient mit initialer kompletter molekularer Remission verlor sein Ansprechen auf Imatinib im Verlauf (Cheah *et al.*, 2014). In einer weiteren Studie wurde das Überleben von 22 Patienten mit MLN-eo und *PDGFRB* Rearrangierung beschrieben, wobei nur 11/19 (58 %) Patienten eine HE aufwiesen. Unter Imatinib zeigten 17/17 (100 %) Patienten in chronischer Phase nach median zwei Monaten eine hämatologische Remission. Eine komplette zytogenetische bzw. molekulare Remission zeigten nach median zehn bzw. 19 Monaten 12/13 (92 %) bzw. 12/14 (86 %) Patienten. Patienten in Blastenphase ($n = 5$) erhielten eine Kombination aus Imatinib ($n = 5$), intensive Chemotherapie ($n = 3$) und Stammzelltransplantation ($n = 3$). Alle drei stammzelltransplantierten Patienten zeigten ein frühes Rezidiv. Davon wiesen zwei einen komplex-aberranten Karyotyp auf (Jawhar *et al.*, 2017a).

FGFR1-Fusionsgene sind gegenüber Imatinib, Nilotinib und Dasatinib primär resistent. Midostaurin rief bei einem Patienten mit entsprechenden Fusionsgenen ein hämatologisches (nicht zytogenetisches) Ansprechen hervor (Chen *et al.*, 2004). Ein anderer TKI, Ponatinib, induziert die Apoptose und/oder hemmt die Proliferation von *FGFR1*-transformierten Zellen und reduziert damit das klonale Wachstum dieser Zellen in Patienten mit *FGFR1*-Rearrangierung (Chase *et al.*, 2013). Klinisch ist es allerdings nicht wirksam. Empfohlen ist aufgrund des aggressiven Verlaufs und der schlechten Prognose eine intensive Chemotherapie, wenn möglich gefolgt von einer allogenen Stammzelltransplantation. Im Rahmen der Studie INCB054828 wird die Effizienz und Sicherheit des FGFR Inhibitors Pemigatinib bei Patienten mit MLN-eo und *FGFR1*-Rearrangierungen untersucht.

Für die Behandlung einer CEL-NOS besteht kein standardisiertes Vorgehen. Falls klinisch eher eine Leukozytose, Eosinophilie und Splenomegalie im Vordergrund stehen, sollte der Einsatz von Hydroxyurea oder Interferon- α in Betracht gezogen werden (Helbig *et al.*, 2007; Luciano *et al.*, 1999; Quiquandon *et al.*, 1995).

Für Patienten, die mit der Ausschlussdiagnose HES diagnostiziert wurden, bilden Kortikosteroide das Standbein der Therapie. In einer retrospektiven Analyse zeigten 120/141 (85 %) Patienten mit HES bei initialer Monotherapie mit Prednison (mediane Konzentration von 40 mg/d mit Spannweite von 5-625 mg) über eine Zeitdauer von zwei Monaten bis 20 Jahren ein komplettes oder partielles Ansprechen (Ogbogu *et al.*, 2009). Bei Steroid-refraktären Verläufen kann auf Methotrexat, Azathioprin, oder IL-5 Antikörpern (z.B. Mepolizumab), in besonders schweren Fällen auch auf Cyclophosphamid zurückgegriffen werden (Klion, 2015).

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Bestimmung prognostischer Biomarker und neuer Therapieoptionen bei Patienten mit seltenen myeloischen Neoplasien. Dabei werden zwei thematische Schwerpunkte gesetzt.

Die Prognose der advSM ist infaust und der persönliche Leidensdruck der Patienten hoch. Deshalb ist es von großer Bedeutung, Biomarker zu identifizieren, die eine prädiktive Aussage über die wahrscheinliche Wirksamkeit einer Therapie zulassen. Neben dem Multikinase-Inhibitor Midostaurin sind aktuell keine weiteren Substanzen

bei *KIT* D816V positiver advSM durch die FDA bzw. EMA zugelassen. Avapritinib, ein selektiver KIT-Inhibitor, wird in einer Phase-II-Studie unter den Gesichtspunkten der Sicherheit und Effektivität evaluiert. Folgende Fragestellungen wurden in der vorliegenden Arbeit adressiert:

- a. Kann ein auf Einzelzellebene-basierter *in vitro* Kolonie-Assay etabliert werden, der die Wirksamkeit einer *in vivo* Therapie mit Midostaurin für jeden Patienten individuell innerhalb von zwei Wochen extrapoliert? Korrelieren in diesem Fall die klinischen, laborchemischen und molekulargenetischen Parameter der Patienten unter sechsmonatiger *in vivo* Therapie mit Midostaurin mit einem Ansprechen (Reduktion) der Mutationslast von *KIT* D816V positiven Kolonien im *in vitro* Assay?
- b. Wie hoch ist die Wirksamkeit einer *in vitro* Avapritinib-Behandlung? Ist die *in vitro* Inhibition vergleichbar mit der von Midostaurin oder kann gar eine vergleichbar höhere Wirksamkeit des selektiven KIT-Inhibitors auf primäre Patientenzellen festgestellt werden?

Neben der Analyse des *KIT* D816V positiven advSM Patientenkollektivs widmet sich die Arbeit auch der Untersuchung der *STAT5B* N642H Mutation bei Patienten mit Eosinophilie und ohne Nachweis eines Tyrosinkinasefusionsgens. Hier wurden die Antworten auf folgende Fragestellungen gesucht:

- c. Wie hoch ist die Prävalenz der *STAT5B* N642H Mutation?
- d. Können die *STAT5B* N642H positiven Patienten hinsichtlich weiterer Zusatzmutationen in verschiedene Gruppen klassifiziert werden? Unterscheiden sich diese Gruppen hinsichtlich ihres Überlebens? Beeinflusst die Anzahl an Zusatzmutationen das Überleben?
- e. Welche Rolle spielt die *STAT5B* N642H Mutation hinsichtlich der klonalen Mutationshierarchie?

2 Material und Methoden

Im ersten Teil wurden 13 Patienten aufgenommen, welche eine nach WHO-Kriterien (WHO 2016) histologisch und molekularbiologisch gesicherte *KIT* D816V positive (A)SM/MCL \pm AHN Diagnose aufwiesen. Im zweiten Teil wurden aus verschiedenen Zentren 1715 Patienten mit Eosinophilie und Ausschluss eines Fusionsgens eingeschlossen. Davon wurden 195 Patienten in unserem Labor untersucht. Die Proben aus KM oder PB stammten entweder aus der III. Medizinischen Klinik der Universitätsmedizin Mannheim oder von externen Einsendern. Alle Patienten wurden bei Entnahme von KM und/oder PB über den Zweck der Untersuchung aufgeklärt und gaben im Rahmen des deutschlandweiten „Registers für Erkrankungen der Eosinophilen und Mastzellen“, ihr schriftliches Einverständnis für deren Verwendung in Forschungsvorhaben. Patientenproben, die im Wessex Regional Genetics Laboratory in Salisbury aufgearbeitet wurden, unterlagen der Genehmigung durch das National Research Ethics Service (UK) Committee South West.

2.1 Material

2.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Geräte und Verbrauchsmaterialien	Firma	Firmensitz
Biofuge™	Heraeus	Hannau, D
Brutschrank BB 6220	Heraeus	Hannau, 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
Heizblock (Thermomixer compact)	Eppendorf	Hamburg, D
Laborfuge 400e	Heraeus	Hanau, D
LaminAir® Werkbank LB-48C	Heraeus	Hanau, D
Leucosep™ Röhrchen	Grainer Bio-One GmbH	Frickenhausen, D
LightCycler® 1.0 und 1.5	Roche Diagnostics	Mannheim, D
LightCycler® Carousel Zentrifuge	Roche Diagnostics	Mannheim, D
Maxwell® 16 LEV	Promega	Mannheim, D
Mikroskop DMLS	Leica	Bensheim, D
Mikroskop JenavalOpton ID02	Zeiss	Oberkochen, D
Molecular Imager® ChemiDoc™ XRS+	BioRad Laboratories GmbH	München, D
Nanodrop® ND-1000	NanoDrop®	Wilmington, USA

Neubauer-Zählkammer	Brand-GmbH	Wertheim, D
Pipettierhilfe (Pipetus®)	Hirschmann-Laborgeräte	Eberstadt, D
Power Supply, Model 200/2.0	BioRad Laboratories GmbH	München, D
Sterilwerkbank Herasafe KS	Thermo Fisher Scientific, Inc.	Waltham, USA
Stickstofftank	Worthington Industries	Columbus, USA
Thermocycler Mastercycler®	Eppendorf AG	Hamburg, D
(Fein-) Waagen	Sartorius	Göttingen, D
Wasserbad (SW20C)	Julabo Labortechnik GmbH	Seelbach, D
Werkbank (Herasafe sterile)	Heraeus	Hannau, D
Zentrifuge MiniStar	VWR International GmbH	Darmstadt, D
Zentrifugeneinsätze	Heraeus	Hannau, D

2.1.2 Chemikalien

Chemikalie	Firma	Firmensitz
Agarose	Biozym	Oldendorf, D
Ammoniumbicarbonat	Sigma-Aldrich	Gelenau, D
Ammoniumchlorid	Sigma-Aldrich	Gelenau, D
Chloroform (100 %)	Merck Chemicals GmbH	Darmstadt, D
ddH ₂ O (Aqua ad iniectabilia)	B. Braun	Melsungen, D
DEPC	Sigma-Aldrich	Gelenau, D
DMSO	Sigma-Aldrich	Gelenau, D
DNAse	Stemcell Technologies	Köln, D
EDTA	Sigma-Aldrich	Gelenau, D
Ethanol absolut	VWR International GmbH	Darmstadt, D
Ficoll-Paque™ Premium	GE Healthcare Europe	Freiburg, D
Fötales Kälberserum (FKS)	Thermo Fisher Scientific, Inc.	Darmstadt, D
GIT (Guanidine thiocyanate)	Sigma-Aldrich	Gelenau, D
MethoCult™ GF H4534 StemCell	Stemcell Technologies	Köln, D
Natriumcitrat	Sigma-Aldrich	Gelenau, D
PBS-Tabletten	Sigma-Aldrich	Gelenau, D
Rnasin®	Promega	Mannheim, D
RPMI-1640	Sigma-Aldrich	Gelenau, D
SYBR® Safe	Thermo Fisher Scientific, Inc.	Darmstadt, D
Thioglycerol	Promega	Mannheim, D
TRizol®	Thermo Fisher Scientific, Inc.	Darmstadt, D

2.1.3 Enzyme

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

2.1.4 Gebrauchsfertige Reaktionssysteme

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

2.1.5 Software

Software	Firma	Firmensitz
LightCycler [™] Systems	Roche Diagnostics	Mannheim, D
Microsoft [®] Office [™] 360	Microsoft	Washington, USA
SPSS Statistics 23	IBM	Armonk, USA
GraphPad Prism 6	GraphPad Software, Inc.	La Jolla, USA
Ikaros	MetaSystems	Altlussheim, D
Isis	MetaSystems	Altlussheim, D
Adobe [®] Photoshop [®] 7.0	Adope Systems Inc.	Delaware, USA
Software ImageLab [™] 3.0.1	BioRad Laboratories GmbH	München, D

2.1.6 Puffer und Lösungen

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
100-Basenpaar-Marker	200 µl DNA Molecular Weight Marker XIV – 100 bp ladder 440 µl ddH ₂ O 250 µl Ladepuffer 1 10 µl 0,5 M EDTA; pH 8 100 µl 10x RXN Buffer
10x Lysispuffer	82,91 g NH ₄ Cl [1,55 M] 7,91 g NH ₄ HCO ₃ [0,1 M] 2 ml EDTA pH 8 [0,5 M]
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

Material und Methoden

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 MgCl ₂ 100 mM DTT 200 U/μl M-MLV 200 μg/ml P(dN) ₆ Primer 1,9 mM dNTP-Mix 1,4x 10 ⁴ U/ml M-MLC Reverse Transkriptase 1400 U/ml Rnasin
Ladepuffer 1	5 ml Aqua iniectionabilia 5 ml Glycerin 1 Spatelspitze Bromphenolblau
Ladepuffer 2	125 mg Bromphenolblau 7,5 g Ficoll-Paque® 50 ml ddH ₂ O
Phosphatpuffer	11,4 g Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O 4,9 g KH ₂ PO ₄

2.2 Methoden

Die Fragestellungen des advSM-Patientenkollektivs werden durch das Studiendesign in Abbildung 8 adressiert. Eine Übersicht der methodischen Vorgehensweise (2.2.2-2.2.16) ist in Abbildung 23 im Anhang dargestellt.

Zur Beantwortung der Fragestellungen bezüglich *STAT5B* bei Patienten mit Eosinophilie wurde die in 2.2.16-2.2.18 beschriebene Methodik angewendet.

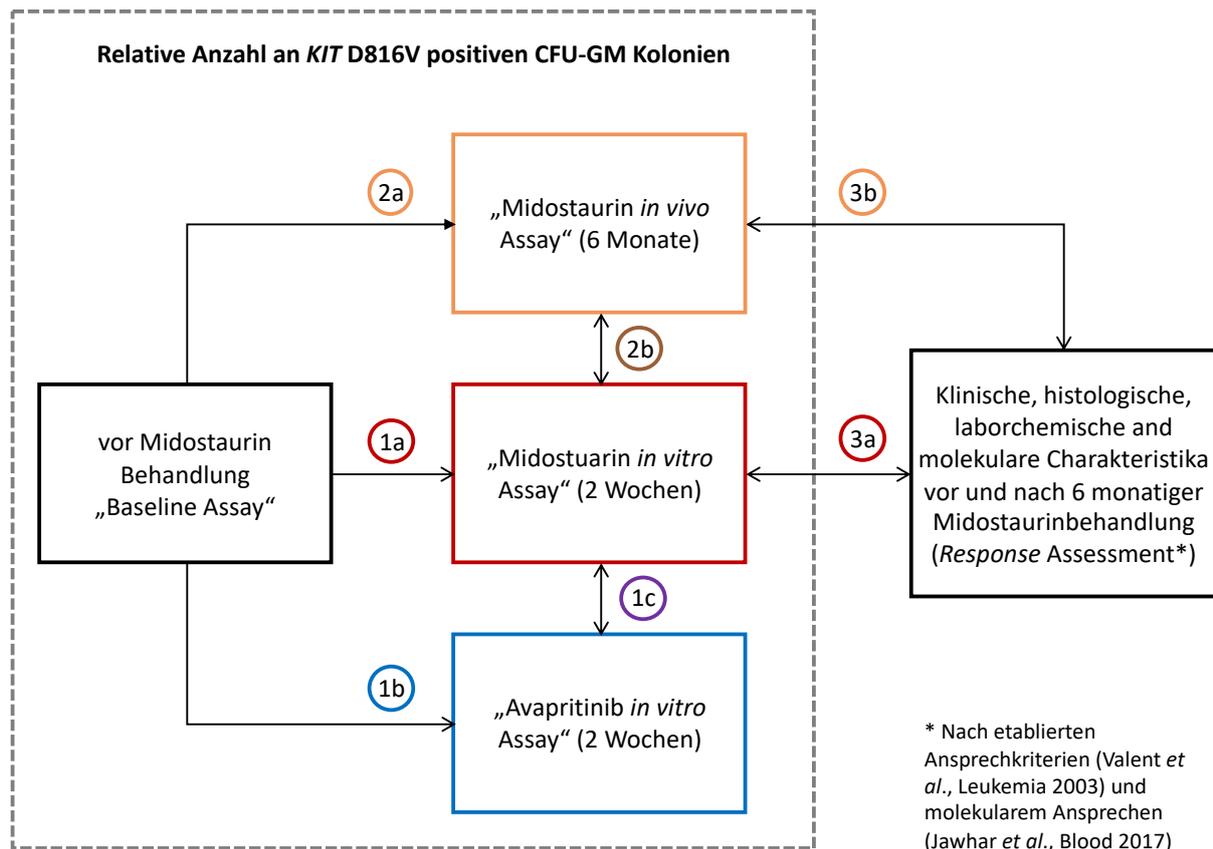


Abbildung 8: Studiendesign des advSM-Patientenkollektivs.

Durch Differenzierung entwickeln sich aus der bipotenten hämatopoetischen Stammzelle CFU-GM die morphologisch unterscheidbaren Vorstufen („Blasten“) der Granulopoese und der Monopoese. Die durch die Dichtegradientenzentrifugation gewonnenen mononukleären Zellen werden für die *in vitro* Kultivierung verwendet.

Vergleich (→) oder Korrelation (↔) der relativen Reduktion KIT D816V positiver CFU-GM Kolonien zwischen dem „Baseline Assay“ versus dem „Midostaurin *in vitro* Assay“ (1a) bzw. dem „Avapritinib *in vitro* Assay“ (1b), dem „Midostaurin *in vitro* Assay“ versus dem „Avapritinib *in vitro* Assay“ (1c), dem „Baseline Assay“ versus dem „Midostaurin *in vivo* Assay“ (2a), dem „Midostaurin *in vivo* Assay“ versus dem „Midostaurin *in vitro* Assay“ (2b), sowie dem etablierten *Response Assessment* nach sechsmonatiger Midostaurintherapie (inklusive dem Patientenprofil zugehörigen klinischen, histologischen, laborchemischen und molekularen Charakteristika) versus dem „Midostaurin *in vitro* Assay“ (3a) bzw. versus dem „Midostaurin *in vivo* Assay“ (3b).

Abkürzung: CFU-GM, *colony-forming-unit-granulocyte-macrophage*.

Abbildung modifiziert nach Lübke *et al.*, 2019.

2.2.1 Isolierung mononukleärer Zellen aus Knochenmark

Für das Kultivieren von *colony-forming-unit-granulocyte-macrophage* (CFU-GM) wurden mononukleäre Zellen (MNC; Lymphozyten, Monozyten und Blasten) aus dem KM von Patienten mit advSM isoliert. Zur Isolation von MNC gibt es verschiedene Methoden. Hier wurde die Methode der Dichtegradientenzentrifugation mithilfe des

Separationsmediums Ficoll – einem Saccharose-Epichlorhydrin-Copolymer – angewandt.

Das physikalische Trennverfahren mittels Ficoll beruht auf der Sedimentation der Zellen in einem Dichtegradienten. Die Ficoll-Dichte beträgt 1,077 g/ml (Abbildung 9). Die Separation erfolgt mithilfe von Leucosep-Röhrchen. In die Zentrifugenröhrchen aus hochtransparentem Polypropylen ist eine poröse Trennscheibe aus Polyethylen eingesetzt. Dadurch kann antikoaguliertes KM vorsichtig auf das Ficoll geschichtet werden. Bei der anschließenden Zentrifugation separieren sich nun die MNC von den polymorphkernigen Zellen und Erythrozyten. Erythrozyten sedimentieren auf den Boden der Leucosep-Röhrchen. Die Granulozyten schichten sich zwischen den Erythrozyten und dem Separationsmedium. MNC und Thrombozyten reichern sich in einer Interphase zwischen Plasmafraktion und Ficollschicht an.

Zur Vorbereitung werden Leucosep-Röhrchen mit 15 ml Ficoll-Plaque™ befüllt und bei Raumtemperatur mit 2300 rpm für 1 Minute mit Bremse zentrifugiert, sodass das Ficoll unter die Trennscheibe diffundiert. Maximal 10 ml Heparin-KM werden mit sterilem PBS (*Phosphate buffered saline*) auf 30 ml verdünnt. Nachdem das verdünnte Probenmaterial vorsichtig auf das Separationsmedium pipettiert wurde, erfolgt die Zentrifugation bei 2300 rpm für 10 min im Ausschwingrotor ohne Bremse. Die Plasmafraktion wird bis auf eine Schichtdicke von 5-10 mm abgehoben und verworfen, sodass die in einer Interphase angereicherte Zellfraktion unter Zuhilfenahme einer Pasteurpipette abpipettiert und in ein frisches Zentrifugenröhrchen gegeben werden kann. Zum Waschen werden 25 ml PBS in das frische Zentrifugenröhrchen dazugegeben und bei 1200 rpm 10 min mit Bremse zentrifugiert; der Überstand wird wiederum abgehoben. Die Zugabe von 10 ml kaltem Lyse-Puffer und fünfminütiger Inkubation auf Eis erfolgt, um eventuell nicht von der Trennscheibe zurückgehaltene Erythrozyten zu beseitigen. Ein erneuter Waschschrift mit 30 ml PBS (1200 rpm; 10 min; 4 °C) stoppt die Reaktion ab. Das entstandene Zellpellet wird mit 1-2 ml PBS resuspendiert. Die MNC werden zur Kultivierung nach Bestimmung der Lebendzellzahl in MethoCult™ aufgenommen oder vital eingefroren.

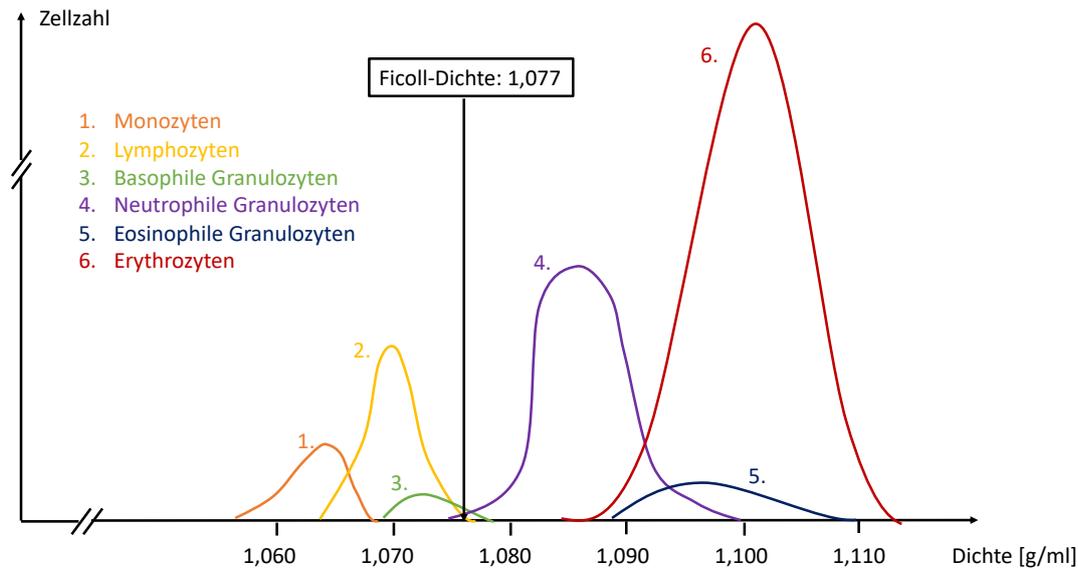


Abbildung 9: Isolierung von mononukleären Zellen aus Knochenmark.

Darstellung der Verteilung der Blutzellen aufgeschlüsselt nach ihrer Dichte bei der Dichtegradientenzentrifugation mithilfe von Ficoll.

2.2.2 Kryokonservierung

MNC, die nicht direkt im Rahmen des CFU-GM Assay zur Kultivierung in MethoCult™ aufgenommen wurden, konnten vital im Stickstofftank asserviert werden. Zur Asservierung in Kryoröhrchen wurden zunächst $2-5 \times 10^7$ Zellen in 0,5 ml RPMI 1640 (ohne Zusätze) mit 0,5 ml Einfriermedium (FKS, RPMI 1640 und DMSO im Verhältnis 3:1:1) über Nacht in einem Einfrierbehälter mit Isopropanol auf -20 °C schonend runtergekühlt. Zur langfristigen Lagerung wird das Kryoröhrchen dann im Tank mit flüssigem Stickstoff bei -196 °C gelagert.

2.2.3 Auftauen der Zellen

Die im Stickstoff asservierten MNC wurden zunächst in einem auf 37 °C erwärmtes Wasserbad aufgetaut. Hiernach wurden die aufgetauten Zellen in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt, welchem tropfenweise unter beständigem Schütteln 15 ml kaltes RPMI mit Zusätzen (FKS) sowie $300\text{ }\mu\text{l}$ DNase hinzugegeben wurde. Ergänzend kamen 20 ml RPMI mit Zusätzen (FKS) hinzu. Die anschließende Zentrifugation mit 1200 rpm für 10 min bei Raumtemperatur führt zur Sedimentation der MNC. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 0,5 bis 1 ml RPMI 1640 resuspendiert.

2.2.4 Bestimmen der Lebendzellzahl

Zur Bestimmung der Lebendzellzahl wurden 10 μl der Zellsuspension mit 990 μL Trypanblau vermischt (1:100). Trypanblau färbt abgestorbene Zellen an. Lebende Zellen mit intakter Zellmembran nehmen die Farbe nicht auf. Die Zellsuspension wurde mithilfe eines Laborschüttlers gemischt und die MNC mit einer Neubauer-Zählkammer manuell lichtmikroskopisch quantifiziert. Gezählt wurden die intakten Zellen (ungefärbt). Ausgezählt wurden 4 Großquadrate mit jeweils 16 Gruppenquadraten (Abbildung 10). Die Höhe zwischen Unterseite des Deckglases und Zählnetz beträgt 0,1 mm; die Großquadrate haben eine Seitenlänge von 1 mm. Damit ergibt sich für das ausgezählte Volumen pro Großquadrat: $(1 \text{ mm} \times 1 \text{ mm}) \times 0,1 \text{ mm} = 0,1 \text{ mm}^3 = 100 \text{ nl} = 1 \times 10^{-4} \text{ ml}$. Es resultiert für die Bestimmung der Lebendzellzahl folgender Zusammenhang: Mittelwert der 4 Großquadranten (mit jeweils 16 Gruppenquadranten) $\times (1/10^4) \times 10^2$ (Verdünnungsfaktor).

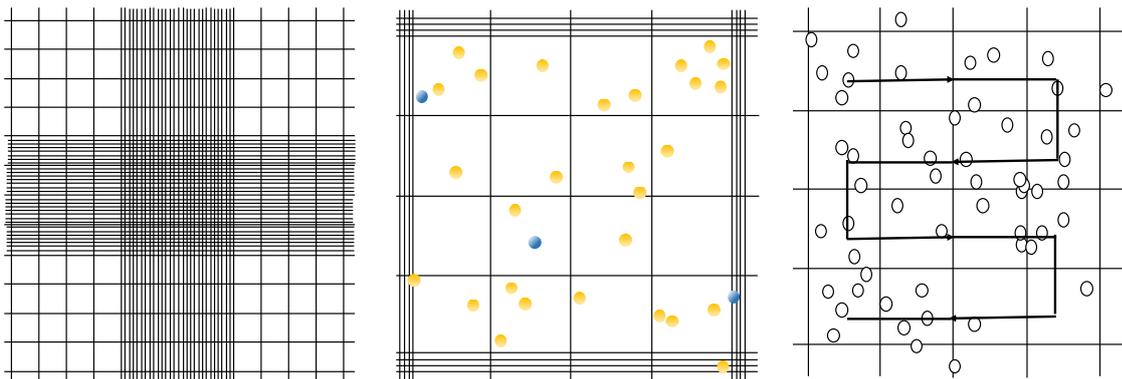


Abbildung 10: Bestimmung der Lebendzellzahl.

Übersichtsdarstellung des Zählnetzes nach Neubauer (links), eines Großquadrates mit ungefärbten (gelb markierten) und gefärbten (blau markierten) Zellen auf dem Zählnetz (mittig) sowie der serpentinartigen Auszählweise eines Großquadranten (rechts).

2.2.5 CFU-GM Assay

Durch Differenzierung entwickeln sich aus der bipotenten HSC CFU-GM die morphologisch unterscheidbaren Vorstufen („Blasten“) der Granulopoese und der Monopoese. Die durch die Dichtegradientenzentrifugation gewonnenen MNC werden für die *in vitro* Kultivierung verwendet. Die einzelnen etablierten Assay finden Darstellung in Abbildung 8. Der CFU-GM-Assay wurde wie in Iscove *et al.* modifiziert durchgeführt (Iscove *et al.*, 1974).

In einer seriellen Verdünnungsreihe mit dem Verdünnungsfaktor 1000 wurde die Ausgangskonzentration von Avapritinib auf $10\ \mu\text{M}$ verdünnt. Die Ausgangskonzentration von Midostaurin betrug $1\ \text{mM}$. Zur Konzentrationsfindung einer optimalen Reduktion von *KIT* D816V positiven Kolonien bei erhaltenem guten Zellwachstum wurden jene mit $100\text{-}1000\ \text{nM}$ Midostaurin bzw. mit $22\text{-}90\ \text{nM}$ Avapritinib behandelt. Distinkte Resultate konnten bei Einsatz von $600\ \text{nM}$ Midostaurin und $75\ \text{nM}$ Avapritinib gesehen werden, die damit als Standarddosis für die Behandlung der Kolonien definiert wurde. Da für die *in vitro* Kultivierung eines CFU-GM Assay insgesamt je $3000\ \mu\text{l}$ semisoliden Methylcellulose-Medium MethoCult™ ($100\ \text{ng/ml}$) verwendet wurde, ergab sich bei einer gewünschten Konzentration von $75\ \text{nM} = 0,075\ \mu\text{M}$, ein benötigtes Volumen V von $22,5\ \mu\text{M}$ (Ansatz: $V \times 10\ \mu\text{M} = 3000\ \mu\text{l} \times 0,075\ \mu\text{M}$). Bei einer gewünschten Konzentration von $600\ \text{nM}$ Midostaurin wurden $1,8\ \mu\text{l}$ Volumen eingesetzt.

Für die *in vitro* Kultivierung wurde das semisoliden Methylcellulose-Medium MethoCult™ GF H4534 verwendet. Die Zusammensetzung ist unten aufgeschlüsselt. In $1\ \text{ml}$ MethoCult™ wurden auf eine $35\ \text{mm}$ große Petrischale 1×10^5 MNC ausgesät, die je nach Assay mit den vorgenannten Medikamenten beimpft wurden.

Für jeden Ansatz wurden zwei Petrischalen kultiviert. Für 14 Tage erfolgte die Kultivierung im Brutschrank bei befeuchteter Umgebung mit einer Temperatur von $37\ ^\circ\text{C}$ und $5\ \%$ CO_2 Gehalt. Im Rahmen der Granulopoese bzw. der Monopoese

entwickeln sich im semisoliden MethoCult™ aus den „Blasten“ Granulozyten- bzw. Monozyten-Kolonien, die mithilfe einer Glaspipette aus der Petrischale unter einem inversen Mikroskop – lässt genügend Arbeitsabstand für Mikromanipulationen – isoliert werden konnten (Abbildung 11).

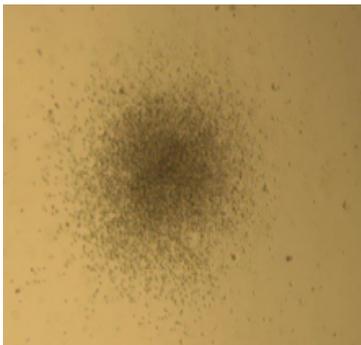


Abbildung 11: Aufsicht auf eine CFU-GM-Kolonie unter 100x Vergrößerung.

Die geernteten Kolonien wurden hiernach den $1,5\ \text{ml}$ großen Eppendorf-PCR-Tubes hinzugegeben, in denen zuvor jeweils $100\ \mu\text{l}$ PBS vorgelegt wurden. Bei $1500\ \text{rpm}$ wurden die Zellen für $3\ \text{min}$ abzentrifugiert und der Überstand bis auf $10\text{-}20\ \mu\text{l}$ abgehoben. Nun konnten die Zellen bei $-80\ ^\circ\text{C}$ zwischengelagert werden oder es folgte direkt anschließend die Amplifikation der Kolonie-DNA.

2.2.6 Amplifikation von Kolonie-DNA

Das REPLI-g® Mini KIT wurde für die Gesamt-Genom Amplifizierung der Kolonie-DNA verwendet.

Die DNA wurde durch ein Lysepuffer extrahiert. Hinzugegeben wurde im Anschluss der Denaturierungspuffer D2, der aus den Komponenten DTT (1 M) und DLB besteht (Tabelle 4).

Tabelle 4: Ansatz des Denaturierungspuffers D2.

Komponente	Volumen
DTT, 1 M	5 µl
DLB Puffer (500 µl Nuclease-freies Wasser hinzugesetzt)	55 µl
Gesamtvolumen	60 µl (für ca. 15 Reaktionen ausreichend)

In 0,5 ml großen Eppendorf-PCR-*Tubes* wurde 5 µl der Kolonie-DNA vorgelegt, hinzugefügt werden 3,5 µl des hergestellten Denaturierungspuffers D2. Es folgte die zehnmütige Inkubation auf Eis, die durch Zugabe von 3,5 µl der Stopplösung beendet werden konnte. Zu jeder Probe wurden 40 µl des angesetzten Master-Mix (Tabelle 5) hinzugesetzt.

Tabelle 5: Ansatz des Master-Mix.

Komponente	Volumen
Nuclease-freies Wasser	19 µl
REPLI-g Mini Reaktionspuffer	20 µl
REPLI-g Mini DNA Polymerase (auf Eis)	1 µl
Gesamtvolumen	40 µl

Die Amplifikation erfolgte im Thermocycler Mastercycler® bei 30 °C für 12 h; die REPLI-g Mini DNA Polymerase wurde im Anschluss bei 65 °C für 3 min inaktiviert. Das amplifizierte Gesamt-Genom konnte nun zur kurzzeitigen Lagerung bei 4 °C bzw. zur langfristigen Lagerung bei -20 °C zur weiteren Bearbeitung aufbewahrt werden.

2.2.7 Qualitätskontrolle der DNA

Die Qualitätskontrolle der DNA erfolgte mittels Nanodrop® ND-1000, einem Mikrovolumen-Spektralphotometer und -Fluorometer, und der dazugehörigen Software ND 1000 3.3. Dieser ermöglicht eine DNA-Quantifizierung und eine Aussage zur Reinheit der DNA durch die Bestimmung der optischen Dichte. Benötigt werden dazu 2 µl der Probenmenge, die auf den unteren Messträger pipettiert werden. Durch Verschließen des Probenarms mit dem oberen Messträger kann die spektralphotometrische Messung erfolgen.

Initial erfolgt die Nullwert-Bestimmung mittels Nuclease-freien Wassers („Blank“). Die DNA-Konzentration wird durch das Absorptionsvermögen der Probe bei einer Wellenlänge von 260 nm in ng/µl angegeben. Das Verhältnis der Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm (DNA) zu 280 nm (Detektion von Proteinen und Phenolen) oder 260/230 (Detektion organischer Substanzen) erlaubt Rückschlüsse auf die Reinheit der DNA, welche idealerweise bei 1,8 liegen sollte. In dieser Arbeit wurden Werte zwischen 1,6 und 1,8 als ausreichend „rein“ befunden. Wesentlich niedrigere Werte zeigen Kontaminationen an.

2.2.8 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR, *polymerase chain reaction*) ist ein enzymatisches *in vitro* Verfahren zur exponentiellen Amplifikation von definierten DNA-Abschnitten (Template) in einer bestimmten Anzahl an Zyklen. Beschrieben wurde sie zum ersten Mal von Saiki *et al.* 1985 (Saiki *et al.*, 1985). Zur Synthese von Primern, kurzen Oligonukleotid-Sequenzen, sind flankierende Sequenzinformationen des gewünschten DNA-Abschnitts notwendig (Tabelle 6). Ein Zyklus gliedert sich in drei Abschnitte, die allesamt im Thermocycler Mastercycler® nach vorprogrammierten Schemata automatisiert ablaufen (Abbildung 12).

Zunächst erfolgte die Denaturierung des DNA-Doppelstranges in Einzelstränge durch die Erhöhung der Temperatur auf 94 °C. Die Wasserstoffbrückenbindungen in der DNA wurden dabei aufgebrochen. Im ersten Schritt des ersten Zyklus – im Initialisierungsschritt – erfolgte eine einmalig verlängerte Erhitzung des Reaktionsgemisches auf 2,5 min, um sicherzustellen, dass die Ausgangs-DNA als auch Primer vollständig voneinander getrennt waren und nur noch in Einzelstränge vorlagen. Bei der anschließenden Primerhybridisierung, dem *Annealing*, erfolgte die komplementäre

Bindung der sequenzspezifischen *Forward*- und *Reverse*-Primer (*Forward*-Primer: KIT2F; *Reverse*-Primer: KIT1Bmod). Das Reaktionsgemisch wurde dafür auf eine Temperatur abgekühlt, die der optimalen Hybridisierungstemperatur des ausgewählten Primer-Paares entspricht. In dieser Studie lag die Temperatur bei 60 °C. Im Anschluss erfolgte in der sogenannten Elongationsphase die enzymatische Verlängerung der PCR-Primer zur Amplifikation des komplementären DNA-Stranges ausgehend von den 3'OH-Enden der Primer in 5'→3'-Richtung durch Einbau der Desoxynukleotide bei einer Temperatur von 72 °C. Die Elongationszeit war entsprechend der Länge des zu erwarteten PCR-Produktes angepasst (2 min). Um möglichst viele DNA-Amplifikate zu komplettieren, war die finale Elongation um 10 min verlängert (Abbildung 12).

Die theoretisch exponentielle Vermehrung des DNA-Abschnitts ergibt sich daraus, dass die jeweils in einem Zyklus synthetisierten DNA-Abschnitte selbst im nächsten Zyklus als Ausgangsmaterial dienen (Kettenreaktion). In dieser Arbeit wurden 25 Zyklen zur Gewinnung ausreichender DNA-Mengen durchgeführt. Die PCR-Amplifikate können in der Agarosegelelektrophorese (2.2.9) aufgetrennt und nachgewiesen werden.

Tabelle 6: Synthetische Oligonukleotide (Primer) der PCR.

Primer	Sequenz von 5' – 3'	Länge	Position	GC-Anteil
KIT2F	CAGCCAGAAATATCCTCCTTACT	23 nt	Exon 17	43 %
KIT1Bmod	CAGGATTTACATTATGAAAATCACAGG	27 nt	Intron17-18	33 %

Abkürzung: nt, Nukleotide.

Ansatz und Komponenten der Polymerase-Kettenreaktion:

- 38,3 µl ddH₂O
- 5 µl 10 x Puffer
- 3 µl MgCl₂, 50 nM
- 0,5 µl Taq-Polymerase, 5 U/µl
- 1 µl dNTPs, 25 nM je dNTP
- 0,1 µl je Primer, 10 µM
- 2 µl Template (Kolonie-DNA)

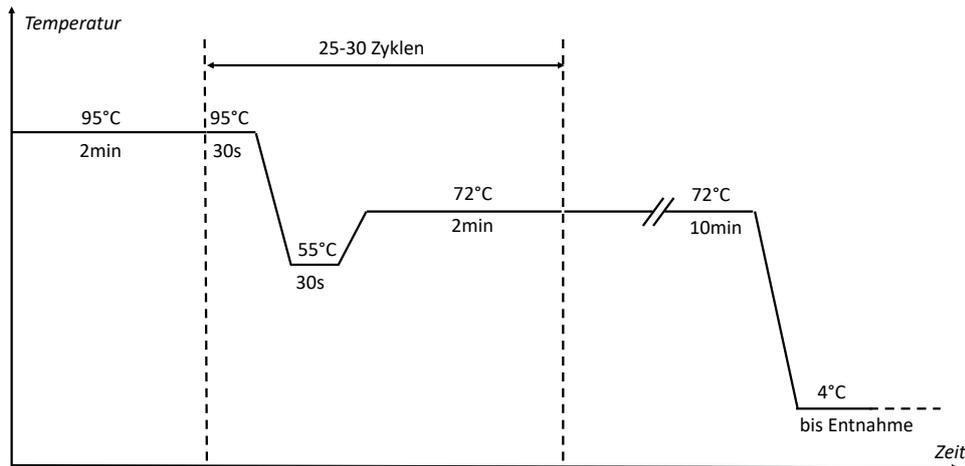


Abbildung 12: Ablauf der Polymerase-Kettenreaktion (PCR).

2.2.9 Agarosegelelektrophorese

Die negativ geladenen PCR-Amplifikate wurden durch die Agarosegelelektrophorese, einem molekularbiologischen Verfahren, im elektrischen Feld nach ihrer Molekülgröße aufgetrennt. Dazu wurde ein 2 %-iges Agarosegel angesetzt, indem 2 g Agarose in 100 ml 1 x TBE-Puffer aufgekocht wurden. Nach dem Hinzusetzen des DNA-Farbstoffes SYBR® Safe (7 µl), erfolgte das Ausgießen in eine mit Kämmen ausgestattete Gelkammer. Das auspolymerisierte Gel wurde mit 1 x TBE-Puffer vollständig bedeckt, um einer Austrocknung des Gels vorzubeugen. Über die Geltaschen erfolgte die Beladung des Gels mit 10 µl des PCR-Amplifikats nach Zugabe von 3 µl Ladepuffer. Um die Größe der aufgetrennten PCR-Amplifikate zu bestimmen, wurde ein 100-Basenpaar-Marker mitgeführt. Das Anlegen einer Spannung von ca. 80 Volt induziert ein elektrisches Feld, wodurch die negativ geladenen PCR-Amplifikate durch die Gelmatrix zur positiven Anode wandern; kleinere DNA-Fragmente wandern in einer definierten Zeit (hier: 49 min) schneller als entsprechend größere. Die so aufgetrennten DNA-Fragmente konnten mithilfe des Molecular Imager® ChemiDoc™ XRS+ und der dazugehörigen Software Image Lab™ detektiert und visualisiert werden. Die gewünschte Bande des DNA-Fragments, welches die Wildtypvariante des *KIT*-Gens (D816) bzw. die *KIT* D816V Mutation beherbergt, zeigt sich bei 201 bp.

2.2.10 Didesoxysequenzierung

Bei Nachweis des PCR-Produktes im Rahmen der Agarosegelelektrophorese konnte der DNA-Abschnitt mittels der enzymkatalytischen Kettenabbruchsynthese nach Sanger sequenziert werden (Sanger *et al.*, 1977). Zunächst erfolgte die Hybridisierung des zu sequenzierenden DNA-Fragments mit einem komplementären Primer, welcher durch eine Polymerase an seinem 3'OH-Ende verlängert wurde. Der Reaktionsansatz ist in vier gleiche Teile getrennt. Dem Reaktionsansatz hinzugefügt waren neben den vier verschiedenen 2'-Desoxynukleotiden der DNA (dATP, dCTTP, dGTP, dTTP), auch jeweils eines der vier fluoreszenzmarkierten 2'-3'-Didesoxynukleotide (ddATP, ddCTTP, ddGTP, ddTTP), welchen die freie 3'OH-Gruppe für die Polymerisierung fehlen. Diese werden statistisch zufällig in die wachsende Kette durch die Polymerase eingebaut und erzeugen dadurch unterschiedlich lange Ketten, welche auf einem Polyacrylamid-Gel aufgetrennt werden können. Nach Laseranregung mittels eines Laserfluoreszenzphotometers, das zwischen den vier verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen unterscheiden kann, lässt sich die Nukleotidsequenz automatisiert erfassen. Für die Sequenzierung wurde der Dienstleister Sequiserve GmbH in Anspruch genommen.

2.2.11 Leukozytenisolation aus peripherem Blut (oder Knochenmark)

Die Isolation von Leukozyten aus PB und KM erlaubt die anschließende RNA-Isolation. Eingesetzt wurden hierfür 10-40 ml EDTA-Blut, welches mit 1 x Lysispuffer auf 45 ml aufgefüllt wurde. Der Lysispuffer zerstört die Membran der Erythrozyten. Das Reaktionsgemisch wurde kräftig geschüttelt und für 10 min auf Eis inkubiert. Der Ansatz wurde anschließend bei 1200 rpm und 4 °C für 10 min zentrifugiert. Es ergibt sich ein rötlich-schimmernder Überstand. Bei weißem Pellet kann das Leukozyten-Pellet mit 25 ml 1 x PBS gewaschen werden. Bei rötlichem Pellet bzw. undurchsichtigen Überstand erfolgte die erneute Zentrifugation nach Abheben des Überstandes mit 15 ml 1 x Lysispuffer für 5 min. Nach dem Waschen erfolgte eine weitere Zentrifugation (1200 rpm; 4 °C; 5 min). Der Überstand wurde erneut abgehoben und das Pellet im entsprechenden Reagenz (s. 2.2.12 bzw. 2.2.13) aufgenommen.

2.2.12 Isolation von RNA mittels Maxwell®

Die RNA-Isolation mithilfe des Maxwell®-Gerätes erlaubt einen automatisierten Ablauf und minimiert so Fehlerquellen (z.B. Aerosolbildung, Kreuzkontaminationen). Grundlegendes Prinzip stellt die sequentielle Bindung und Freisetzung von paramagnetischen Partikeln in den Wells der Reagenzkartusche dar.

2×10^7 Zellen wurden 200 μl der Homogenisierungslösung hinzugesetzt. Die Zellen wurden anschließend mechanisch aufgeschlossen. 200 μl Lysepuffer sowie 25 μl Proteinkinase K wurden zu jeder Probe hinzugefügt. Nach dem Vortexen und Anzentrifugieren der Probensätze erfolgte eine zehnmünütige Inkubation bei Raumtemperatur. Entsprechend der Gerätebeschreibung erfolgte die Beladung des Geräts. Es wurde mit dem Programm *simplyRNA Blood* gestartet. Die RNA konnten nach Beenden des RNA-Extraktionslaufes in ein 1,5 ml beschriftetes Reaktionsgefäß übernommen werden.

2.2.13 Isolation von RNA mittels TRIzol®

Die RNA-Isolation mittels TRIzol® beruht auf dem Prinzip der sauren Guanidinisothiozyanat-Phenol-Chloroform-Extraktion nach der *single step* Methode von Chomczynski und Sacchi (Chomczynski und Sacchi, 1987). RNA, DNA und Proteine können durch ihre unterschiedliche Löslichkeit in organischen und wässrigen Lösungsmitteln voneinander isoliert werden. Das gebrauchsfertige TRIzol®-Reagenz enthält Guanidinisothiozyanat, welches einerseits die Zellen lysiert und andererseits freigesetzte Enzyme wie RNAsen inaktivieren kann. Denaturierte DNA und Protein-Komplexe gehen durch das Phenol in Lösung. Zugabe von Chloroform und anschließende Zentrifugation führt zur Phasentrennung. Die RNA ist in der oberen wässrigen Phase gelöst; denaturierte DNA und Proteine sind in der Interphase bzw. in der Unterphase lokalisiert.

2×10^7 Zellen wurden in 1 ml TRIzol® aufgenommen. Die entsprechenden Reaktionsgefäße wurden in einen Schüttler gesetzt (1400 rpm; 37 °C; 10 min). Die Zellen wurden homogenisiert. Hiernach wurde jeder Probe 200 μl Chloroform zugegeben. Die Reaktionsgefäße wurden 15 min durch einen Vortexer gemischt bis sie trüb waren. Anschließend erfolgte die Zentrifugation (10600 rpm; 8 °C; 10 min). Die Oberphase, in welcher die RNA gelöst ist, konnte nun abgehoben werden. Es folgt die Wiederholung des letzten Schrittes durch die erneute Zugabe von 200 μl Chloroform. Für die

folgende RNA-Fällung wurden den Proben 0,5 ml 4 °C kaltes 100 %-iges Ethanol hinzugefügt. Die Inkubation bei -20 °C erfolgte für 30 min nach Durchmischen der Proben. Die RNA wurde bei der anschließenden Zentrifugation (10600 rpm; 8 °C; 10 min) sichtbar. Das Pellet wurde mit 1 ml 75 %-igen Ethanol gewaschen, das Reaktionsgefäß gut gemischt. Das bei anschließender Zentrifugation (8400 rpm; 8 °C; 10 min) erneut entstandene Pellet wurde nach Abheben der Flüssigkeit auf einen 37 °C temperierten Wärmeblock getrocknet. Die RNA konnte abschließend in 21 µl RNase-freien H₂O gelöst werden.

2.2.14 Synthese der cDNA

Die Qualität der RNA, welche mittels Maxwell[®] bzw. TRIzol[®] isoliert wurde, kann wie in 2.2.7 beschrieben, mithilfe des Nanodrop[®] ND-1000 gemessen werden. Bei ausreichender Qualität folgte im Anschluss an die Isolation der RNA die cDNA Synthese, bei der die einzelsträngige RNA mithilfe des Enzyms Reverse Transkriptase (RNA-abhängige DNA-Polymerase) in cDNA übersetzt wurde. Daran beteiligt sind zudem eine RNase H (baut den ursprünglichen RNA-Strang, der als Matrize diente, ab) sowie eine DNA-abhängige DNA-Polymerase (synthetisiert komplementären DNA-Strang zum bestehenden Strang).

Initial wurde die RNA zunächst bei 65 °C für 10 min denaturiert und dann 3 min auf Eis gestellt. Zu dem Probenansatz wurden je 21 µl cDNA-Mix hinzu pipettiert, gefolgt von einer Inkubation auf einem 37 °C temperierten Heizblock für 2 h. Die Reaktion wurde beendet, indem der Probenansatz 5 min auf einen 65 °C heißen Heizblock gestellt wurde. Abschließend konnten die Proben bei -20 °C gelagert oder direkt weiterverarbeitet werden.

2.2.15 Allelspezifische quantitative real-time Polymerase-Kettenreaktion (rt-qPCR)

Die allelspezifische quantitative *real-time* Polymerase-Kettenreaktion (rt-qPCR) dient der Vervielfältigung von Nukleinsäuren und beruht auf der semiquantitativen PCR (Higuchi *et al.*, 1992), ermöglicht aber die zusätzliche Echtzeiterfassung und Quantifizierung der PCR-Amplifikate durch den Einsatz eines Fluoreszenz-markierten Sondenpaars mit Donor- und Akzeptorfluorophor, welche in geringem Abstand nebeneinander an das PCR-Fragment binden (Tabelle 7-8). Bei Anregung des Fluorescein-

Moleküls der Akzeptor-Sonde mit 470 nm wird die Energie durch den Förster-Resonanz-Transfer (FRET) auf den in räumlicher Nähe befindlichen Fluoreszenzfarbstoff der Donor-Sonde übertragen, wodurch ein Fluoreszenzsignal messbar wird, welches in der exponentiellen Phase des Reaktionsverlaufs proportional zur Menge der PCR-Amplifikate zunimmt. Ausgangssubstanz ist die cDNA der Patienten. Der Einsatz der rt-qPCR diente der Bestimmung der *KIT* D816V Allellast, als Quotient aus der Menge der mutierten *KIT* D816V Allele und der Gesamtmenge an *KIT* D816 Allelen (mutiert und Wildtyp) (Erben *et al.*, 2014).

Für die Bestimmung der *KIT* D816V Allellast wurde ein Quantifizierungsstandard mithilfe des linearen Plasmids pCR[®]2.1-TOPO[®], in welchem die PCR-Produkte von *KIT* D816V positiven Zelllinien kloniert wurden, für die mutierte als auch die Wildtyp-Sequenz eingerichtet. In zwei verschiedenen Ansätzen erfolgte die Amplifizierung des mutierten *KIT* D816V Allels und des Wildtyp-Allels (WT) im LightCycler[®] (Abbildung 13) und die Auswertung mithilfe der Software LightCycler[™]Systems.

Tabelle 7: Synthetische Oligonukleotide (Primer) der rt-qPCR.

Primer	Sequenz von 5'→3'	Länge	Position	GC-Gehalt
CK16F4	TGGCTTTCTCGCCTCCAAG	20 nt	Exon 16	60 %
CK20R1	ATCTGCATCCCAGCAAGTCTTC	22 nt	Exon 20	50 %
CK-MLC	TTGTGATTTTGGTCTAGCCAGGGT	24 nt	Exon 17	46 %

Abkürzung: nt, Nukleotide.

Tabelle 8: PCR Sonden.

Sonden	Sequenz von 5'→3'	Position	GC-Gehalt
CK18FL	AAGTGGATGGCACCTGAAAGCATTTTC-Fluorescein	Exon 18	44 %
CK18LC	LC-RED-640-ACTGTGTATACACGTTTGAAAGTGAC GTCTGG-P	Exon 18	44 %

Ansatz und Komponenten der rt-qPCR für die Amplifizierung des Wildtyps:

- 10 µl ddH₂O
- 4 µl Mastermix (dNTPs, Taq-Polymerase, Puffer) aus LC Faststart Plus KIT
- 1 µl UGD, 2 U/µl
- 0,57 µl Sondenmix aus CK18FL und CK18LC, je 20 pmol/µl
- 1 µl Primer CK16F4, 10 µM
- 1 µl Primer CK20R1, 10 µM

Ansatz und Komponenten der rt-qPCR für die Amplifizierung der D816V Mutation:

- 10 μl ddH₂O
- 4 μl Mastermix (dNTPs, Taq-Polymerase, Puffer) aus LC Faststart Plus KIT
- 1 μl UGD, 2 U/ μl
- 0,57 μl Sondenmix aus CK18FL und CK18LC, je 20 pmol/ μl
- 1 μl Primer CK-MLC, 10 μM
- 1 μl Primer CK20R1, 10 μM

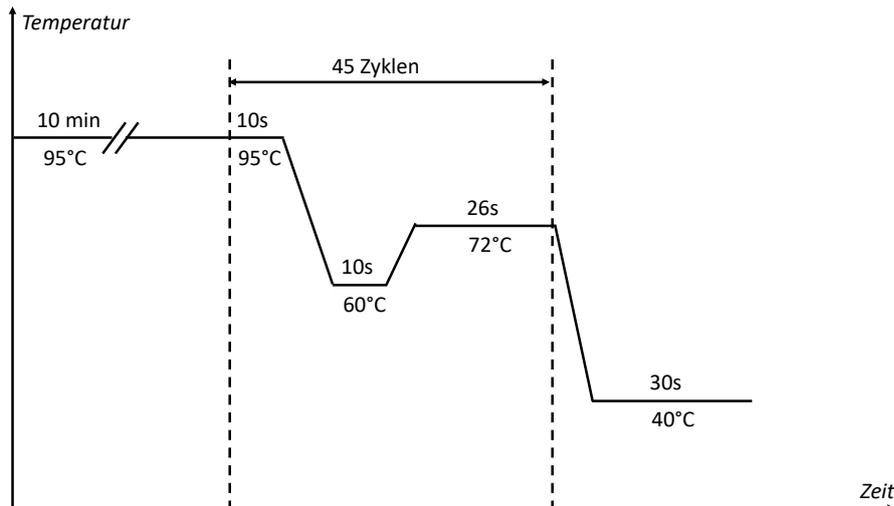


Abbildung 13: Ablauf der allelspezifischen quantitativen *real-time* Polymerase-Kettenreaktion.

2.2.16 RNA-Seq Analyse

RNA-Seq (*whole transcriptome shotgun sequencing*) nutzt Hochdurchsatzmethoden (*next generation sequencing*), um das sich kontinuierlich über die Zeit ändernde zelluläre Transkriptom anhand der Nukleotidabfolge der RNA zu einem spezifischen Zeitpunkt – in unserem Fall auf Punktmutationen – zu analysieren. Alle Proben wurden dazu im Wessex Regional Genetics Laboratory nach den laborinternen Standards aufgearbeitet. Die RNA-Seq Daten mit den nicht zusammenhängenden Fragmenten (*reads*) im FASTQ-Format (textbasierte Speicherung und Darstellung von Sequenzdaten und ihrem zugeordneten Werte-Score) wurden im paarweisen Sequenzalignment nach einer Kostenfunktion einem Referenzgenom (*human_g1k_v37*) *in silico* heuristisch zugeordnet (*read mapping*). Der *STAR-Aligner* Algorithmus basiert auf zwei Stufen (Dobin *et al.*, 2013). Im ersten Schritt werden möglichst lange Substrings (*maximal mappable prefix*, MMP) dem Referenzgenom sequenziell zugewiesen (*seed searching step*). Im zweiten Schritt werden die *reads* in Cluster angeordnet, linear zusammengereiht und nach benutzerdefinierten Kriterien

(*mismatches, indels, gaps*) bewertet (*clustering, stitching, scoring*). Das Sequenzalignment wurde zur Erhöhung des Fehlerfreiheitsgrades zweistufig durchgeführt, indem bei initialem Alignment zunächst die Spleißstellen (*splice junctions*) ohne *a priori* Kenntnisse detektiert und unter Berücksichtigung jener das finale Alignment ermöglicht wurde. Das Resultat als BAM-Format (binäres Format zur Speicherung von Sequenzierungsdaten) wurde klassifiziert, dedupliziert und in *read groups* mittels Piccard-Software zusammengeführt. Für die weitere Aufarbeitung zu Analyse-fertigen RNA-Seq *reads* folgten eine weitere Reihe von Aufarbeitungsschritten, die unterstützend durch das *genome analysis tool KIT* (GATK) durchgeführt wurden. Das ermöglichte im Kontext des *variant calling* mittels HaplotypeCaller die Detektion verschiedener Varianten der Sequenzierungsdaten (*single nucleotide variants, indels*). Die im *variant call*-Format gespeicherten Daten konnten nun nach benutzerdefinierten Schwellen gefiltert werden, um schließlich eine Zusammenstellung von hochqualitativen Sequenzierungsvarianten zu generieren. ANNOVAR ermöglichte die Annotation, Interpretation und zusätzliche Filterung von Variationen bezüglich der Kenntnisse bestehender Polymorphismen und Pathogenität verschiedener Varianten (Wang *et al.*, 2010). Gefiltert wurden nicht-kodierende Varianten, synonyme *single nucleotide variants*, sowie Varianten mit alternierender Allelfrequenz größer als 1 % in öffentlich zugänglichen Datenbanken.

2.2.17 STAT5B N642H Tetra-Primer ARMS Assay

Für das retrospektive Screening auf die *STAT5B* N642H Mutation, wurde ein ARMS (*amplification-refractory mutation system*) Assay mit vier Primern auf Grundlage der in 2.2.8 beschriebenen PCR-Technik etabliert. Zu den vier Primern gehören zu jedem Ansatz jeweils zwei *Outer* und zwei *Inner Primer*. Die *Outer Primer* (*Forward Outer Primer*, FO; *Reverse Outer Primer*, RO) umfassen in 5`- und 3`-Richtung die wildtyp- bzw. mutationsspezifischen *Inner Primer* und definieren die positive Kontrollbande für jede Reaktion. Der *Forward Inner Primer* (Fwt) ist wildtypspezifisch, der *Reverse Inner Primer* (Rmt) ist mutationsspezifisch (Tabelle 9, Abbildung 14).

Das Annealing erfolgte mit 25 ng der genomischen DNA bei einer Temperatur von 60 °C für 35 Zyklen mithilfe der AmpliTaq Gold DNA Polymerase. Proben, die nach Auftrennung der Amplifizierungsprodukte durch die Agarosegelelektrophorese (vgl. 2.2.9) heterozygot oder homozygot positiven Mutationsstatus aufwiesen, wurden

nochmals unter alleinigen Einsatz der *Outer Primer* amplifiziert und durch Didesoxysequenzierung (vgl. 2.2.10) bestätigt.

Tabelle 9: Synthetische Oligonukleotide (Primer) der PCR.

Primer	Sequenz von 5' – 3'	Länge	Position	GC-Anteil
FO	CGATCAGGAAACACGTAGATAAGGTAATT	29 nt	Intron 16	38 %
RO	AAATGGAGATTTCTATTGGAGCCATTAT	28 nt	Exon 16	32 %
Fwt	TCTCTGGTGGTAAAAGGCATCAGGTT	26 nt	Exon 16	46 %
Rmt	TTATTGATCTAGAGGAAAGAATGTTTTAGC	30 nt	Exon 16	30 %

Abkürzung: nt, Nukleotide.

Ansatz und Komponenten der Polymerase-Kettenreaktion:

- 11,8 µl ddH₂O
- 2,5 µl 10 x Puffer II
- 1,75 µl MgCl₂, 25 mM
- 0,2 µl AmpliTaq Gold DNA Polymerase, 25 ng
- 0,5 µl dNTPs, 10 mM je dNTP
- 0,625 µl je *Outer Primer*, 0,5 µM
- 2,5 µl je *Inner Primer*, 2,5 µM
- 2 µl Template (DNA)

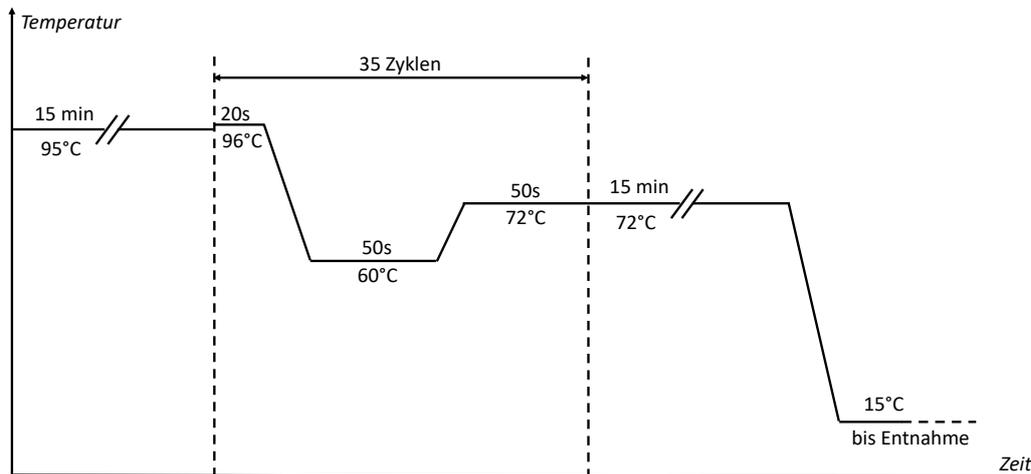


Abbildung 14: Ablauf des STAT5B N642H Tetra-Primer ARMS Assay.

2.2.18 T-Zell Selektion und Kultivierung

CD3 positive T-Zellen wurden mittels CD3-MicroBeads magnetisch markiert und auf eine entsprechende Zellsäule geladen. Ein magnetisches Feld wurde durch einen

MACS[®]-Seperator induziert, wodurch die mit CD3-MicroBeads beladenen Zellen im Gegensatz zu unmarkierten Zellen in der MACS[®]-Säule zurückgehalten wurden. Nach Ausschalten des magnetischen Feldes kann die CD3 positive Zellfraktion aus der Säule eluiert werden.

Das MACS[®] T Cell Activation/ Expansion Kit ermöglicht die Aktivierung und Expansion humaner T-Zellen. Anti-Biotin MACSiBead-Partikel werden mit biotynilierten Antikörpern gegen die humanen CD2-, CD3- und CD28-Antigene beladen. Dadurch werden antigenpräsentierende Zellen nachempfunden, die die separierten CD3 positiven T-Zellen aktivieren. Die T-Zell Expansion wird durch Kultivierung und Reaktivierung am Tag 14 der Kultur erreicht. Die T-Zell Selektion und Kultivierung wurde vom Wessex Regional Genetics Laboratory durchgeführt.

2.2.19 Statistische Auswertung

Die umfängliche Beschreibung des untersuchten Patientenkollektivs gelang in der vorliegenden Arbeit unter Verwendung deskriptiver Statistik. Dazu zählen insbesondere Lage-, Streuungs- und Zusammenhangsmaße.

Für die Korrelation metrisch skalierten Variablen wurde der Pearson-Korrelationskoeffizient herangezogen. Der Phi-Koeffizient als Zusammenhangsmaß beschreibt die Assoziation zweier binärer bzw. dichotomer, nicht-metrischer Merkmale. Die Häufigkeitsverteilung der Merkmale ist in Kontingenztabellen zusammengefasst. Der gepaarte T-Test (Paardifferenzentest) gibt als Lagetest den Vergleich der Erwartungswerte zweier verbundener Stichproben an.

Die Überlebenszeitanalyse erfolgte anhand des ereigniszeitanalytischen Kaplan-Meyer-Verfahrens. Die Überlebenszeit der Patienten wurde durch die Zeitspanne zwischen Diagnosestellung und Todeszeitpunkt bzw. den Zeitpunkt des letzten Kontakts definiert. Der Logrank-Test gab die statistische Signifikanz des Unterschiedes zweier Überlebensfunktionen aus unverbundenen Stichproben an.

Zum Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$ wurde die Alternativhypothese angenommen.

Die statistische Auswertung wurde mit SPSS (Version 23.0.0, IBM Cooperation, Armonk, NY) und GraphPad Prism Software (Version 6, GraphPad, La Jolla, CA, USA) vorgenommen.

3 Ergebnisse

3.1 Auswertung des Patientenkollektivs mit fortgeschrittener systemischer Mastozytose

Bei dem advSM-Patientenkollektiv handelte es sich um 13 Patienten, die entsprechend der aktuell gültigen Diagnosekriterien der WHO diagnostiziert worden sind. Bei elf Patienten konnte die Diagnose einer SM-AHN (AHN: CMML, n = 3; MDS/MPN, n = 7; MPN-eo, myeloproliferative Neoplasie mit Eosinophilie, n = 1) und bei zwei Patienten die Diagnose einer ASM gestellt werden.

3.1.1 Deskriptive Analyse der klinischen, laborchemischen und histologischen Parameter

Eine zusammenfassende Übersicht klinischer, laborchemischer, histologischer und molekularer Daten gibt Tabelle 10 wieder, eine detaillierte Aufstellung zu Befunden einzelner Patienten ist in Tabelle 11 aufgezeigt.

Im Median waren die 13 Patienten 67 Jahre alt (48-79 Jahre) und zu 85 % (11/13) männlichen Geschlechts. Die C-findings betreffend, lag die mediane Hämoglobin (Hb)-Konzentration bei 9,9 g/dL (7,1-15, davon 54 % mit Hb < 10 g/dL), die mediane Thrombozytenzahl bei $110 \times 10^9 /L$ (29-426, davon 38 % < $100 \times 10^9 /L$) und die absolute Neutrophilenzahl bei $7,5 \times 10^9 /L$ (1-60, davon 0 % < $1 \times 10^9 /L$). Die alkalische Phosphatase, einem Marker für die Organbeteiligung der Leber, wurde im Median mit 376 U/L (41-707, davon 85 % > 130 U/L) und das Albumin im Serum (i.S.) mit 34,5 g/dl (30-43, davon 46 % < 34 g/L) bestimmt. 62 % (8/13) der Patienten wiesen einen Gewichtsverlust von > 10 % in den letzten 6 Monaten auf. Folgende B-findings wurden bestimmt: Mastzellinfiltration im KM mit 35 % (20-70), Tryptase i.S. mit 140 µg/L (33-739) und Organomegalie mit 92 % (12/13). Als weitere relevante Befunde wurden im Median erhoben: Leukozyten mit $10,8 \times 10^9 /L$ (2,2-87 $\times 10^9 /L$), Monozyten mit $0,8 \times 10^9 /L$ (0,17-6,93), Eosinophile mit $0,4 \times 10^9 /L$ (0,03-3,61) und die *KIT* D816V exprimierte Allellast (*expressed allele burden*, EAB) in PB mit 40 % (18-55).

3.1.2 Molekulare und zytogenetische Aberrationen

Neben der Mutation D816V im Gen *KIT* konnten sieben weitere somatische Mutationen detektiert werden: *SRSF2* (n = 10), *ASXL1* (n = 5), *RUNX1* (n = 2), *TET2* (n = 8), *IDH2* (n = 1), *EZH2* (n = 1) und *MPL* (n = 1; Tabelle 10). Die Patienten #11 und #13 wiesen keine Zusatzmutationen auf. Bei 11/13 Patienten (85 %) wurden eine (n = 2; #3, #7), zwei (n = 4; #2, #5, #6, #10), drei (n = 3; #1, #4, #9), vier (n = 1; #8) oder fünf (n = 1; #12) zusätzliche somatische Mutationen bestimmt. Wenigstens eine Mutation im S/A/R Genpanel konnte in 10/13 (77 %) Fällen identifiziert werden. Zwei der 13 Patienten präsentierten sich mit einem abberanten Karyotyp (#4, #9). Patient #4 wies folgenden komplex abberanten Karyotyp auf: 47,XY,+8,der(10;19)(q10;?p109,+19[4];58<2n>,XY,+del(X)(p11p22),+Y,+1,+5,+6,+8,+8+12,+13,+16,+20,+22[5];46,XY[9].

Tabelle 10: Zusammenfassende Übersicht der initialen klinischen, laborchemischen, histologischen und molekularen Charakteristika von 13 Patienten mit *KIT* D816V positiver fortgeschrittener SM.

	Initial	Kohorte #1	Kohorte #2	Kohorte #3
Anzahl der Patienten	13	4	3	4
Alter in Jahren; Median (Spannweite)	67 (48-79)	58 (48-79)	76 (75-78)	64 (61-67)
Männlich, n (%)	11 (85)	3 (75)	3 (100)	3 (75)
C-findings^a				
C-findings, n; Median (Spannweite)	3 (2-4)	3 (2-4)	3 (2-3)	2.5 (2-4)
Hämoglobin, g/dL; Median (Spannweite)	9,9 (7,1-15)	10,8 (7,1-15)	9.4 (8,8-12)	11,7 (9,1-13,9)
< 10 g/dL, n (%)	7 (54)	2 (50)	2 (67)	1 (25)
Thrombozyten, x10 ⁹ /L; Median (Spannweite)	110 (29-426)	190 (29-425)	108 (80-315)	117 (47-426)
< 100x10 ⁹ /L, n (%)	5 (38)	1 (25)	1 (33)	2 (50)
ANC, x10 ⁹ /L; Median (Spannweite)	7,5 (1,0-60,0)	8,7 (1,7-12,6)	1,3 (1,0-6,1)	16,4 (6,2-60,6)
< 1x10 ⁹ /L, n (%)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Alkalische Phosphatase, U/L; Median (Spannweite)	376 (41-707)	204 (41-707)	409 (303-592)	387 (78-632)
> 130 U/L, n (%)	11 (85)	3 (75)	3 (100)	3 (75)
Albumin i.S., g/L; Median (Spannweite)	34,5 (30,0-43,0)	33,1 (29,5-40,7)	34,5 (33,6-34,5)	34,6 (33,6-42,9)
< 34 g/L, n (%)	6 (46)	2 (50)	1 (33,3)	2 (50)
Gewichtsverlust (> 10 % in den letzten 6 Monaten), n (%)	8 (62)	4 (100)	1 (33,3)	3 (75)
B-findings				
MC Infiltration in KM-Biopsie, %, Median (Spannweite)	35 (20-70)	27,5 (20-50)	50 (20-60)	20 (20-50)
Tryptase i.S., µg/L; Median (Spannweite)	140 (33-739)	104 (40 -194)	213 (128-739)	173 (102-225)
Organomegalie ^b , n (%)	12 (92)	3 (75)	3 (100)	3 (100)

Weitere relevante Befunde

Leukozyten, x10 ⁹ /L Median (Spannweite)	10,8 (2,2-87,0)	12 (3,9-15,4)	3,43 (2,2-8,9)	20,7 (9,1-86,6)
Monozyten, x10 ⁹ /L Median (Spannweite)	0,8 (0,2-6,9)	0,5 (0,4-0,6)	0,5 (0,3-1)	1,5 (0,2-6,9)
Eosinophile, x10 ⁹ /L Median (Spannweite)	0,4 (0,1-3,6)	0,2 (0,1-0,3)	0,45 (0,1-1,2)	1,5 (1,5-1,5)
<i>KIT</i> D816V AB in PB, %, Median (Spannweite)	40 (18-55)	27 (18-47)	41 (40-43)	51 (40-55)
Zusätzliche somatische Mutationen ^c	2 (0-5)	0,5 (0-1)	2 (2-3)	3,5 (2-5)

Basierend auf dem Antwortmuster (relative Reduktion *KIT* D816V positiver Kolonien) der CFU-GM Kolonien wurden vier verschiedene Kohorten definiert: Midostaurin und Avapritinib Responder (Kohorte #1), Midostaurin Non-Responder und Avapritinib Responder (Kohorte #2), Midostaurin und Avapritinib Non-Responder (Kohorte #3) sowie Midostaurin Responder (Kohorte #4). ^aNicht quantifizierbare C-findings (bspw. Aszites und Osteolysen) wurden ausgeschlossen. ^bOrganomegalie umfasst Hepatomegalie, Splenomegalie und/oder Lymphadenopathie. ^cZusätzliche somatische Mutationen wurden durch ein gezieltes Sequenzierungspanel, welches 18 Kandidatengene untersucht, identifiziert.

Abkürzungen: AB, allele burden; ANC, absolute Neutrophilenzahl; i.S., im Serum; KM, Knochenmark; MC, Mastzelle; n, Anzahl; PB, peripheres Blut. Tabelle modifiziert nach Lübke *et al.*, 2019.

Tabelle 11: Initiale klinische, laborchemische, histologische und molekulare Profile von 13 Patienten mit *KIT* D816V positiver fortgeschrittener SM.

Pat.#	Alter	M/ W	SM- Typ	AHN	A/T	M/E	Karyotyp	MC Infiltration in KM (%)	Tryptase i.S. (µg/l)	<i>KIT</i> D816V AB in KM (%)	<i>SRSF2</i>	<i>ASXL1</i>	<i>RUNX1</i>	<i>TET2</i>	Zusatz- mutation
1	78	M	ASM	MDS/MPN	-/-	+/+	-	20	128	45	1	-	1	1	-
2	75	M	ASM	CMML	+/-	+/-	46,XY[25]	50	213	21	1	-	-	1	-
3	79	M	ASM	MDS/MPN	+/+	-/-	46,XY[25]	20	68	30	-	-	-	1	-
4	61	M	ASM	MPN-eo	-/-	-/+	k.a.	20	131	44	1	1	-	1	-
5	76	M	MCL	MDS/MPN	+/+	-/-	46,XY[22]	60	739	50	1	-	-	-	<i>IDH2</i>
6	64	M	ASM	MDS/MPN	-/+	+/-	46,XY[25]	50	225	64	1	1	-	-	-
7	57	M	ASM	MDS/MPN	+/-	-/-	46,XY[20]	50	140	- ^a	1	-	-	-	-
8	67	W	MCL	CMML	-/-	+/-	46,XX[23]	20	102	58	1	1	-	1	<i>EZH2</i>
9	76	M	ASM	CMML	+/+	+/-	46,XY,9qh+[25]	20	33	41	1	1	-	1	-
10	75	M	ASM	MDS/MPN	+/-	+/+	46,XY[25]	70	305	- ^b	1	-	-	1	-
11	56	M	ASM	-	-/-	-/-	45,X,-Y[24]	35	194	45	-	-	-	-	-
12	67	M	ASM	MDS/MPN	+/+	+/-	46,XY[20]	20	214	42	1	1	1	1	<i>MPL</i>
13	48	W	ASM	-	-/-	-/-	46,XX[25]	20	40	22	-	-	-	-	-

^aDaten standen nicht zur Verfügung, *KIT* D816V AB im PB betrug 43 %. ^bDaten standen nicht zur Verfügung, *KIT* D816V AB im PB betrug 33 %.

Abkürzungen: AB, *allele burden*; A/T, Anämie < 10.0 g/dL (+), > 10.0 g/dL (-), Thrombozyten < 100 x 10⁹ /L (+), > 100 x 10⁹ /L (-); AHN, assoziierte hämatologische Neoplasie; ASM, aggressive systemische Mastozytose; CMML, chronische myelomonozytäre Leukämie; i.S., im Serum; k.a., komplex aberrant; KM, Knochenmark; MCL, Mastzelleukämie; MDS, myelodysplastisches Syndrom; M/E, Monozytose > 1 x 10⁹ /L (+), < 1 x 10⁹ /L oder nicht bekannt (-), Eosinophilie > 1 x 10⁹ /L (+), < 1 x 10⁹ /L oder nicht bekannt (-); MPNeo, myeloproliferative Neoplasie mit Eosinophilie; MPN, myeloproliferative Neoplasie; M/W, männlich/weiblich; Pat, Patient, PB, peripheres Blut.

Tabelle modifiziert nach Lübke *et al.*, 2019.

Tabelle 12: Ergebnisse der CFU-GM Kolonien unter Midostaurin- und Avapritinibbehandlung in 13 Patienten mit *KIT* D816V positiver fortgeschrittener SM.

Pat.#	Midostaurin <i>in vivo</i> (Monate)	Antwort ^a (Valent <i>et al.</i>)	<i>KIT</i> D816V AB Änderung in PB unter Midostaurin ^b (%) (Jawhar <i>et al.</i>)	OS von Dx (Monate)	Tod (ja/nein)	<i>KIT</i> D816V positive Kolonien (%) (Baseline Assay)	<i>KIT</i> D816V positive Kolonien (%) (Midostaurin <i>in vivo</i> Assay) ^c	<i>KIT</i> D816V positive Kolonien (%) (Midostaurin <i>in vitro</i> Assay) ^d	<i>KIT</i> D816V positive Kolonien (%) (Avapritinib <i>in vitro</i> Assay) ^e
Kohorte #1									
3	6	ja (MPR)	82 (↓)	42	nein	100	40	50	0
7	23	ja (IR)	43 (↓)	33	nein	70	10	-	0
11	13	ja (IR)	72 (↑)	133	nein	80	80	40	10
13	20	ja (IR)	76 (↓)	283	nein	30	10	10	0
Kohorte #2									
1	3	nein (PD)	0	23	ja	40	-	60	0
2	3	nein (PD)	-	22	ja	100	-	100	0
5	7	nein (PD)	23 (↑)	21	ja	90	90	90	10
Kohorte #3									
4	7	nein (PD)	3 (↑)	13	ja	90	90	90	70
6	6	nein (PD)	0	15	ja	100	100	100	80
8	7	nein (PD)	113 (↑)	34	ja	100	100	100	100
12	11	nein (PD)	24 (↓)	20	ja	95	95	90	100
Kohorte #4									
9	31	ja (MPR)	73 (↓)	54	ja	90	5	-	-
10	22	ja (IR)	62 (↓)	46	ja	100	10	-	-

Es wurden in Abhängigkeit der relativen Reduktion *KIT* D816V positiver Kolonien vier Gruppen definiert: Midostaurin und Avapritinib Responder (Kohorte #1), Midostaurin Non-Responder und Avapritinib Responder (Kohorte #2), Midostaurin und Avapritinib Non-Responder (Kohorte #3), sowie

Ergebnisse

Midostaurin Responder (Kohorte #4). ^aKlinische Antwort gemäß den modifizierten Ansprechkriterien nach Valent. ^bÄnderung der *KIT* D816V Allellast über sechs Monate. ^cAnteil der *KIT* D816V positiven CFU-GM Kolonien unter sechsmonatiger *in vivo* Therapie mit Midostaurin. ^dAnteil der mit Midostaurin beimpften *KIT* D816V positiven CFU-GM Kolonien nach zweiwöchiger Inkubation. ^eAnteil der mit Avapritinib beimpften *KIT* D816V positiven CFU-GM Kolonien nach zweiwöchiger Inkubation.

Abkürzungen: AB, *allele burden*; CFU-GM, *colony-forming-unit-granulocyte-macrophage*; Dx, Diagnose; IR, *incomplete remission*; MPR, *minor partial response*; OS, *overall survival*; Pat, Patient; PB, peripheres Blut; PD, *progressive disease*.

Tabelle modifiziert nach Lübke *et al.*, 2019.

3.1.3 Detektion von *KIT* D816V in CFU-GM durch Sanger-Sequenzierung

Die Detektion der Punktmutationen D816V im Gen *KIT* wurde mit Hilfe der *Sanger-Sequenzierung* vorgenommen. An Position 2447 des codierenden Gens *KIT* kann in der *Forward*-Sequenz bei homozygotem Wildtyp die Base A, bei homozygotem Mutationsstatus die Base T und bei Heterozygotie die Mischbase W im Elektropherogramm identifiziert werden. In der *Reverse*-Sequenz liegt der komplementäre Status vor: Base T bei homozygotem Wildtyp, Base A bei homozygotem Mutationsstatus und Mischbase W bei Heterozygotie (Abbildung 15).

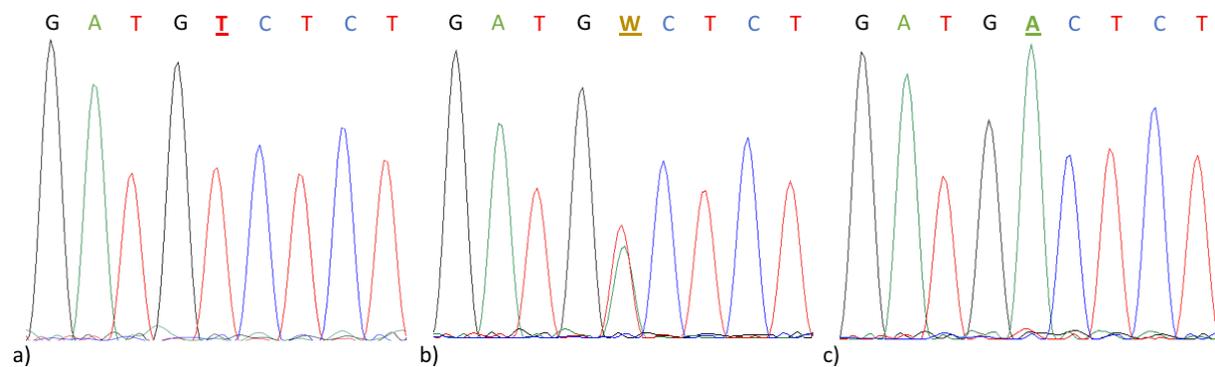


Abbildung 15: Elektropherogramm nach Sanger-Sequenzierung (Reverse-Sequenz) im Gen *KIT* (Ausschnitt jeweils aus c.2443-c.2451) bei Patient #11.

- a) Ein homozygoter *KIT* Wildtyp mit der Base T an Position c.2447 ist zu erkennen.
- b) Durch den Austausch der Base T gegen A wurde die Mischbase W an Position c.2447 detektiert, die auf eine heterozygote *KIT* D816 Mutation hinweist.
- c) Es ist ein homozygoter Mutationsstatus einer *KIT* D816V positiven CFU-GM Kolonie abgebildet. Es zeigt sich die Base A an Position c.2447.

3.1.4 *In vitro* Effektivität von Midostaurin und Avapritinib

Der Anteil *KIT* D816V positiver, Midostaurin-nativer CFU-GM Kolonien von avdSM-Patienten vor Therapiebeginn („Baseline Assay“) an der Gesamtheit der Kolonien betrug im Median 90 % (30-100 %; n = 20 Kolonien pro Assay pro Patient wurden durchschnittlich ausgewertet; die Ergebnisse aller Patienten lagen vor; Tabelle 12, Abbildung 16).

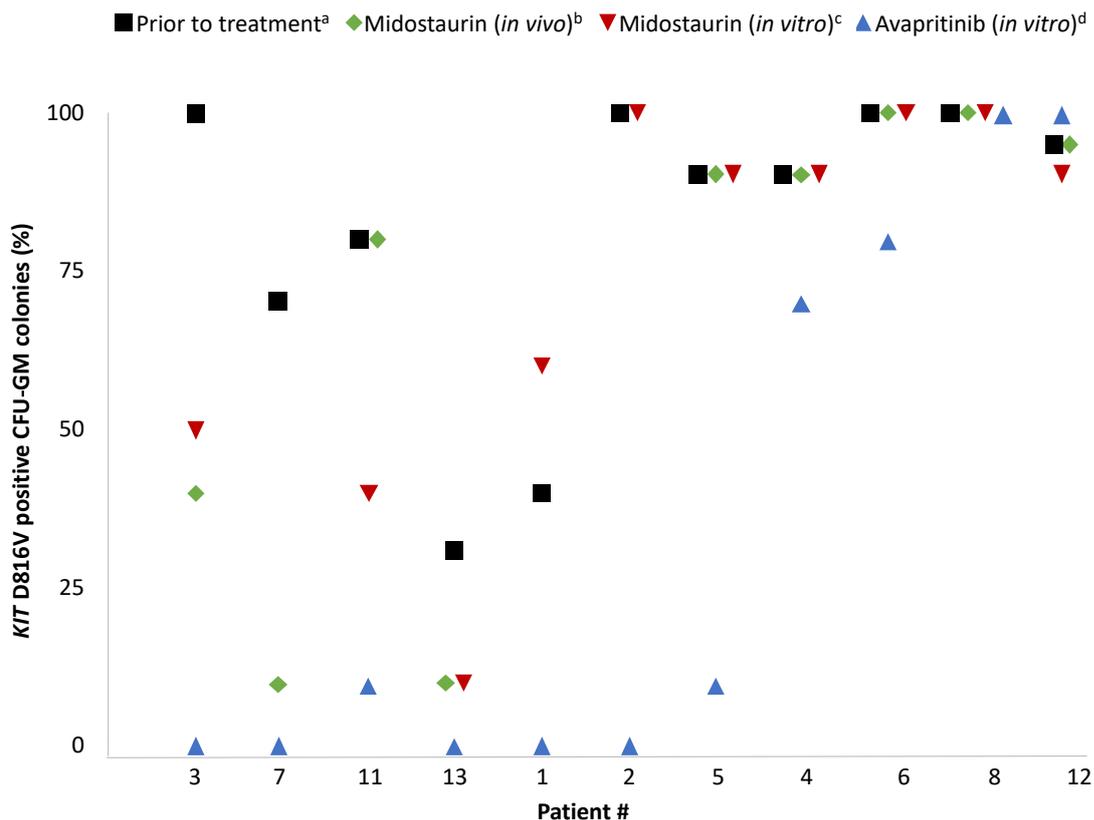


Abbildung 16: Zusammenfassende Darstellung der *in vivo* und *in vitro* Daten hinsichtlich des Anteils *KIT* D816V positiver CFU-GM Kolonien in Relation zur Gesamtheit an Kolonien.

^aAnteil *KIT* D816V positiver, Midostaurin-nativer CFU-GM Kolonien von Patienten initial vor Therapiebeginn (Baseline Assay). ^bAnteil *KIT* D816V positiver CFU-GM Kolonien von Patienten, die seit sechs Monaten *in vivo* mit Midostaurin therapiert wurden (Midostaurin *in vivo* Assay). ^cAnteil der mit Midostaurin beimpften *KIT* D816V positiven, Midostaurin-nativen CFU-GM Kolonien von Patienten initial vor Therapiebeginn (Midostaurin *in vitro* Assay). ^dAnteil der mit Avapritinib beimpften *KIT* D816V positiven, Midostaurin-nativen CFU-GM Kolonien von Patienten initial vor Therapiebeginn (Avapritinib *in vitro* Assay).

Abkürzung: CFU-GM, *colony-forming-unit-granulocyte-macrophage*.

Abbildung modifiziert nach Lübke *et al.*, 2019.

CFU-GM Kolonien wurden zudem mit Midostaurin und mit Avapritinib *in vitro* beimpft. Nach zweiwöchiger Inkubationszeit mit Midostaurin (n = 10 Kolonien pro Assay pro Patient wurden durchschnittlich ausgewertet, Daten in 10/13 Fällen vorhanden) bzw. Avapritinib (n = 10 Kolonien pro Assay pro Patient wurden durchschnittlich ausgewertet, Daten in 11/13 Fällen vorhanden) waren im Median 90 % (10-100 %) bzw. 10 % (0-100 %) der CFU-GM Kolonien *KIT* D816V positiv, wobei 3/10 Patienten (30 %; #3, #11, #13) bzw. 7/11 Patienten (64 %; #1, #2, #3, #5, #7, #11, #13) eine signifikante relative Reduktion (≥ 50 %, fortan als *Responder* bezeichnet) im Anteil an Midostaurin-nativen, *KIT* D816V positiven CFU-GM Kolonien zeigten (Tabelle 12,

Abbildung 16). Die Mittelungsdifferenz zwischen *in vitro* Midostaurin- und Avapritinib-beimpften Kolonien betrug 46 % (durchschnittliche Midostaurin-Reduktion 19 %, durchschnittliche Avapritinib-Reduktion 65 %) und stellte einen deutlichen Unterschied zwischen beiden Medikamenten dar, der mit dem gepaarten T-Test als signifikant bestimmt wurde ($p = 0,0102$; Abbildung 17). In drei Fällen (#1, #2, #5) zeigte sich ein Ansprechen in den mit Avapritinib beimpften CFU-GM Kolonien, die sich gegenüber Midostaurin einer signifikanten relativen Reduktion des Anteils *KIT* D816V positiver CFU-GM Kolonien *in vivo* und *in vitro* resistent gezeigt hatten. Umgekehrt fand sich kein Midostaurin *Responder* bei gleichzeitiger Resistenz gegenüber Avapritinib. Vier Patienten (#4, #6, #8, #12) waren Midostaurin und Avapritinib *Non-Responder* (Tabelle 12 und Abbildung 17).

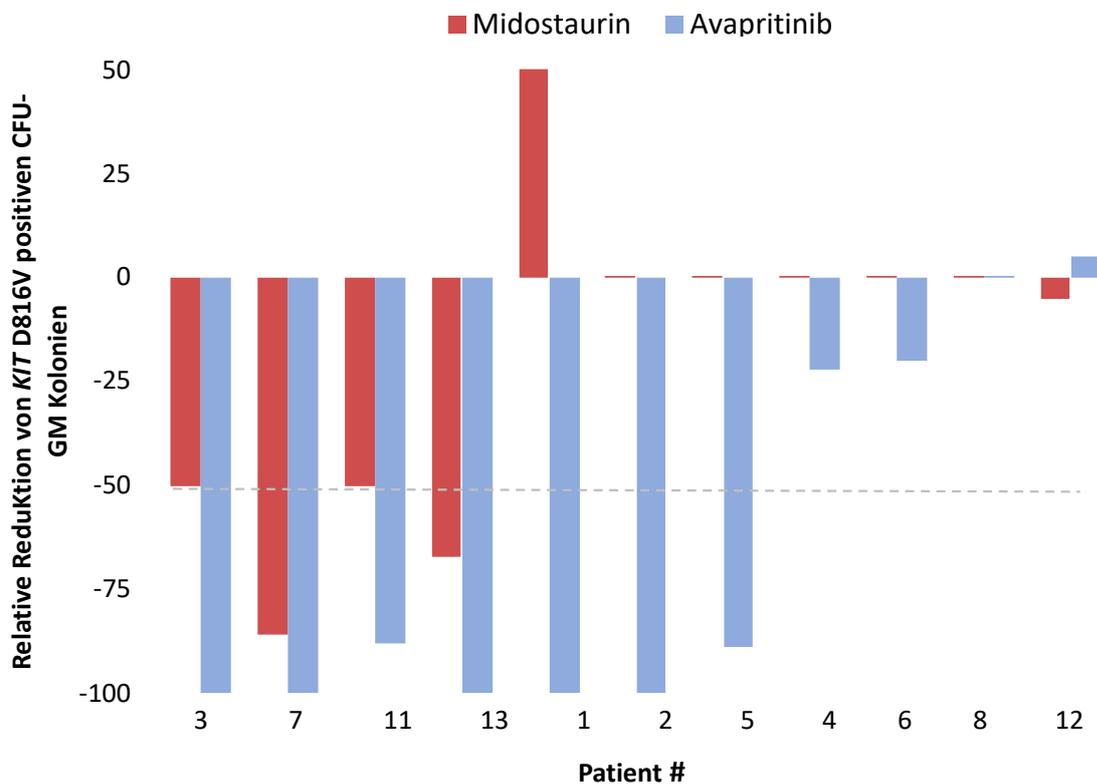


Abbildung 17: Vergleichende patientenspezifische Darstellung der relativen Reduktion des Anteils von Midostaurin-nativen, Midostaurin- und Avapritinib-beimpften *KIT* D816V positiven CFU-GM Kolonien.

Für Patient #7 wurde statt der *in vitro* die *in vivo* Daten zur Auswertung herangezogen, da die *in vitro* Ergebnisse nicht verfügbar waren.

Abkürzung: CFU-GM, *colony-forming-unit-granulocyte-macrophage*.

Abbildung modifiziert nach Lübke *et al.*, 2019.

3.1.5 Verschiedene Antwortmuster der Kolonien auf Midostaurin und Avapritinib

Basierend auf dem Antwortmuster (relative Reduktion *KIT* D816V positiver CFU-GM Kolonien) der CFU-GM Kolonien wurden vier verschiedene Kohorten definiert: Midostaurin und Avapritinib *Responder* (Kohorte #1; n = 4), Midostaurin *Non-Responder* und Avapritinib *Responder* (Kohorte #2; n = 3), Midostaurin und Avapritinib *Non-Responder* (Kohorte #3; n = 4) sowie Midostaurin *Responder*, bei denen keine Avapritinib Kolonie-Daten vorlagen (Kohorte #4; n = 2). Der Vergleich zwischen den drei Kohorten (Kohorte #1, Kohorte #2, Kohorte #3) deckte keinen signifikanten Unterschied hinsichtlich der Mastzellinfiltration im Knochenmark (28 %, 50 %, 20 %; $p = 0,2909$) sowie der Tryptase i.S. (104 $\mu\text{g/L}$, 213 $\mu\text{g/L}$, 173 $\mu\text{g/L}$; $p = 0,1912$) auf. Eine statistische Signifikanz ergab sich auch bei Vergleich der untersuchten C-findings (Hb, Thrombozyten, absolute Neutrophilenzahl, alkalische Phosphatase, Albumin i.S., Gewichtsverlust) nicht. Die Krankheitslast charakterisierenden Parameter *KIT* D816V EAB (30 %, 45 %, 51 %; $p = 0,0411$) und Anzahl an Mutationen im S/A/R Genpanel (0-1, ≥ 2 , ≥ 2 ; $p = 0,029$) waren dagegen im Vergleich der Kohorten signifikant differierend (Tabelle 10). Hinsichtlich der Subentität und des Karyotyps ließen sich keine Unterschiede feststellen (Tabelle 10-11).

3.1.6 Einfluss von Midostaurin und Avapritinib auf zusätzliche somatische Mutationen

Der *in vitro* Einfluss von Midostaurin und Avapritinib auf vorbekannte zusätzliche somatische Mutationen in CFU-GM Kolonien (n = 10 Kolonien pro Assay pro Patient wurden durchschnittlich ausgewertet) wurde untersucht. Der Mutationsstatus der Patienten ist Tabelle 11 zu entnehmen. Weder unter dem Einfluss von Midostaurin noch von Avapritinib konnte eine Reduktion der Allellast in den vorbekannten somatischen Mutationen im entsprechendem CFU-GM Assay beobachtet werden. Untersucht wurden Patient #4 (*SRSF2*, *ASXL1*, *TET2*), #5 (*SRSF2*, *IDH2*), #7 (*SRSF2*), #8 (*SRSF2*, *ASXL1*, *TET2*, *EZH2*), #9 (*SRSF2*, *ASXL1*, *TET2*) und #10 (*SRSF2*, *TET2*). Longitudinaldaten zum Zeitpunkt des *Follow-up* nach sechsmonatiger Midostaurintherapie bezüglich zusätzlicher somatischer Mutationen waren in fünf Patienten verfügbar. In Patient #4 wurde eine neue *NPM1* Mutation nach sechs

Monaten detektiert, in Patient #5 konnte eine von 20 % auf 49 % erhöhte Allellast der *IDH2* Mutation identifiziert werden.

3.1.7 Korrelation der *in vivo* und *in vitro* Effekte von Midostaurin hinsichtlich des Anteils *KIT* D816V positiver CFU-GM Kolonien sowie molekularen und klinischen Charakteristika

Die relative Reduktion des Anteils *KIT* D816V positiver, Midostaurin-nativer CFU-GM Kolonien an der Gesamtheit an geernteten Kolonien zwischen dem „Baseline Assay“ und dem „*in vivo* Midostaurin Assay“ korrelierte signifikant mit der relativen Reduktion des Anteils *KIT* D816V positiver, Midostaurin-nativer CFU-GM Kolonien zwischen dem „Baseline Assay“ und dem „*in vitro* Midostaurin Assay“ (Abbildung 18). Der Pearson-Korrelationskoeffizient betrug 0,8 mit statistischer Signifikanz ($p < 0,017$). Das Bestimmtheitsmaß ($R^2 = 0,641$) erlaubt die Annäherung der Varianz der Daten durch die lineare Regression.

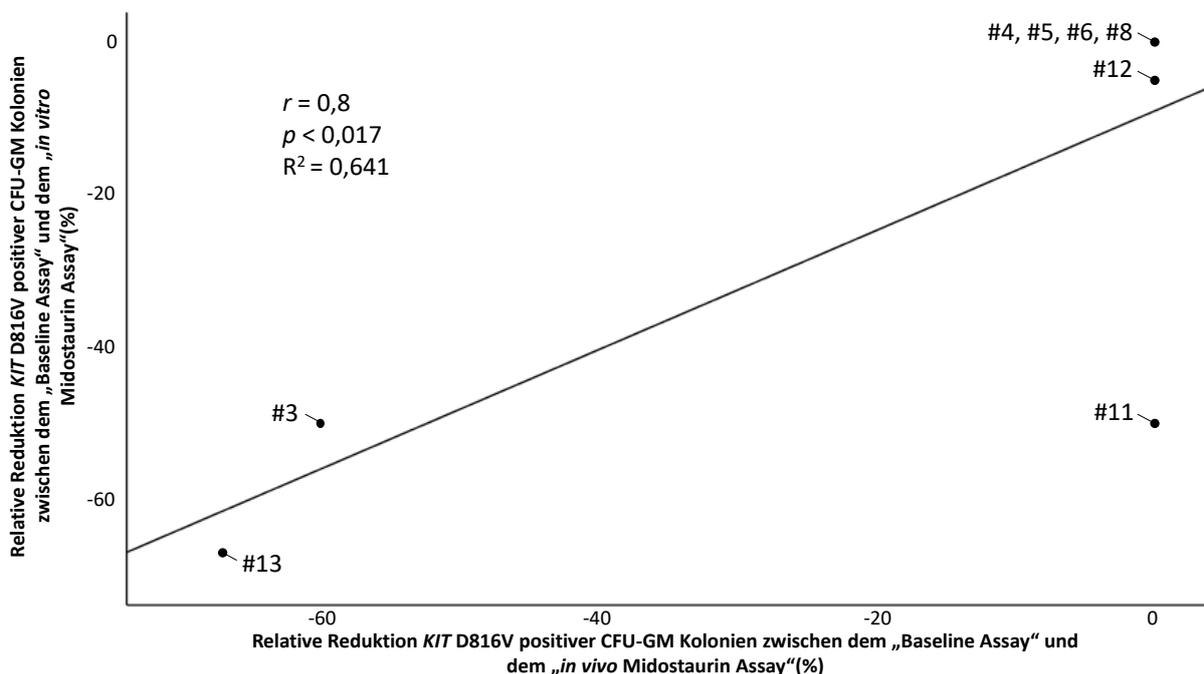


Abbildung 18: Korrelation der relativen Reduktion des Anteils *KIT* D816V positiver, Midostaurin-nativer CFU-GM Kolonien zwischen dem „Baseline Assay“ und dem „*in vivo* Midostaurin Assay“ mit der relativen Reduktion des Anteils *KIT* D816V positiver, Midostaurin-nativer CFU-GM Kolonien zwischen dem „Baseline Assay“ und dem „*in vitro* Midostaurin Assay“.

Für die Korrelationsberechnung wurde der Pearson-Korrelationskoeffizient bestimmt.

Abkürzung: CFU-GM, *colony-forming-unit-granulocyte-macrophage*.

Abbildung modifiziert nach Lübke *et al.*, 2019.

Bei 6/13 (46 %) Patienten konnte ein klinisches Ansprechen im Sinne der modifizierten Ansprechkriterien nach Valent *et al.* (Tabelle 16) beobachtet werden. Hinsichtlich klinischer Endpunkte konnte bei vier Patienten (#7, #10, #11, #13) eine inkomplette Remission (IR, engl. *incomplete remission*) und bei zwei Patienten (#3, #9) eine minimale partielle Remission (MPR, engl. *minor partial response*) beobachtet werden. Bei sieben Patienten (#1, #2, #4, #5, #6, #8, #12) wurde eine Progression (PD, engl. *progressive disease*) der Erkrankung identifiziert (Tabelle 12). Eine Reduktion des *KIT* D816V EAB ≥ 25 % im PB zeigten 5/13 (38 %) untersuchte Patienten (#3, #7, #9, #10, #13). Die relative Reduktion des *KIT* D816V EAB ≥ 25 % nach sechsmonatiger Therapie mit Midostaurin im PB korreliert mit dem klinischen Ansprechen des Patientenkollektivs mit Ausnahme von Patient #11, der nach sechsmonatiger Therapie ein klinisches Ansprechen aufweist. Der *KIT* D816V EAB des Patienten #11 steigt relativ um 72 %. Eine signifikante Assoziation zwischen der Reduktion des *KIT* D816V EAB im PB und der Reduktion des Anteils Midostaurin-nativer, mit Midostaurin beimpfter, *KIT* D816V positiver CFU-GM Kolonien nach zweiwöchiger *in vitro* Kultivierung ist der Kontingenztabelle 13 zu entnehmen. Die Signifikanz ist mit dem Zusammenhangsmaß des phi-Koeffizienten berechnet und mit $p < 0,003$ bestimmt worden. Kontingenztabelle 14 zeigt dagegen die signifikante Korrelation zwischen dem Mutationsstatus im S/A/R-Genpanel und der Reduktion des Anteils Midostaurin-nativer, mit Midostaurin beimpfter, *KIT* D816V positiver CFU-GM Kolonien nach zweiwöchiger *in vitro* Kultivierung. In diesem Fall ist die Signifikanz auf $p < 0,033$ bestimmt worden. Die korrelative Bedeutung hinsichtlich der Reduktion des *KIT* D816V EAB ≥ 25 % im PB und des Mutationsstatus ist in Abbildung 24 des Kapitels 7 hervorgehoben.

Tabelle 13: Korrelation zwischen der Reduktion des *KIT* D816V EAB im PB und der Reduktion des Anteils Midostaurin-nativer, mit Midostaurin beimpfter, *KIT* D816V positiver CFU-GM Kolonien.

		<i>In vitro</i> Antwort auf Midostaurin ^{b,c}		
		nein	ja	gesamt
Antwort hinsichtlich des <i>KIT</i> D816V EAB im PB ^a	nein	6	1	7
	ja	0	5	5
gesamt		6	6	12

^aAntwort definiert als Reduktion des *KIT* D816V EAB $\geq 25\%$ im PB nach sechs Monaten (Jawhar *et al.*, 2017c). ^bAntwort definiert als Reduktion des Anteil *KIT* D816V positiver CFU-GM Kolonien $\geq 50\%$ nach zwei Wochen. ^cIn drei Fällen wurden statt der *in vitro* die *in vivo* Daten für die Kontingenztabelle genutzt, da die *in vitro* Daten zu diesen Patienten (#7, #9, #10) nicht vorlagen.

Abkürzungen: CFU-GM, *colony-forming-unit-granulocyte-macrophage*; EAB, *expressed allele burden*; PB, peripheres Blut.

Tabelle modifiziert nach Lübke *et al.*, 2019.

Tabelle 14: Korrelation zwischen dem Mutationsstatus im S/A/R-Genpanel und der Reduktion des Anteils Midostaurin-nativer, mit Midostaurin beimpfter, *KIT* D816V positiver CFU-GM Kolonien.

		<i>In vitro</i> Antwort auf Midostaurin ^{a,b}		
		nein	ja	gesamt
S/A/R Mutationsstatus	0	0	3	3
	≥ 1	7	3	10
gesamt		7	6	13

^aAntwort definiert als Reduktion des Anteil *KIT* D816V positiver CFU-GM Kolonien $\geq 50\%$ nach zwei Wochen. ^bIn drei Fällen wurden statt der *in vitro* die *in vivo* Daten für die Kontingenztabelle genutzt, da die *in vitro* Daten zu diesen Patienten (#7, #9, #10) nicht vorlagen.

Tabelle modifiziert nach Lübke *et al.*, 2019.

3.2 Auswertung des Patientenkollektivs mit Eosinophilie

Eine zusammenfassende Übersicht der klinischen und laborchemischen Parameter ist in Tabelle 15 gegeben. Der Mutationsstatus der Patienten ist in Abbildung 20 zusammengefasst.

3.2.1 Detektion und Prävalenz der Mutation *STAT5B* N642H bei Patienten mit Eosinophilie

Zur Detektion der Mutation *STAT5B* N642H bei Patienten mit Eosinophilie wurde ein ARMS-PCR Assay etabliert. Dazu wurde in einer seriellen Verdünnungsreihe *STAT5B* N642H heterozygote cDNA in *STAT5B* N642H homozygoter cDNA gelöst. Bis zu einer Allelfrequenz von 10 % lässt sich die Mutation bei heterozygotem Mutationsstatus anhand der mutationsspezifischen Bande nebst der WT-spezifischen und obligatorischen Kontrollbande nachweisen (Abbildung 19). 1715 Patienten mit Eosinophilie wurden auf diese Mutation gescreent. Siebenundzwanzig der 1715 Patienten mit Eosinophilie (1,6 %) waren positiv, 26/27 Patienten heterozygot und ein Patient (#16) homozygot positiv. In 26 Fällen wurde dies durch die Sanger-Sequenzierung bestätigt. In 4/4 getesteten Fällen (#30, #32, #35, #36) konnte der *STAT5B* mutierte Klon nicht in kultivierten T-Zellen detektiert werden, sodass von einem somatischen Erwerb der Mutation ausgegangen werden kann.

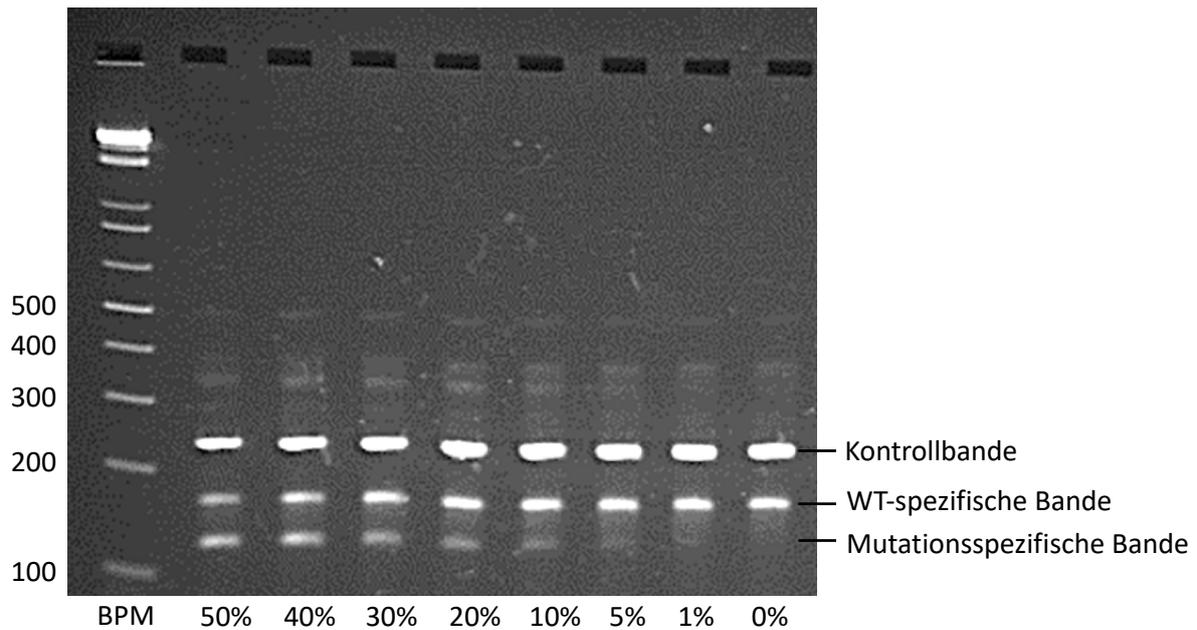


Abbildung 19: Gelelektrophorese nach ARMS-PCR Assay zur Detektion der *STAT5B* N642H Mutation bei Patienten mit Eosinophilie.

Durch eine serielle Verdünnungsreihe (*STAT5B* N642H heterozygote cDNA gelöst in *STAT5B* N642H homozygote cDNA) konnte bestimmt werden, dass sich die Mutation N642H im Gen *STAT5B* bis zu einer Allelfrequenz von 10 % sicher detektieren lässt. Bei heterozygotem Mutationsstatus sind drei Banden zu identifizieren: die Kontrollbande bei 243 Basenpaaren (bp), die WT-spezifische Bande bei 166 bp und die mutationsspezifische Bande bei 124 bp. Abkürzungen: BPM, Basenpaarmarker, WT; Wildtyp.

3.2.2 Deskriptive Analyse der klinischen und laborchemischen Parameter

Die 27 Patienten waren im Median 70 Jahre (7-89 Jahre), zu 70 % männlichen Geschlechts ($n = 19$) und die mediane Überlebenszeit lag bei 15,5 Monaten. Sechs Patienten waren zum Auswertungszeitpunkt noch am Leben, 20 Patienten bereits verstorben und von einem Patienten (#15) fehlen entsprechende Daten. Als hämatologische Parameter wurden im Median bestimmt: Leukozyten ($22,5 \times 10^9 /L$, $9-142 \times 10^9 /L$), Thrombozyten ($229 \times 10^9 /L$, $16-655 \times 10^9 /L$), Hb-Wert (11,4 g/dl, 6,5-15,8 g/dl) und die Eosinophilen ($6 \times 10^9 /L$, $0,5-27 \times 10^9 /L$). Dreiundzwanzig von 26 Patienten (88%) wiesen zum Diagnosezeitpunkt eine Eosinophilie auf. Die Patienten #20 und #31 mit diagnostiziertem MDS zeigten nach dreijähriger Erkrankungsdauer erstmalig eine Eosinophilie, Patient #40 (initiale Diagnose Polycythaemia vera) nach 25-jähriger Erkrankungsdauer. Die laborchemischen Parameter zu Patient #15 lagen nicht vor. Bei sieben Patienten (26 %) wurde die Diagnose einer idiopathischen HES und in zwei Fällen (7 %) die Diagnose CEL-NOS gestellt. Die verbleibenden 18 Patienten (67 %) erhielten eine Diagnose aus dem

Formenkreis der myeloischen Neoplasien, am häufigsten wurden sie einem MDS/MPN Subtypen zugeordnet (n = 11).

Fünf Patienten erhielten eine Therapie mit Imatinib für mindestens zwei Monate. Alle fünf Patienten sprachen nicht auf die Therapie an. Ein Patient mit SM-AHN erhielt Midostaurin, ein anfängliches Ansprechen wurde nach neun Monaten verloren.

Tabelle 15: Klinische und laborchemische Charakteristika der 27 *STAT5B* N642H positiven Patienten mit Eosinophilie.

Pat.#	Alter	M/ W	OS von Dx ^a	Tod	Lkz	Plt	Hb	Eos ^b	Initiale Diagnose
14	69	M	107	ja	16	280	10	1,5	aCML
15	65	M	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	HES
16	7	W	13	ja	30	343	15	11	Myeloisches Sarkom
17	89	M	12	ja	15	488	15	6	MPNu
18	70	M	12	ja	61	107	10	10	CMML
19	63	M	9	ja	28	113	16	0,7	MDS/MPN
20	58	M	14	ja	14	128	8,1	4	MDS-RA ^c
21	81	M	7	ja	18	409	9,4	10	MPNu
22	10	W	48	ja	47	157	11	27	HES
23	82	W	28	ja	25	150	10	2	CMML + MM
24	86	M	45	ja	21	n.v.	15	6	HES
25	61	M	12	ja	15	16	13	5	CMML
26	68	M	31	ja	12	106	11	5	HES
27	70	M	16	ja	142	111	7,3	1,4	SM-AHN
28	72	M	68	nein	21	556	15	6	MDS/MPNu
29	76	M	23	ja	42	275	9,2	19	MDS/MPNu
30	61	W	61	nein	9	438	11	1,2	MDS/MPN-RS-T
31	72	M	14	ja	11	120	16	7	MDS-RCMD ^c
32	77	M	15	ja	24	34	14	7	HES
33	51	W	35	nein	19	151	9,0	3	MDS/MPNu
34	64	W	14	ja	28	267	12	10	HES
35	15	W	48	nein	28	655	13	4	CEL-NOS
36	75	W	23	ja	24	238	11	3	MDS/MPN
37	83	M	9	nein	29	401	15	13	HES
38	85	M	4	ja	39	229	14	20	CEL-NOS
39	70	M	9	ja	17	195	6,5	6	MDS/MPNu
40	42	M	60	nein	12	267	13	0,5	PV ^d

^aOverall survival von Diagnosezeitpunkt in Monaten. ^bEosinophilen-Wert bei initialer Diagnose oder beim ersten Auftreten der Eosinophilie. ^cEosinophilie nach dreijähriger Erkrankungsdauer erworben. ^dEosinophilie nach 25-jähriger Erkrankungsdauer erworben.

Abkürzungen: aCML, atypische chronische myeloische Leukämie; CEL-NOS, chronische Eosinophilenleukämie, *not otherwise specified*; CMML, chronische myelomonozytäre Leukämie; Dx, Diagnose; Eos, Eosinophile ($\times 10^9/L$); Hb, Hämoglobin (g/dl); HES, Hypereosinophiles Syndrom; Lkz, Leukozyten ($\times 10^9/L$); MDS/MPN, myelodysplastische/myeloproliferative Mischform; MDS/MPNu, unklassifizierbare myelodysplastische/myeloproliferative Neoplasie; MDS-RA, MDS mit refraktärer Anämie; MDS/MPN-RS-T, MDS mit Ringsideroblasten und Thrombozytose; MDS-RCMD, MDS mit refraktärer Zytopenie und multilineärer Beteiligung; MM, Multiples Myelom; MPNu, unklassifizierte myeloproliferative Neoplasie; M/W, männlich/weiblich; n.v. Daten nicht vorhanden; OS, *overall survival*; Pat, Patient; Plt, Thrombozyten ($\times 10^9/L$); PV, Polycythaemia vera.

Tabelle modifiziert nach Cross *et al.*, 2019.

3.2.3 Mutationsanalyse bei *STAT5B* N642H positiven Mutationsstatus

Von allen 27 Patienten mit Eosinophilie konnte der Mutationsstatus erhoben werden. Alle Patienten (100 %) wiesen die Mutation N642H in *STAT5B* auf. Im Median gab es zwei Zusatzmutationen mit einer Spannweite von null bis vier Mutationen. Vier Patienten wiesen keine Zusatzmutation auf und wurden fortan als molekulare Gruppe 1 klassifiziert. In den Gruppen 2 und 3 konnte dagegen mindestens eine Zusatzmutation detektiert werden, wobei sich die Patienten der Gruppen 2 ($n = 9$) und 3 ($n = 14$) im Mutationsstatus des *SF3B1*-Gens unterschieden. Während alle Patienten der Gruppe 2 im *SF3B1*-Gen mutiert waren, konnten in Gruppe 3 keine *SF3B1* Mutationen nachgewiesen werden. Diverse Zusatzmutationen wurden sowohl in Gruppe 2 als auch in Gruppe 3 identifiziert und in Abbildung 20 zusammenfassend dargestellt. Eine Korrelation zwischen den klinischen Diagnosen von Tabelle 15 und den molekularen Gruppen von Abbildung 20 konnte nicht aufgezeigt werden. Beispielsweise divergieren die Patienten mit initialer HES-Diagnose in Gruppe 1 ($n = 1$), Gruppe 2 ($n = 2$) und Gruppe 3 ($n = 4$) und die Patienten mit negativen *SF3B1* Mutationsstatus in neun verschiedene initiale Diagnosen. Mutationen im S/A/R Genpanel liegen in Gruppe 3 in 10/14 (71 %) Fällen vor, in Gruppe 2 dagegen nur in 1/9 (11 %) Fällen ($p = 0,009$).

	Gruppe 1				Gruppe 2									Gruppe 3														
	22	23	31	35	14	15	20	21	24	27	28	30	33	16	17	18	19	25	26	29	32	34	36	37	38	39	40	
STAT5B																												
SF3B1																												
TET2																												
SRSF2																												
ASXL1																												
EZH2																												
RUNX1																												
U2AF1																												
DNMT3A																												
NRAS																												
CBL																												
IDH2																												
ZRSR2																												
KIT																												
KRAS																												
JAK2																												
CUX1																												

Abbildung 20: Molekulare Übersicht des Patientenkollektivs mit Eosinophilie und STAT5B N642H positiven Mutationsstatus (n = 27).

Die Gesamtheit der durch ARMS-PCR Assay, Sanger-Sequenzierung und myeloische Panel-Analyse entdeckten Mutationen sind abgebildet. Vertikal werden drei Gruppen gegliedert: Gruppe 1 (n = 4) subsummiert Patienten, die keine weiteren Zusatzmutationen aufwiesen. Gruppe 2 (n = 9) zugeordnete Patienten waren ergänzend zu STAT5B N642H auch immer im Gen SF3B1 mutiert, währenddessen Patienten, die in Gruppe 3 eingeordnet wurden, keine Mutation im Gen SF3B1 zeigten, aber dafür mindestens eine andere somatische Zusatzmutation (n = 14).

Abbildung modifiziert nach Cross *et al.*, 2019.

3.2.4 Einfluss von Zusatzmutationen bei Patienten mit Eosinophilie und STAT5B N642H positivem Mutationsstatus auf das Gesamtüberleben

Um den Einfluss von Zusatzmutationen auf das Gesamtüberleben von Patienten mit Eosinophilie und positivem STAT5B N642H Mutationsstatus zu evaluieren, wurden die Patienten in verschiedene molekulare Gruppen gegliedert (Abbildung 21). Es standen die Überlebensdaten von n = 23 Patienten zur Verfügung. In Abbildung 21a zeigt sich ein signifikanter Überlebensvorteil ($p < 0,001$) von Patienten mit SF3B1 Mutation (Gruppe 2; n = 7) im Gegensatz zu Patienten mit negativem Mutationsstatus (Gruppe 1 und 3; n = 3, n = 13). Der Überlebensvorteil ist im Median auf 65 versus 14 Monate

quantifiziert. Als prognostisch negativ mit geringerem Gesamtüberleben konnten Fälle mit ≥ 2 Zusatzmutationen ($n = 9$) identifiziert werden (Abbildung 21b). Im Median überlebten diese Patienten 18 Monate im Gegensatz zu 50 Monaten bei Patienten mit höchstens einer Zusatzmutation ($n = 14$; $p = 0,001$).

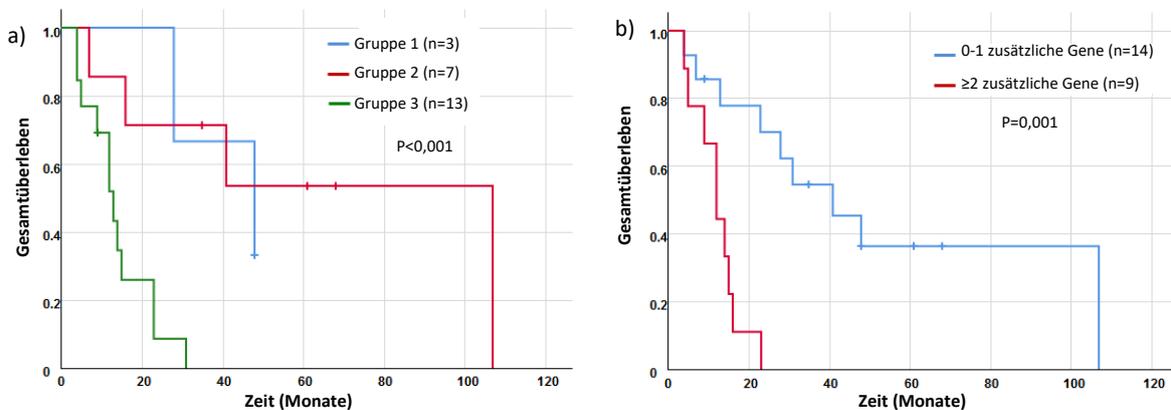


Abbildung 21: Kaplan-Meier-Kurven der Überlebensdaten von Patienten mit Eosinophilie und positivem *STAT5B* N642H Mutationsstatus.

Es standen die Daten von $n = 23$ Patienten zur Auswertung zur Verfügung.

a) Bei Vergleich der Patienten, stratifiziert in drei unterschiedliche molekulare Gruppen, ergibt sich bei dem Kollektiv mit Mutationen in *SF3B1* ein signifikant besseres Gesamtüberleben als bei *SF3B1* negative Patienten mit Zusatzmutationen in anderen Genen ($p < 0,001$).

b) Hier zeigt sich ein schlechteres Gesamtüberleben von Patienten mit ≥ 2 Zusatzmutationen im Vergleich zu Patienten mit keiner oder nur einer identifizierten zusätzlichen somatischen Mutation ($p = 0,001$).

Abbildung modifiziert nach Cross *et al.*, 2019.

3.2.5 Klonale Mutationshierarchie bei Patienten mit Eosinophilie

Um zu verstehen, ob der Erwerb der *STAT5B* N642H Mutation ein frühes oder spätes Ereignis ist, wurden CFU-GM Kolonien von vier Patienten (#27, #30, #32, #36) genotypisiert (Abbildung 22). Bei Patient #27 wurden sechs verschiedene Mutationen in fünf Genen nachgewiesen. Alle Kolonien ($n = 17$) wiesen Mutationen in *SF3B1* und zwei verschiedene Mutationen im *TET2*-Gen auf. Fünfzehn CFU-GM Kolonien (88 %) wiesen zudem die Mutationen *STAT5B* N642H und *KRAS* V14I auf, in zwei CFU-GM Kolonien (12 %) konnte die Mutation D816V im Gen *KIT* detektiert werden. Bei Patient #30 wurden $n = 5$ CFU-GM Kolonien (36 %) ohne und $n = 9$ CFU-GM Kolonien (64 %) mit der *STAT5B* Mutation identifiziert. Bei Patient #32 lag in allen detektierten Kolonien die *STAT5B* N642H Mutation vor. In $n = 10$ Klonen (42 %) konnte die *ASXL1* Mutation bestimmt werden. Uniform präsentierten sich die CFU-GM Kolonien ($n = 14$) des Patienten #36, die sich allesamt positiv mutiert in *STAT5B*, *ASXL1* und *U2AF1* zeigten.

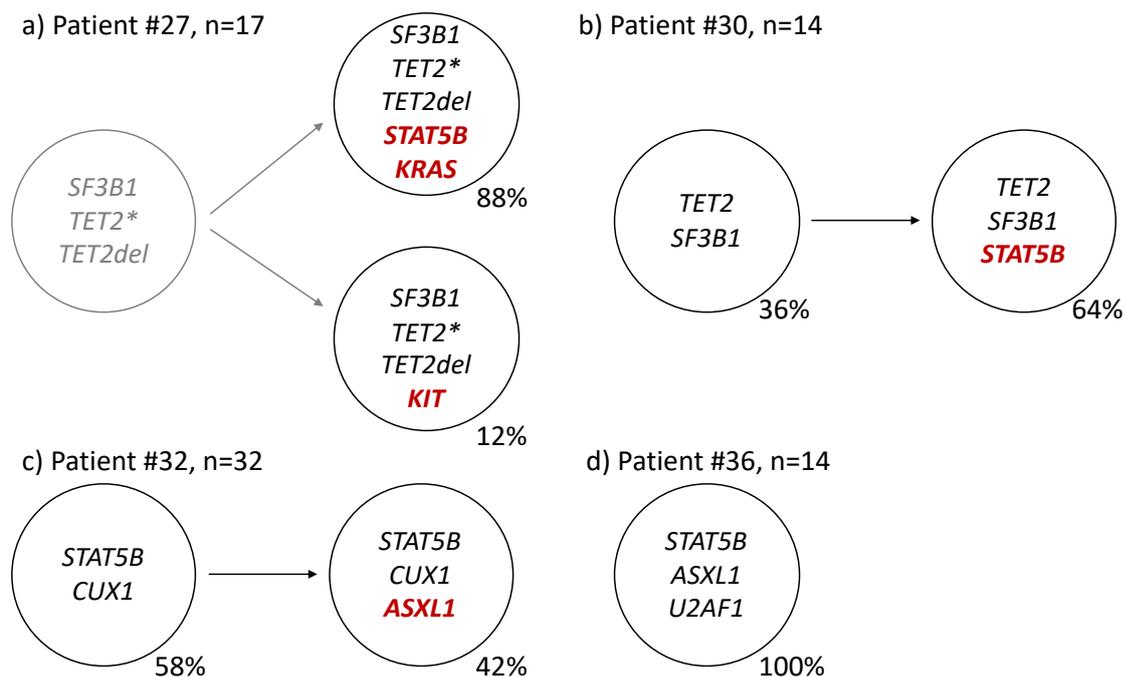


Abbildung 22: Klonale Mutationshierarchie bei n = 4 Patienten mit Eosinophilie.

Bei den Patienten #27, #30, #32, #36 konnten CFU-GM Kolonien isoliert und die in den entsprechenden Kreisen dargestellten Kolonien detektiert werden. In rot hervorgehoben sind im Verlauf zusätzlich akquirierte Mutationen.

a) Bei Patient #27 konnten insgesamt n = 17 CFU-GM Kolonien ausgewertet werden. Dabei wurden sechs Mutationen in fünf verschiedenen Genen beobachtet. Alle Klone enthielten Mutationen in *SF3B1* und zwei unabhängige Mutationen in *TET2* (Asterisk). 88 % der CFU-GM Kolonien waren zudem in *STAT5B* sowie *KRAS* und die verbliebenen 12 % in dem Gen *KIT* mutiert. In grau hinterlegt ist ein voraussichtlich gemeinsamer Vorläufer-Klon.

b) In allen CFU-GM Kolonien (n = 14) vom Patient #30 wurden Mutationen in *TET2* und *SF3B1* detektiert. Mutationen in N642H des Gens *STAT5B* wurden in 64 % der Kolonien (n = 9) identifiziert.

c) Alle Klone (n = 32; 100 %) des Patienten #32 enthielten Mutationen in *STAT5B* und *CUX1*, während 42 % der CFU-GM Kolonien (n = 10) in *ASXL1* mutiert waren.

d) Alle CFU-GM Kolonien (n = 14; 100 %) des Patienten #36 präsentierten sich mit Mutationen in *STAT5B*, *ASXL1* und *U2AF1* uniform.

Abbildung modifiziert nach Cross *et al.*, 2019.

4 Diskussion

Der Fortschritt in diagnostischen Analysemöglichkeiten – insbesondere in molekulargenetischen Nachweisverfahren – hat im Rahmen der translationalen Forschung zu einem Paradigmenwechsel in der Hämatologie geführt. Er ermöglicht nun in vielen Fällen durch eine Zusammenschau hämatologischer, zytologischer, histomorphologischer sowie molekulargenetischer Befunde eine bessere Subtypisierung der Erkrankung, die Bestimmung von prognostischen Faktoren und die Charakterisierung primärer und erworbener Therapieresistenzen. Außerdem kann durch die Ermittlung prädiktiver Marker vor dem Hintergrund einer fach- und zielgerechten Therapieentscheidung eine professionelle Behandlungsstrategie ermittelt, eine Verbesserung der Lebensqualität und unter Umständen sogar eine Verlängerung des Überlebens erreicht werden.

Grundlage der gegenwärtigen Arbeit ist das seit 2009 etablierte deutschlandweite „Register für Erkrankungen der Eosinophilen und Mastzellen“ sowie das 2014 vom „Europäischen Kompetenznetzwerkes Mastozytose“ (ECNM) zertifizierte „Referenz- und Exzellenzzentrum für Mastzellerkrankungen“, in dem klinische, laborchemische und molekulargenetische Daten zusammengetragen sowie biologisches Material asserviert wird. Hieraus sind in den vergangenen Jahren vor allem prognostische Marker etabliert worden. Die Patientenkollektive wurden aus dem Bestand der Datenbank rekrutiert bzw. neu im Laufe der Studie eingegliedert. Die ECNM-Referenzpathologen (Prof. H.P. Horny, München und Prof. K. Sotlar, Salzburg) wurden für die histologische Auswertung der Patientenkollektive herangezogen. Über die Bedeutung der histologischen Auswertung in einem Referenzzentrum hinsichtlich einer Reduktion des Anteils an Fehldiagnosen referierte unsere Arbeitsgruppe im Jahr 2016 (Jawhar *et al.*, 2016b).

Ein Ziel der aktuellen Arbeit ist die Etablierung und Auswertung von Einzelzellbasierten Kolonie-Assays von Midostaurin-naiven Patientenproben unter *in vitro* Inkubation mit dem Multikinase-Inhibitor Midostaurin, um ein mögliches *in vivo* Ansprechen unter Berücksichtigung klinischer, laborchemischer, histologischer und molekularer Parameter präzisieren zu können. Die zeitgleich unabhängige Inkubation mit dem selektiven KIT-Inhibitor Avapritinib lässt vergleichende Aussagen über die *in*

in vitro Effektivität beider Medikamente zu. Der Vergleich bzw. die Korrelation zwischen Klinik, Labor, Histopathologie, Molekulargenetik und entsprechenden Kolonie-Daten soll zu einem besseren Verständnis über Zusammenhänge in Pathophysiologie, Prognosemarker, klonaler Evolution und Architektur unter dem Einfluss der genannten Medikamente beitragen.

Bei 11/13 (85 %) Patienten konnte die Diagnose einer SM-AHN etabliert werden. Die Möglichkeit der Assoziation der SM mit einer morphologisch erkennbaren, zusätzlichen hämatologischen Neoplasie ist seit mehr als 30 Jahren bekannt (Travis *et al.*, 1988) und wird in der Literatur mit 20-40 % angegeben (Horny *et al.*, 1985; Lim *et al.*, 2009; Sperr *et al.*, 2002; Travis *et al.*, 1988). Der prozentuale Anteil einer SM-AHN unter den fortgeschrittenen SM ist in unserem internen Register auf 69 % (n = 276; nicht publizierte Daten) bestimmt worden. Eine ähnlich häufige Kombination zweier hämatologischer Neoplasien mit Multilinenbeteiligung ist bei keiner anderen Entität bekannt. In unserer Patientenkohorte wiesen drei Patienten eine CMML, sieben Patienten ein MDS/MPN und ein Patient eine MPN-eo auf. Entsprechend anderer Patientenkohorten konnten wir damit in unserer Arbeit vornehmlich eine AHN vom myeloischen Subtyp identifizieren (Sperr *et al.*, 2000; Sperr *et al.*, 2002; Travis *et al.*, 1988).

Einschlusskriterium für die vorliegende Arbeit am SM-Patientenkollektiv war die *KIT* D816V Mutation. Mehrere Arbeiten zeigen eine Korrelation zwischen Allellast und Phänotyp sowie Prognose auf (Erben *et al.*, 2014; Hoermann *et al.*, 2014). Hoermann *et al.* postulierten zudem eine Abhängigkeit der Allellast von der zugrundeliegenden Subentität der SM. Unsere Arbeitsgruppe etablierte einen Assay auf RNA/cDNA-Ebene, welcher mittels rt-qPCR noch eine Mutationslast von 0,1 % nachweisen kann (Erben *et al.*, 2014). Die *KIT* D816V Mutation kann in > 90 % der SM und der SM-AHN detektiert werden (Erben *et al.*, 2014; Hoermann *et al.*, 2014). Eine Alternative zur konventionellen Methode stellt die digitale PCR (dPCR) dar, bei der der Reaktionsansatz auf viele kleine Partitionen verteilt wird. In diesen Partitionen wird dann die Ziel-DNA, falls vorhanden, akkumuliert und positive (1) von negativen (0) Endpunktsignalen (0/1) unterschieden. Über die Poisson-Verteilung wird Rechnung getragen, dass in einer Partition mehr als ein Molekül der Zielsequenz enthalten sein könnte. Die Vorteile gegenüber bestehenden Verfahren sind unter anderem die

Nichtnotwendigkeit einer externen Kalibration, eine erhöhte Toleranz gegenüber Inhibitoren und die gesteigerte Präzision durch kleinere Reaktionsvolumina. Die Möglichkeit der sensitiven und präzisen Quantifizierung der *KIT* D816V Mutation durch die dPCR wurde durch die Arbeitsgruppe um Greiner *et al.* 2018 gezeigt (Greiner *et al.*, 2018). Die Etablierung einer Chip-basierten dPCR findet auch an unserem Zentrum statt (Naumann *et al.*, 2018a).

Bei einem Großteil der Patienten präsentierte sich die Mutation *KIT* D816V, die als Klonalitätsmarker dient, nicht nur in der Mastzelllinie, sondern auch in multiplen anderen hämatopoetischen Zelllinien und findet sich deshalb auch in neoplastischen Zellen wieder, die mit der AHN-Komponente assoziiert sind (Sotlar *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2013). Es stellt sich die Frage nach der klonalen Architektur der Erkrankung. Durch Mikrodissektion einzelner Zellen von verschiedenen Zellreihen konnte eine enge klonale Beziehung der SM insbesondere zur CMML und MDS/MPN identifiziert und die These einer gemeinsamen Progenitorzelle der SM- und AHN-Erkrankung formuliert werden (Sotlar *et al.*, 2010). Andererseits fand sich in den untersuchten mikrodissezierten Zellen der lymphatischen AHN (multiples Myelom, Non-Hodgkin-Lymphom) die *KIT* D816V Mutation nicht.

Die bipotente hämatopoetische CFU-GM ist eine relativ reife Progenitorzelle. Die Zelllinie der Mastzelle stammt höchstwahrscheinlich aus frühen Vorläuferzellen ab (Agis *et al.*, 1996; Agis *et al.*, 1993). Unsere Kolonie-Assays untersuchen somit die klonale Diversität und Dynamik myeloischer Zellreihen. Entsprechende Progenitorzellen wurden von unserer Arbeitsgruppe bereits auf das Vorliegen verschiedener Mutationen hin untersucht. Die phänotypisch dominierende *KIT* D816V Mutation stellt in der Krankheitshierarchie ein spätes Ereignis dar, Zusatzmutationen (z.B. *TET2*, *SRSF2*, *ASXL1*) werden dagegen früher erworben (Jawhar *et al.*, 2015). Interessanterweise sind mit den Patienten #11 und #13 zwei Patienten in die Patientenkohorte inkludiert, denen nach morphologischen Gesichtspunkten bisher nicht die Diagnose einer AHN zustand. Da aber die *KIT* D816V Mutation in den myeloischen Zelllinien des CFU-GM Assays zweifelsfrei nachgewiesen werden konnte, maskiert möglicherweise das SM-Kompartiment die AHN. Über die Herausforderung der akkuraten Diagnostik bei SM-AHN wurde bereits berichtet (Jawhar *et al.*, 2016b; Sotlar *et al.*, 2010; Zhrebker *et al.*, 2014).

Zahlreiche, v.a. erst kürzlich publizierte Daten unterstreichen zudem die Bedeutung von Klonalitätsanalysen mit MNC für ein tiefergehendes Verständnis der klonalen Architektur und molekularen Evolution der SM sowie anderer multimutierter myeloischer Neoplasien (Bendall und Nolan, 2012; Hou *et al.*, 2012; Jan *et al.*, 2012; Jawhar *et al.*, 2015; Landau *et al.*, 2013; Lundberg *et al.*, 2014; Melchor *et al.*, 2014; Papaemmanuil *et al.*, 2013). Arenas Cortes *et al.* konnten im *ex vivo* Modell mit MNC und Zelllinien synergistische Effekte in Hinblick auf Fibrose, Immunmodulation und Antiproliferation unter Verwendung der TKI Ruxolitinib und Nilotinib in Kombination mit Prednison feststellen (Arenas Cortes *et al.*, 2018).

Die Patienten unseres advSM-Kollektivs erhielten wie in der Zulassungsstudie CPKC412D2201 und der Studie CPKC412A2213 zweimal täglich 100 mg Midostaurin (DeAngelo *et al.*, 2018; Gotlib *et al.*, 2016). Für die Evaluation des primären Endpunktes (ORR) wurden in der Zulassungsstudie die modifizierten Ansprechkriterien nach Valent benutzt, die auch im Rahmen dieser Studie Anwendung fanden. Neben der qualitativen bzw. quantitativen Reduktion von C-findings, beruht das Therapieansprechen vor allem auf Basis der Reduktion der Mastzell-Last, welches sich bspw. in der Mastzellinfiltration im KM oder der Tryptase i.S. manifestiert. Diese Vorgehensweise berücksichtigt möglicherweise aber nicht ausreichend das Ansprechen des Nicht-Mastzell-Kompartiments (AHN). In dieser Hinsicht konnte unsere Arbeitsgruppe kürzlich nicht nur zeigen, dass eine Reduktion des *KIT* D816V EAB $\geq 25\%$ nach sechsmonatiger Midostaurintherapie mit einem/r signifikant besseren Therapieansprechen/Prognose einhergeht, sondern stellte zudem die Überlegenheit des Prognosemarkers gegenüber anderen Ansprechkriterien dar (Jawhar *et al.*, 2017c), da der Klonalitätsmarker *KIT* D816V faktisch beide Kompartimente repräsentiert. Das *in vitro/in vivo* Ansprechen der CFU-GM Kolonien auf Midostaurin wurde deshalb mit bekannten Prognosemarkern/Therapiemarkern verglichen. Die relative Reduktion *KIT* D816V positiver Kolonien unter *in vitro* Inkubation mit Midostaurin entsprach mit statistischer Signifikanz ($r = 0,8$; $p < 0,017$; $R^2 = 0,641$) der relativen Reduktion *KIT* D816V positiver Kolonien nach sechsmonatiger *in vivo* Therapie und weitgehend dem klinischen Ansprechen. Tabelle 12 spiegelt zudem die starke Korrelation ($p < 0,003$) zwischen dem Ansprechen der Kolonien und der Reduktion der *KIT* D816V Mutationslast $\geq 25\%$ wider. Damit konnte der *in vitro* Assay innerhalb der zweiwöchigen Wachstumsphase der CFU-GM

Kolonien als klarer Prädiktor für das *in vivo* Ansprechen des Patienten auf Midostaurin etabliert werden. Zudem beweist es die Hypothese, dass Midostaurin neben dem Mastzell-Kompartiment auch die *KIT* D816V positive AHN zielgerichtet beeinflusst.

Die Untersuchungsergebnisse (Kontingenztafel 13) zeigten zudem eine signifikante Korrelation ($p < 0,033$) zwischen der Abwesenheit von Mutationen im S/A/R Genpanel und dem Ansprechen von Midostaurin *in vitro*. Über die molekulare Architektur hinsichtlich zusätzlicher Mutationen bei advSM und ihrer prognostischen Bedeutung ist mehrfach vorberichtet. Schwaab *et al.* konnten im Jahr 2013 folgende Mutationen bei der SM detektieren: *TET2*, *SRSF2*, *ASXL1*, *RUNX1*, *JAK2*, *CBL*, *SF3B1*, *IDH2* (Schwaab *et al.*, 2013). Ähnlich zu unserer Patientenkohorte wiesen über 90 % der Patienten eine Zusatzmutation auf. Bereits früh konnte von zahlreichen Arbeitsgruppen ein Zusammenhang zwischen zusätzlichen Mutationen sowie aggressiverem Phänotyp und schlechterem klinischen Verlauf aufgezeigt werden (Damaj *et al.*, 2014; Hanssens *et al.*, 2014; Schwaab *et al.*, 2013). Kurze Zeit später konnte unsere Arbeitsgruppe durch die Erweiterung der molekulargenetischen Analysen auf mehr als 100 Patienten und unter Hinzunahme klinischer, laborchemischer und histologischer Daten die Auswirkung einzelner Zusatzmutationen auf klinische Charakteristika und Prognose untersuchen (Jawhar *et al.*, 2016a). Patienten mit zusätzlichen Mutationen im S/A/R Genpanel zeichneten sich durch einen besonders aggressiven Phänotyp und eine schlechte Prognose aus (Jawhar *et al.*, 2016c). Auch in anderen myeloischen Neoplasien konnten vergleichbare adverse Effekte von zusätzlichen somatischen Mutationen auf Krankheitsprogression und schlechterer Lebenserwartung festgestellt werden (Alvarez Argote und Dasanu, 2018; Haferlach *et al.*, 2014; Itzykson *et al.*, 2013; Lin *et al.*, 2016). In einer multizentrischen Studie (Etablierungskohorte, $n = 231$; Validierungskohorte, $n = 152$) konnte schließlich ein von der WHO-Klassifikation unabhängiger prognostischer Score aus fünf Parametern (*Mutation-Adjusted Risk Score for advSM*, MARS; Alter >60 Jahre, Hb < 10 g/dl, Thrombozyten < $100 \times 10^9/L$, 1 Mutation im S/A/R Genpanel, ≥ 2 Hochrisiko-Mutationen) für die advSM etabliert werden, der zukünftig eine bessere Prognoseabschätzung des heterogenen Patientenkollektivs erlaubt und damit eine Antwort auf die genetische und klinische Komplexität der SM im Allgemeinen und der advSM im Speziellen darstellen könnte (Jawhar *et al.*, 2019).

Bei 7/11 (64 %) Patienten konnte unter der *in vitro* Inkubation mit Midostaurin keine signifikante Reduktion *KIT* D816V positiver Kolonien detektiert werden, was möglicherweise auf das Vorhandensein zusätzlicher Mutationen zurückzuführen sein könnte. Im Median konnten 2,5 zusätzliche Mutationen identifiziert werden. Bis auf Patient #2 und #5 mit nur einer zusätzlichen Mutation bestimmten wir bei den übrigen Patienten (#1, #4, #6, #8, #12) ≥ 2 Mutationen im S/A/R Genpanel. Der inhibitorische Einfluss von Midostaurin (und Avapritinib) auf zusätzliche vorbekannte somatische Mutationen ist bei den untersuchten Proben (#4, #5, #8, #9, #10) nicht nachweisbar. Es konnte keine Reduktion der Allellast in den CFU-GM Kolonien detektiert werden. Die Gründe einer primären/initialen bzw. einer sekundären (Verlust des initialen Ansprechens) Therapieresistenz gegenüber Midostaurin sind bisher nicht abschließend geklärt und bedürfen zukünftig einer tiefergehenden Betrachtung. Drei Hypothesen der Resistenzentwicklung sind beschrieben (Valent *et al.*, 2017a): a) molekular (erworbene) Resistenz im Sinne einer sekundären Mutation in kritischen proliferations- und differenzierungsbedingenden Genen, b) Resistenz der leukämischen Stammzelle bspw. durch abnorme Änderungen des Mikromilieus oder der Expression von *Multi-Drug Resistance Proteins* (MDR), c) pharmakologische Resistenz durch metabolische Akkumulation inaktiver Metabolite. Mithilfe der Immunphänotypisierung (FACS) könnten Zellen auf verschiedenen Differenzierungsebenen selektiv getrennt und einzelne Zellfraktionen auf molekularer Basis und damit die Resistenzmechanismen in SM und AHN separat untersucht werden. Unter potentiell den hypothetisch formulierten Resistenzmechanismen überwindenden Therapiestrategien fallen synergistisch wirkende Kombinationstherapien (Gleixner *et al.*, 2006; Gleixner *et al.*, 2007; Gleixner *et al.*, 2013; Gotlib, 2006). Besonders effektiv scheint hier zukünftig die Kombination mit dem Antimetaboliten Cladribin zu sein (Gleixner *et al.*, 2006). Bereits erfolgreich Anwendung fand die Verwendung von Midostaurin in Kombination mit herkömmlicher Chemotherapie bei hämatologischen Hochrisiko-Neoplasien wie z.B. der *FLT3* positiven AML (Stone *et al.*, 2015).

Der primäre Endpunkt der Zulassungsstudie für Midostaurin war die ORR basierend auf den Ansprechkriterien nach Valent, die für Patienten mit *KIT* D816V positiven Mutationsstatus auf 63 % bestimmt werden konnte (Gotlib *et al.*, 2016). Eine explorative post-hoc-Analyse der EMA nach den Konsensuskriterien der *International Working Group - Myeloproliferative Neoplasms Research and Treatment - European*

Competence Network on Mastocytosis (IWG-MRT-ECNM) bestimmte das Ansprechen auf 28 % (Kasamon *et al.*, 2018). Einschränkend ist auf die Tatsache hinzuweisen, dass es trotz ausbleibender vollständiger hämatologischer Remissionen bei vielen Patienten zu einer signifikanten Verbesserung der klinischen Symptomatik und der Lebensqualität kommen kann, die in vorgenannten Kriterien nicht ausreichend Berücksichtigung finden (Gotlib *et al.*, 2016; Krauth *et al.*, 2009; Peter *et al.*, 2016). Gleichwohl besteht weiterhin ein großer Bedarf nach neuen und verbesserten Therapieoptionen. Avapritinib, ein selektiver KIT-Inhibitor, wurde in unserer Studie neben Midostaurin kohärent auf die Wirksamkeit der Reduktion *KIT* D816V positiver CFU-GM Kolonien getestet. Nach zweiwöchiger *in vitro* Inkubation waren die Ergebnisse (Reduktion der *KIT* D816V positiven Kolonien) der Avapritinib-beimpften den Midostaurin-beimpften Kolonien überlegen. Interessanterweise konnten wir sogar drei Midostaurin *Non-Responder* identifizieren, die ein Ansprechen bei Inkubation mit Avapritinib zeigten (#1, #2, #5), während vier Patienten (#4, #6, #8, #12) sowohl Midostaurin als auch Avapritinib *Non-Responder* waren. Klinisch lassen sich die vier Patienten durch eine vergleichbar niedrigere Mastzelllast mit niedrigerer Mastzellinfiltration im KM und niedrigerer Tryptase i.S. charakterisieren. Demgegenüber steht der hohe *KIT* D816V EAB (repräsentiert bei SM-AHN beide Kompartimente der Erkrankung) sowie die Identifikation von ≥ 2 Mutationen im S/A/R Genpanel. Die molekularen Marker präzisieren damit ein Ansprechen auf Midostaurin besser als die histomorphologischen Parameter. Durch die Teilnahme unseres Zentrums in der einarmigen Phase-II-Studie zur Effektivität und Sicherheit von Avapritinib (NCT03580655) können wir zukünftige *in vivo* Daten mit *in vitro* Daten vergleichen. Ferner liefern die vorliegenden Resultate wichtige Implikationen in Bezug auf zukünftige Therapiestrategien bei Midostaurin-resistenten Patienten. Als folgerichtig erscheint in diesem Fall der sequentielle Einsatz von Avapritinib nach Midostaurin-Resistenz, allerdings nicht *vice versa*.

Die Bedeutung einer am genetischen Profil orientierten, zielgerichteten Therapie (*targeted therapy*) in der Behandlung myeloischer Neoplasien konnte im Rahmen dieser Arbeit hinsichtlich Midostaurin und Avapritinib aufgezeigt werden. Die Detektion molekularer Marker wie *KIT* D816V, *JAK2* V617F oder *FIP1L1-PDGFR*A tragen zur Diagnosestellung bei und implizieren einen Therapieerfolg mit spezifischen TKIs wie Midostaurin (*KIT* D816V), Ruxolitinib (*JAK2* V617F) oder Imatinib (*FIP1L1-PDGFR*A).

Neben Patienten mit vorgenannten Mutationen finden sich in unserem „Register für Erkrankungen der Eosinophilen und Mastzellen“ auch Patienten, die keinen dieser Marker exprimieren, aber dennoch klinische und laborchemische Hinweise auf das Vorliegen einer MPN zeigen. Viele dieser Patienten fallen mit einer persistierenden Eosinophilie auf. Patienten mit Eosinophilie und ohne den Nachweis einer der typischen Treibermutationen sind deshalb zum Gegenstand weiterer Untersuchungen der vorliegenden Arbeit geworden.

Durch die enge wissenschaftliche Kooperation mit Herrn Prof. Dr. NCP Cross (Wessex Regional Genetics Laboratory, Salisbury, UK) konnten 27/1715 (1,6 %) Patienten mit Eosinophilie und ohne Nachweis eines Fusionsgens identifiziert werden, die die Mutation N642H im Gen *STAT5B* codieren. Mitglieder der STAT-Protein-Familie sind intrazelluläre Transkriptionsfaktoren, die an der Signaltransduktion extrazellulärer Botenstoffe (u.a. IL-3, IL-5 und GM-CSF) beteiligt sind und damit u.a. das Immunsystem, das Zellwachstum und auch die Proliferationsrate jener Zellen beeinflussen können. Bisher konnten sieben verschiedene STAT-Proteine mit einer Molekülgröße von 86 bis 113 kDa, darunter STAT5A und STAT5B, nachgewiesen werden (Grimley *et al.*, 1999). STAT5 wurde ursprünglich als *mammary gland factor* (MGF) identifiziert (Wakao *et al.*, 1994). Die zwei verschiedenen Isoformen STAT5A und STAT5B wurden bei der Beschreibung, welche STATs aus selbiger Protein-Familie an der Transduktion des Signals von IL-3 beteiligt sind, 1995 isoliert. STAT5A ist für die Prolaktin-abhängige Entwicklung der Brustdrüse und für die Laktogenese verantwortlich, wie in tierexperimentellen Studien mit weiblichen STAT5A-Knockout-Mäusen festgestellt werden konnte (Liu *et al.*, 1997). STAT5B vermittelt das Signal des Wachstumshormons *growth hormone* (GH). In männlichen STAT5B-Knockout-Mäusen zeigte sich ein Verlust des sexuell dimorphen Genregulationsmusters, das normalerweise zu einer größeren Körpergröße und -gewicht bei männlichen Mäusen sowie zu einer milden Immundefizienz führt (Klammt *et al.*, 2018). Defekte in beiden Genen gingen mit Defiziten in der Körpergröße, Fertilitätsstörungen und Störungen in der hämatopoetischen Entwicklung hinsichtlich der Granulopoese, Erythropoese und Lymphopoese einher (Horvath, 2000). Auf Aminosäureebene zeigen sich zu 92 % Homologien, signifikante strukturelle Differenzen befinden sich vornehmlich am C-Terminus (vgl. hierzu Abbildung 25 im Anhang). STAT5B hat ein Molekulargewicht von 90kDa und besteht aus 786 Aminosäuren (Liu *et al.*, 1995; Mui *et al.*, 1995). Das

kodierende Gen liegt auf Chromosom 17 (Crispi *et al.*, 2004). Alle Mitglieder der STAT-Protein-Familie zeichnen sich durch gemeinsame, konservierte Strukturen aus. Dazu gehören die N-terminale Domäne (NTD), die Coiled-Coil-Domäne (CCD), die DNA-Bindungsdomäne (DBD), die Linker-Domäne (LD), die SH2-Domäne (*Src-homology 2*) und eine Transaktivierungsdomäne (TAD) am C-Terminus. Ein spezifischer, hochkonservierter Tyrosinrest innerhalb des C-Terminus des STAT-Proteins (STAT5B, Tyr 699) wird im Zuge der Transduktion extrazellulärer Zytokine und Wachstumsfaktoren phosphoryliert, der die nicht-kovalente Dimerisierung von STAT5-Homo- oder Heterodimeren über die etwa 100 Aminosäure lange SH2-Domäne fördert (Grimley *et al.*, 1999). Die Translokation des Dimers in den Nucleus gelingt über das Importin- $\alpha 3/\beta 1$ -System, dabei fungiert die CCD als Kernlokalisierungssignal (NLS, *nuclear localization signal*) (Shin und Reich, 2013). Dort erfolgt über die Bindung an Promotorsequenzen durch die TAD (GAS, *gamma-interferon-activation sites*) die Initiierung der Gentranskription. Die DNA-Assoziation geschieht über die DBD (Grimley *et al.*, 1999). Nukleäre Phosphatasen können zur Dephosphorylierung der STAT5-Proteine beitragen und equilibrieren damit Signalstärke und -dauer, sodass STAT5-Proteine nur transient im Kern aktiv sind.

Die *gain-of-function* STAT5B N642H (Asp642His) Mutation führt zu einem Austausch der Aminosäure Asparagin durch Histidin in der SH2-Domäne des STAT5B-Proteins. In der dreidimensionalen Proteinstruktur liegt die Punktmutation der Tyrosinphosphorylierungsstelle der Bindungsschleife sehr nah. Die SH2-Domäne mit der hochkonservierten Tyrosinphosphorylierungsstelle ist für die intermolekulare, nicht-kovalente Interaktion zweier STAT5-Proteine verantwortlich. Mutationen in dieser Domäne führen zu einer konstitutiven Phosphorylierung des Tyrosins (pY-STAT5). Die Dimerstruktur wird dadurch stabilisiert und eine Kaskade stromabwärts liegender Zielgene aktiviert. Es konnte gezeigt werden, dass die Transkriptionsaktivität des STAT5B-Proteins bei Vorliegen solcher Mutationen um das 26-fache zunimmt (Kontro *et al.*, 2014; Rajala *et al.*, 2013).

Im Kontext hämatologischer Neoplasien wurde die N642H Mutation bis zuletzt den lymphoproliferativen Erkrankungen zugeordnet. Rajala *et al.* identifizierten als Erste Mutationen (N642H und Y667F) im *STAT5B-Gen* bei Patienten mit T-LGL (Rajala *et al.*, 2013). Nachfolgend wurde die Mutation *STAT5B* N642H bei Patienten mit einer

akuten lymphoblastischen Leukämie der T-Zelle (T-ALL), einer T-Zell-Prolymphozytenleukämie (T-PLL) und einem T-Zell-Lymphom entdeckt (Andersson *et al.*, 2016; Bandapalli *et al.*, 2014; Kiel *et al.*, 2014; Kucuk *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2017; Lopez *et al.*, 2016). Ferner ist die Mutation in zwei Patienten mit einer nicht-klonalen Eosinophilie bei Urtikaria, Dermatitis und Diarrhoe beschrieben worden (Liu *et al.*, 2017). Isoliert findet man in der Literatur zudem Fallberichte über die Detektion in myeloischen Neoplasien (Chronische Neutrophilenleukämie, CNL; MLN-eo), außerdem bei zwei Patienten mit klonaler Hämatopoese bei aplastischer Anämie (Babushok *et al.*, 2015; Baer *et al.*, 2018; Luo *et al.*, 2018). Gleichwohl handelt es sich bei vorliegender Arbeit um die erste, welche die *STAT5B* N642H als rekurrente Mutation bei myeloischen Neoplasien mit Eosinophilie identifiziert (n = 27) (Cross *et al.*, 2019). Sie kann damit als distinkte Genmutation in myeloischen Neoplasien bei Patienten mit Eosinophilie und negativem Fusionsprodukt und normalem Karyotyp in die diagnostische Pipeline nebst morphologischen, immunphänotypischen und klinischen Kriterien eingegliedert werden.

Bei vorliegender Eosinophilie werden zunächst sekundäre, reaktive Ursachen ausgeschlossen, bevor primäre Ursachen (bspw. die *STAT5B* N642H Mutation) gescreent werden. Hier bietet es sich im Rahmen des diagnostischen Workflows als Erstes an, dass Imatinib-sensible *FIP1L1-PDGFR*A Fusionsgen mittels PCR oder FISH-Analyse auszuschließen (vgl. hierzu Abbildung 26). Auf weitere Aberrationen von *PDGFR*A, *PDGFR*B, *FGFR*1 oder des *PCM1-JAK2* Fusionsgens, die mit der Diagnose einer MLN-eo vereinbar sind, sollte nachfolgend getestet werden. Bei Ausschluss ist die Analyse von Punktmutationen in *KIT* und *JAK2* in Hinblick auf myeloische Neoplasien empfehlenswert. Mittels *next generation sequencing* können zudem in spezifischen Panels unspezifische somatische Mutationen (z.B. *TET2*, *ASXL1*, *RUNX1*, *SRSF2*, *IDH2*, *SF3B1*) detektiert werden. Ist die Ätiologie der Eosinophilie weiterhin ungeklärt, ist die *STAT5B* Mutationsanalyse empfehlenswert.

Der *STAT5B* mutierte Klon konnte in kultivierten T-Zellen von vier untersuchten Patienten nicht nachgewiesen werden, darunter auch nicht in Patient #35, welcher keine zusätzlichen Mutationen (molekulare Gruppe 1) aufweist. Daher postulieren wir, dass die somatisch erworbene *STAT5B* N642H Mutation unabhängig vom Vorliegen zusätzlicher Mutationen als primärer Grund für die Determination einer Progenitorzelle

in einen Eosinophilen angesehen werden kann. Unterstützt wird diese These durch die Beobachtung im Kolonieassay. Hier konnten Zellklone von zwei Patienten (#27, #30) identifiziert werden, die höchstwahrscheinlich die Mutation *STAT5B* N642H hierarchisch erst im Verlauf erworben haben. Möglicherweise erhöhen die bereits zugrundeliegenden Mutationen (bspw. *TET2*) das onkogene Potenzial für die Etablierung weiterer Mutationen in Töchterklonen. Passend dazu konnten Proben vom Patienten #40 (PV) aus dem Jahr 1994 und 2014 aufgearbeitet werden. Erst mit klinischem Auftreten einer Eosinophilie im Jahre 2014 identifizierte man die *STAT5B* N642H Mutation, welche zum Diagnosezeitpunkt der PV im Jahr 1994 nicht vorlag. Darüber hinaus zeigten Pham *et al.*, dass eine transgenetische Expression von *STAT5B* N642H unter Kontrolle des Vav1-Promotors im Mausmodell zu einer transplantierbaren CD8 positiven T-Zell Neoplasie mit milder Expansion von reifen und unreifen myeloischen Zelllinien führt (Pham *et al.*, 2018).

In Analogie zu anderen myeloischen Neoplasien zeigen Zusatzmutationen einen bedeutenden Einfluss auf das Überleben des Patientenkollektivs mit Eosinophilie. Wir konnten in der vorliegenden Arbeit drei molekulare Gruppen in Abhängigkeit des *SF3B1* Mutationsstatus (und zusätzlicher Mutationen) voneinander differenzieren. Ein Überlebensvorteil wiesen Patienten mit alleinigem positivem *SF3B1* Mutationsstatus auf (OS von 65 Monaten vs. 14 Monate; $p < 0,0004$). Bei Vorliegen von mehr als zwei Mutationen zuzüglich der *STAT5B* N642H Mutation sank das mediane Überleben auf 18 Monate im Gegensatz zu 50 Monaten bei Vorliegen höchstens einer zusätzlichen Mutation ($p = 0,001$). Über die einerseits prognostisch vorteilhafte Mutation im Splicingfaktor *SF3B1* und den andererseits adversen Einfluss weiterer Mutationen in anderen Abschnitten der DNA ist bei MDS vorberichtet (Malcovati *et al.*, 2015; Papaemmanuil *et al.*, 2013). Auffällig ist zudem der Unterschied im Mutationsprofil hinsichtlich des S/A/R Genpanels zwischen den molekularen Gruppen 2 und 3. In Gruppe 2 konnte nur ein Patient (11%) im Gegensatz zu 10/14 (71 %) Patienten in Gruppe 3 mit positivem Mutationsstatus identifiziert werden. Die prognostische Bedeutung der S/A/R Mutation bei SM wurde in dieser Arbeit am advSM-Patientenkollektiv hinreichend belegt.

STAT5B als mögliches Target (Angriffspunkt) für eine individualisierte Therapie steht mit der Identifizierung als rekurrent anzutreffende Mutation bei lymphatischen wie

myeloischen Neoplasien im Fokus, zumal es im Signalweg obligat Downstream von zahlreichen durch *driver mutations* (*JAK2 V617F*, *FLT3-ITD*, *BCR-ABL*) induzierten Erkrankungen liegt (Choudhary *et al.*, 2007; Funakoshi-Tago *et al.*, 2010; Hantschel *et al.*, 2012). Brent *et al.* konnten verschiedene niedermolekulare Inhibitoren identifizieren, die im *in vitro* Assay sensitiv die SH2-Domäne des STAT5B-Proteins blockieren. Die Leitsubstanz BP-1-108 regulierte zudem die Aktivität *STAT5B* abhängiger Gene (*cyclin D1*, *cyclin D2*, *C-myc* und *MCL 1*) herunter und zeigte eine vernachlässigbare Zytotoxizität auf diejenigen Primärzellen, die kein mutiertes STAT exprimierten (Page *et al.*, 2012). Weiterhin wurden für die Therapie BCL2-, MEK1/2- und JAK1/2-Inhibitoren vorgeschlagen (Kontro *et al.*, 2014; Kucuk *et al.*, 2015). Am präklinischen Mausmodell zeigten Pham *et al.* die synergistische Wirksamkeit einer Kombinationstherapie mit Aurorakinase-Inhibitoren und JAK1/2-Inhibitoren bei T-Zell Neoplasien (Pham *et al.*, 2018). Es empfiehlt sich die *in vitro* Evaluation genannter Medikamente bei *STAT5B* mutierten myeloischen Neoplasien.

Durch vorliegende Arbeit konnte erstmals ein *in vitro* Kolonie-Assay bei advSM-Patienten etabliert werden, der eine prognostisch bedeutende Antwort auf ein Ansprechen mit dem Multikinase-Inhibitor Midostaurin innerhalb einer zweiwöchigen Inkubationszeit prädiziert und entscheidende therapeutische Strategien für den zukünftigen Einsatz von Avapritinib bei Midostaurin resistenten Patienten zulässt. Die Arbeitsergebnisse liefern damit einen wichtigen Beitrag hin zu einer personalisierten Krebstherapie, mit dem Potenzial proaktiv statt reaktiv zu agieren. In diesem Zusammenhang kann auch die Detektion und prognostische Einordnung der *STAT5B* N642H Mutation in myeloischen Neoplasien bei Patienten mit Eosinophilie und primär negativem Tyrosinkinasefusionsstatus gesehen werden. Die Identifizierung erlaubt die wissenschaftlich-klinische Erforschung als gezielten Angriffspunkt im Rahmen einer *targeted therapy*. Damit liefert die Arbeit in ihrer Gesamtheit wichtige prognostische und therapeutische Implikationen bei seltenen myeloischen Neoplasien, welches der Fokus der vorliegenden Arbeit war.

5 Zusammenfassung

Seit der reformierten Konsensusklassifikation der *World Health Organization* von 2016 wird die systemische Mastozytose aufgrund ihrer klinischen und pathologischen Heterogenität als eigene Entität der myeloischen Neoplasien geführt. Der klinische und morphologische Phänotyp der systemischen Mastozytose ist vielschichtig, jedoch vor allem durch eine unkontrollierte Proliferation abnormer Mastzellen mit konsekutiver Organinfiltration und -dysfunktion gekennzeichnet. Die systemischen Verlaufsformen reichen von indolenten Verläufen mit normaler Lebenserwartung zu Subentitäten mit leukämischer Progression, welche mit einem deutlich reduzierten Gesamtüberleben einhergehen.

Therapieziel der fortgeschrittenen systemischen Mastozytosen ist die Verlängerung der Lebenszeit und die Verbesserung der Lebensqualität. Mit dem Multikinase-Inhibitor Midostaurin steht bisher nur eine durch die *European Medicines Agency* zugelassene, zielgerichtete Therapie zur Verfügung. Midostaurin inhibiert unter anderem die Tyrosinkinase *KIT*, welche bei 80-90% der Patienten mit systemischer Mastozytose die Mutation D816V exprimiert. Die konstitutive Aktivierung der Kinase bedingt in erster Linie die unkontrollierte Mastzellproliferation. Mit seiner selektiven Wirkung gegen *KIT* D816V zeigt der *KIT*-Inhibitor Avapritinib in Phase-I-Studien ebenso eine hohe klinische Wirksamkeit bei Patienten mit systemischer Mastozytose. Biomarker, die ein Ansprechen auf beide Medikamente präzisieren, liegen jedoch nur sehr vereinzelt vor.

Ziel vorliegender Arbeit war daher die Etablierung und Auswertung von Einzelzell-basierten Kolonie-Assays von Therapie-naiven Patientenproben unter *in vitro* Inkubation mit Midostaurin und Avapritinib. Nach zweiwöchiger Medikamentenbehandlung *in vitro* sollte das *in vivo* Ansprechen der Patienten nach mehreren Monaten Therapie imitiert werden.

In dieser Arbeit gelang die erfolgreiche Etablierung unseres *in vitro* Assays zur Extrapolation des *in vivo* Ansprechens. Avapritinib zeigte in Hinsicht auf die Reduktion der *KIT* D816V positiven Kolonien im Vergleich zu Midostaurin ein überlegenes Resultat, selbst bei Midostaurin resistenten Patienten, und liefert damit wichtige Therapieimplikationen in Bezug auf einen sequentiellen Einsatz beider Medikamente.

Ferner konnte die Hypothese, dass Midostaurin und Avapritinib neben dem Mastzell-Kompartiment auch die *KIT* D816V positive assoziierte hämatologische Neoplasie beeinflussen, die bei fortgeschrittenen Formen der systemischen Mastozytose häufig parallel diagnostiziert wird, verifiziert werden. Zusätzlich konnte die prognostisch schlechte Assoziation von Zusatzmutationen in *SRSF2*, *ASXL1*, und *RUNX1* mit vorliegenden Daten bestätigt werden.

Die Diagnosestellung der Treibermutation *KIT* D816V bei fortgeschrittener systemischer Mastozytose erlaubt den Einsatz von Midostaurin. In unserem „Register für Erkrankungen der Eosinophilen und Mastzellen“ finden sich allerdings auch Patienten, die keine der bekannten Treibermutationen exprimieren und klinisch gleichzeitig mit einer Eosinophilie assoziiert sind. Bei diesen Patienten konnte die Mutation *STAT5B* N642H identifiziert werden, die im Zusammenhang mit lymphoproliferativen Tumorentitäten bereits vorbeschrieben ist. Gegenstand weiterer Untersuchungen war die Prävalenz und die prognostische Bedeutung der Mutation in myeloischen Neoplasien bei Patienten mit Eosinophilie und ohne Nachweis eines Tyrosinkinasefusionsgens.

Diese Arbeit beschreibt als erste die Mutation *STAT5B* N642H in myeloischen Neoplasien als rekurrent vorkommende Aberration. Die Ergebnisse zeigen, dass die somatisch erworbene Mutation als der primäre Treiber der Eosinophilie im Patienten angesehen werden kann. In Analogie zum myelodysplastischen Syndrom konnte die zusätzliche Mutation *SF3B1* als prognostisch vorteilhafte Aberration bestimmt werden. Bei Vorliegen von mehr als zwei Zusatzmutationen ergibt sich ein negativer Effekt auf das Gesamtüberleben.

Zusammenfassend konnte in der vorliegenden Arbeit der diagnostische Fortschritt anhand der Identifizierung bedeutender prognostischer und therapeutischer Implikationen bei seltenen myeloischen Neoplasien dargelegt werden.

6 Literaturverzeichnis

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

Agis, H., Willheim, M., Sperr, W.R., Wilfing, A., Kromer, E., Kabrna, E., Spanblochl, E., Strobl, H., Geissler, K., Spittler, A., *et al.* (1993). Monocytes do not make mast cells when cultured in the presence of SCF. Characterization of the circulating mast cell progenitor as a c-kit+, CD34+, Ly-, CD14-, CD17-, colony-forming cell. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 151, 4221-4227.

Agosti, J.M., Altman, L.C., Ayars, G.H., Loegering, D.A., Gleich, G.J., and Klebanoff, S.J. (1987). The injurious effect of eosinophil peroxidase, hydrogen peroxide, and halides on pneumocytes in vitro. *The Journal of allergy and clinical immunology* 79, 496-504.

Akin, C., Fumo, G., Yavuz, A.S., Lipsky, P.E., Neckers, L., and Metcalfe, D.D. (2004). A novel form of mastocytosis associated with a transmembrane c-kit mutation and response to imatinib. *Blood* 103, 3222-3225.

Alvarez Argote, J., and Dasanu, C.A. (2018). ASXL1 mutations in myeloid neoplasms: pathogenetic considerations, impact on clinical outcomes and survival. *Current medical research and opinion* 34, 757-763.

Anderson, D.M., Williams, D.E., Tushinski, R., Gimpel, S., Eisenman, J., Cannizzaro, L.A., Aronson, M., Croce, C.M., Huebner, K., Cosman, D., *et al.* (1991). Alternate splicing of mRNAs encoding human mast cell growth factor and localization of the gene to chromosome 12q22-q24. *Cell growth & differentiation : the molecular biology journal of the American Association for Cancer Research* 2, 373-378.

Andersson, E.I., Tanahashi, T., Sekiguchi, N., Gasparini, V.R., Bortoluzzi, S., Kawakami, T., Matsuda, K., Mitsui, T., Eldfors, S., Bortoluzzi, S., *et al.* (2016). High incidence of activating STAT5B mutations in CD4-positive T-cell large granular lymphocyte leukemia. *Blood* 128, 2465-2468.

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

Arenas Cortes, A., Ayala Diaz, R., Hernandez-Campo, P., Gorrochategui, J., Primo, D., Robles, A., Morales, M.L., Ballesteros, J., Rapado, I., Gallardo, M., *et al.* (2018). Ruxolitinib in combination with prednisone and nilotinib exhibit synergistic effects in human cells lines and primary cells from myeloproliferative neoplasms. *Haematologica* 104, 937-946.

Arinobu, Y., Iwasaki, H., Gurish, M.F., Mizuno, S., Shigematsu, H., Ozawa, H., Tenen, D.G., Austen, K.F., and Akashi, K. (2005). Developmental checkpoints of the basophil/mast cell lineages in adult murine hematopoiesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 18105-18110.

Babushok, D.V., Perdignes, N., Perin, J.C., Olson, T.S., Ye, W., Roth, J.J., Lind, C., Cattier, C., Li, Y., Hartung, H., *et al.* (2015). Emergence of clonal hematopoiesis in the majority of patients with acquired aplastic anemia. *Cancer genetics* 208, 115-128.

- Baccarani, M., Cilloni, D., Rondoni, M., Ottaviani, E., Messa, F., Merante, S., Tiribelli, M., Buccisano, F., Testoni, N., Gottardi, E., *et al.* (2007). The efficacy of imatinib mesylate in patients with FIP1L1-PDGFR α -positive hypereosinophilic syndrome. Results of a multicenter prospective study. *Haematologica* 92, 1173-1179.
- Baer, C., Muehlbacher, V., Kern, W., Haferlach, C., and Haferlach, T. (2018). Molecular genetic characterization of myeloid/lymphoid neoplasms associated with eosinophilia and rearrangement of PDGFRA, PDGFRB, FGFR1 or PCM1-JAK2. *Haematologica* 103, e348-e350.
- Bandapalli, O.R., Schuessle, S., Kunz, J.B., Rausch, T., Stutz, A.M., Tal, N., Geron, I., Gershman, N., Izraeli, S., Eilers, J., *et al.* (2014). The activating STAT5B N642H mutation is a common abnormality in pediatric T-cell acute lymphoblastic leukemia and confers a higher risk of relapse. *Haematologica* 99, e188-192.
- Bank, I., Amariglio, N., Reshef, A., Hardan, I., Confino, Y., Trau, H., Shtrasburg, S., Langevitz, P., Monselise, Y., Shalit, M., *et al.* (2001). The hypereosinophilic syndrome associated with CD4+CD3- helper type 2 (Th2) lymphocytes. *Leukemia & lymphoma* 42, 123-133.
- Bendall, S.C., and Nolan, G.P. (2012). From single cells to deep phenotypes in cancer. *Nature biotechnology* 30, 639-647.
- Besmer, P., Manova, K., Duttlinger, R., Huang, E.J., Packer, A., Gyssler, C., and Bachvarova, R.F. (1993). The kit-ligand (steel factor) and its receptor c-kit/W: pleiotropic roles in gametogenesis and melanogenesis. *Development (Cambridge, England) Supplement*, 125-137.
- Brigden, M., and Graydon, C. (1997). Eosinophilia detected by automated blood cell counting in ambulatory North American outpatients. Incidence and clinical significance. *Archives of pathology & laboratory medicine* 121, 963-967.
- Brugnoni, D., Airo, P., Rossi, G., Bettinardi, A., Simon, H.U., Garza, L., Tosoni, C., Cattaneo, R., Blaser, K., and Tucci, A. (1996). A case of hypereosinophilic syndrome is associated with the expansion of a CD3-CD4+ T-cell population able to secrete large amounts of interleukin-5. *Blood* 87, 1416-1422.
- Brugnoni, D., Airo, P., Tosoni, C., Taglietti, M., Lodi-Rizzini, F., Calzavara-Pinton, P., Leali, C., and Cattaneo, R. (1997). CD3-CD4+ cells with a Th2-like pattern of cytokine production in the peripheral blood of a patient with cutaneous T cell lymphoma. *Leukemia* 11, 1983-1985.
- Bryniarski, K., Ptak, W., Jayakumar, A., Pullmann, K., Caplan, M.J., Chairoungdua, A., Lu, J., Adams, B.D., Sikora, E., Nazimek, K., *et al.* (2013). Antigen-specific, antibody-coated, exosome-like nanovesicles deliver suppressor T-cell microRNA-150 to effector T cells to inhibit contact sensitivity. *The Journal of allergy and clinical immunology* 132, 170-181.
- Budnik, J., and Milano, M.T. (2019). A registry-based analysis of survival outcomes in mast cell leukemia. *Leukemia research* 78, 24-28.
- Bullock, E.D., and Johnson, E.M., Jr. (1996). Nerve growth factor induces the expression of certain cytokine genes and bcl-2 in mast cells. Potential role in survival promotion. *The Journal of biological chemistry* 271, 27500-27508.
- Butterworth, A.E. (1977). The eosinophil and its role in immunity to helminth infection. *Current topics in microbiology and immunology* 77, 127-168.

- Campochiaro, P.A. (2004). Reduction of diabetic macular edema by oral administration of the kinase inhibitor PKC412. *Investigative ophthalmology & visual science* 45, 922-931.
- Caravatti, G., Meyer, T., Fredenhagen, A., Trinks, U., Mett, H., and Fabbro, D. (1994). Inhibitory activity and selectivity of staurosporine derivatives towards protein kinase C. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 4, 399-404.
- Chabot, B., Stephenson, D.A., Chapman, V.M., Besmer, P., and Bernstein, A. (1988). The proto-oncogene c-kit encoding a transmembrane tyrosine kinase receptor maps to the mouse W locus. *Nature* 335, 88-89.
- Chase, A., Bryant, C., Score, J., and Cross, N.C. (2013). Ponatinib as targeted therapy for FGFR1 fusions associated with the 8p11 myeloproliferative syndrome. *Haematologica* 98, 103-106.
- Chatterjee, A., Ghosh, J., and Kapur, R. (2015). Mastocytosis: a mutated KIT receptor induced myeloproliferative disorder. *Oncotarget* 6, 18250-18264.
- Cheah, C.Y., Burbury, K., Apperley, J.F., Huguet, F., Pitini, V., Gardembas, M., Ross, D.M., Forrest, D., Genet, P., Rousselot, P., *et al.* (2014). Patients with myeloid malignancies bearing PDGFRB fusion genes achieve durable long-term remissions with imatinib. *Blood* 123, 3574-3577.
- Chen, C.C., Grimbaldston, M.A., Tsai, M., Weissman, I.L., and Galli, S.J. (2005). Identification of mast cell progenitors in adult mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 11408-11413.
- Chen, J., Deangelo, D.J., Kutok, J.L., Williams, I.R., Lee, B.H., Wadleigh, M., Duclos, N., Cohen, S., Adelsperger, J., Okabe, R., *et al.* (2004). PKC412 inhibits the zinc finger 198-fibroblast growth factor receptor 1 fusion tyrosine kinase and is active in treatment of stem cell myeloproliferative disorder. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 14479-14484.
- Chomczynski, P., and Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical biochemistry* 162, 156-159.
- Choudhary, C., Brandts, C., Schwable, J., Tickenbrock, L., Sargin, B., Ueker, A., Bohmer, F.D., Berdel, W.E., Muller-Tidow, C., and Serve, H. (2007). Activation mechanisms of STAT5 by oncogenic Flt3-ITD. *Blood* 110, 370-374.
- Chusid, M.J., Dale, D.C., West, B.C., and Wolff, S.M. (1975). The hypereosinophilic syndrome: analysis of fourteen cases with review of the literature. *Medicine* 54, 1-27.
- Cogan, E., Schandene, L., Crusiaux, A., Cochaux, P., Velu, T., and Goldman, M. (1994). Brief report: clonal proliferation of type 2 helper T cells in a man with the hypereosinophilic syndrome. *The New England journal of medicine* 330, 535-538.
- Cools, J., DeAngelo, D.J., Gotlib, J., Stover, E.H., Legare, R.D., Cortes, J., Kutok, J., Clark, J., Galinsky, I., Griffin, J.D., *et al.* (2003a). A tyrosine kinase created by fusion of the PDGFRA and FIP1L1 genes as a therapeutic target of imatinib in idiopathic hypereosinophilic syndrome. *The New England journal of medicine* 348, 1201-1214.
- Cools, J., Stover, E.H., Boulton, C.L., Gotlib, J., Legare, R.D., Amaral, S.M., Curley, D.P., Duclos, N., Rowan, R., Kutok, J.L., *et al.* (2003b). PKC412 overcomes resistance to imatinib in a murine model of FIP1L1-PDGFRalpha-induced myeloproliferative disease. *Cancer cell* 3, 459-469.

- Crane, M.M., Chang, C.M., Kobayashi, M.G., and Weller, P.F. (2010). Incidence of myeloproliferative hypereosinophilic syndrome in the United States and an estimate of all hypereosinophilic syndrome incidence. *The Journal of allergy and clinical immunology* 126, 179-181.
- Crispi, S., Sanzari, E., Monfregola, J., De Felice, N., Fimiani, G., Ambrosio, R., D'Urso, M., and Ursini, M.V. (2004). Characterization of the human STAT5A and STAT5B promoters: evidence of a positive and negative mechanism of transcriptional regulation. *FEBS letters* 562, 27-34.
- Cross, N.C.P., Hoade, Y., Tapper, W.J., Carreno-Tarragona, G., Fanelli, T., Jawhar, M., Naumann, N., Pieniak, I., Lübke, J., Ali, S., *et al.* (2019). Recurrent activating STAT5B N642H mutation in myeloid neoplasms with eosinophilia. *Leukemia* 33, 415-425.
- Dahlin, J.S., Malinowski, A., Ohrvik, H., Sandelin, M., Janson, C., Alving, K., and Hallgren, J. (2016). Lin- CD34hi CD117int/hi FcεRI+ cells in human blood constitute a rare population of mast cell progenitors. *Blood* 127, 383-391.
- 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 Melo Campos, P., Machado-Neto, J.A., Scopim-Ribeiro, R., Visconte, V., Tabarrok, A., Duarte, A.S., Barra, F.F., Vassallo, J., Rogers, H.J., Lorand-Metze, I., *et al.* (2014). Familial systemic mastocytosis with germline KIT K509I mutation is sensitive to treatment with imatinib, dasatinib and PKC412. *Leukemia research* 38, 1245-1251.
- DeAngelo, D.J., George, T.I., Linder, A., Langford, C., Perkins, C., Ma, J., Westervelt, P., Merker, J.D., Berube, C., Coutre, S., *et al.* (2018). Efficacy and safety of midostaurin in patients with advanced systemic mastocytosis: 10-year median follow-up of a phase II trial. *Leukemia* 32, 470-478.
- Denburg, J.A., Telizyn, S., Messner, H., Lim, B., Jamal, N., Ackerman, S.J., Gleich, G.J., and Bienenstock, J. (1985). Heterogeneity of human peripheral blood eosinophil-type colonies: evidence for a common basophil-eosinophil progenitor. *Blood* 66, 312-318.
- Dicker, F., Haferlach, C., Sundermann, J., Wendland, N., Weiss, T., Kern, W., Haferlach, T., and Schnittger, S. (2010). Mutation analysis for RUNX1, MLL-PTD, FLT3-ITD, NPM1 and NRAS in 269 patients with MDS or secondary AML. *Leukemia* 24, 1528-1532.
- Dobin, A., Davis, C.A., Schlesinger, F., Drenkow, J., Zaleski, C., Jha, S., Batut, P., Chaisson, M., and Gingeras, T.R. (2013). STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics (Oxford, England)* 29, 15-21.
- Eder, J.P., Jr., Garcia-Carbonero, R., Clark, J.W., Supko, J.G., Puchalski, T.A., Ryan, D.P., Deluca, P., Wozniak, A., Campbell, A., Rothermel, J., *et al.* (2004). A phase I trial of daily oral 4'-N-benzoyl-staurosporine in combination with protracted continuous infusion 5-fluorouracil in patients with advanced solid malignancies. *Investigational new drugs* 22, 139-150.
- Ehrlich, P. (1878). *Beiträge für Theorie und Praxis der histologischen Färbung*. Leipzig: 65.

- Erben, P., Schwaab, J., Metzgeroth, G., Horny, H.P., Jawhar, M., Sotlar, K., Fabarius, A., Teichmann, M., Schneider, S., Ernst, T., *et al.* (2014). The KIT D816V expressed allele burden for diagnosis and disease monitoring of systemic mastocytosis. *Ann Hematol* 93, 81-88.
- Escribano, L., Akin, C., Castells, M., Orfao, A., and Metcalfe, D.D. (2002). Mastocytosis: current concepts in diagnosis and treatment. *Ann Hematol* 81, 677-690.
- Escribano, L., Orfao, A., Diaz-Agustin, B., Villarrubia, J., Cervero, C., Lopez, A., Marcos, M.A., Bellas, C., Fernandez-Canadas, S., Cuevas, M., *et al.* (1998). Indolent systemic mast cell disease in adults: immunophenotypic characterization of bone marrow mast cells and its diagnostic implications. *Blood* 91, 2731-2736.
- 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.
- Evans, E.K., Hodous, B.L., Gardino, A., Zhu, J., Shutes, A., Davis, A., Kim, J., Wilson, K., Wilson, D., Zhang, Y., *et al.* (2014). First Selective KIT D816V Inhibitor for Patients with Systemic Mastocytosis. *Blood* 124, 3217-3217.
- Fabbro, D., Ruetz, S., Bodis, S., Pruschy, M., Csermak, K., Man, A., Campochiaro, P., Wood, J., O'Reilly, T., and Meyer, T. (2000). PKC412--a protein kinase inhibitor with a broad therapeutic potential. *Anti-cancer drug design* 15, 17-28.
- Funakoshi-Tago, M., Tago, K., Abe, M., Sonoda, Y., and Kasahara, T. (2010). STAT5 activation is critical for the transformation mediated by myeloproliferative disorder-associated JAK2 V617F mutant. *The Journal of biological chemistry* 285, 5296-5307.
- Funato, N., Takayanagi, H., Konda, Y., Toda, Y., Harigaya, Y., Iwai, Y., and Ōmura, S. (1994). Absolute Configuration of Staurosporine By X-Ray Analysis. *Tetrahedron Letters* 35, 1251-1254.
- Furusaki, A., Hashiba, N., Matsumoto, T., Hirano, A., Iwai, Y., and Omura, S. (1978). X-Ray crystal structure of staurosporine: a new alkaloid from a *Streptomyces* strain. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, 800-801.
- Galli, S.J., Kalesnikoff, J., Grimbaldston, M.A., Piliponsky, A.M., Williams, C.M., and Tsai, M. (2005). Mast cells as "tunable" effector and immunoregulatory cells: recent advances. *Annual review of immunology* 23, 749-786.
- Galli, S.J., and Tsai, M. (2010). Mast cells in allergy and infection: versatile effector and regulatory cells in innate and adaptive immunity. *European journal of immunology* 40, 1843-1851.
- Gallogly, M.M., and Lazarus, H.M. (2016). Midostaurin: an emerging treatment for acute myeloid leukemia patients. *Journal of blood medicine* 7, 73-83.
- 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.
- Geissler, E.N., Liao, M., Brook, J.D., Martin, F.H., Zsebo, K.M., Housman, D.E., and Galli, S.J. (1991). Stem cell factor (SCF), a novel hematopoietic growth factor and ligand for c-kit tyrosine kinase receptor, maps on human chromosome 12 between 12q14.3 and 12qter. *Somatic cell and molecular genetics* 17, 207-214.

- Geissler, E.N., Ryan, M.A., and Housman, D.E. (1988). The dominant-white spotting (W) locus of the mouse encodes the c-kit proto-oncogene. *Cell* 55, 185-192.
- Georgin-Lavialle, S., Lhermitte, L., Dubreuil, P., Chandesris, M.O., Hermine, O., and Damaj, G. (2013). Mast cell leukemia. *Blood* 121, 1285-1295.
- Giebel, L.B., Strunk, K.M., Holmes, S.A., and Spritz, R.A. (1992). Organization and nucleotide sequence of the human KIT (mast/stem cell growth factor receptor) proto-oncogene. *Oncogene* 7, 2207-2217.
- Gleich, G.J., and Adolphson, C.R. (1986). The eosinophilic leukocyte: structure and function. *Advances in immunology* 39, 177-253.
- Gleich, G.J., Loegering, D.A., Bell, M.P., Checkel, J.L., Ackerman, S.J., and McKean, D.J. (1986). Biochemical and functional similarities between human eosinophil-derived neurotoxin and eosinophil cationic protein: homology with ribonuclease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83, 3146-3150.
- Gleixner, K.V., Mayerhofer, M., Aichberger, K.J., Derdak, S., Sonneck, K., Bohm, A., Gruze, A., Samorapoompichit, P., Manley, P.W., Fabbro, D., *et al.* (2006). PKC412 inhibits in vitro growth of neoplastic human mast cells expressing the D816V-mutated variant of KIT: comparison with AMN107, imatinib, and cladribine (2CdA) and evaluation of cooperative drug effects. *Blood* 107, 752-759.
- Gleixner, K.V., Mayerhofer, M., Sonneck, K., Gruze, A., Samorapoompichit, P., Baumgartner, C., Lee, F.Y., Aichberger, K.J., Manley, P.W., Fabbro, D., *et al.* (2007). Synergistic growth-inhibitory effects of two tyrosine kinase inhibitors, dasatinib and PKC412, on neoplastic mast cells expressing the D816V-mutated oncogenic variant of KIT. *Haematologica* 92, 1451-1459.
- Gleixner, K.V., Peter, B., Blatt, K., Suppan, V., Reiter, A., Radia, D., Hadzijasufovic, E., and Valent, P. (2013). Synergistic growth-inhibitory effects of ponatinib and midostaurin (PKC412) on neoplastic mast cells carrying KIT D816V. *Haematologica* 98, 1450-1457.
- Golub, T.R., Barker, G.F., Lovett, M., and Gilliland, D.G. (1994). Fusion of PDGF receptor beta to a novel ets-like gene, tel, in chronic myelomonocytic leukemia with t(5;12) chromosomal translocation. *Cell* 77, 307-316.
- Gotlib, J. (2006). KIT mutations in mastocytosis and their potential as therapeutic targets. *Immunology and allergy clinics of North America* 26, 575-592.
- Gotlib, J. (2017). World Health Organization-defined eosinophilic disorders: 2017 update on diagnosis, risk stratification, and management. *Am J Hematol* 92, 1243-1259.
- Gotlib, J., Kluin-Nelemans, H.C., George, T.I., Akin, C., Sotlar, K., Hermine, O., Awan, F.T., Hexner, E., Mauro, M.J., Sternberg, D.W., *et al.* (2016). Efficacy and Safety of Midostaurin in Advanced Systemic Mastocytosis. *The New England journal of medicine* 374, 2530-2541.
- Grabbe, J., Haas, N., and Czarnetzki, B.M. (1994). The mast cel. *Hno* 42, 375-384.
- Greiner, G., Gurbisz, M., Ratzinger, F., Witzeneder, N., Simonitsch-Klupp, I., Mitterbauer-Hohendanner, G., Mayerhofer, M., Mullauer, L., Sperr, W.R., Valent, P., *et al.* (2018). Digital PCR: A Sensitive and Precise Method for KIT D816V Quantification in Mastocytosis. *Clinical chemistry* 64, 547-555.

- Griesinger, F., Hennig, H., Hillmer, F., Podleschny, M., Steffens, R., Pies, A., Wormann, B., Haase, D., and Bohlander, S.K. (2005). A BCR-JAK2 fusion gene as the result of a t(9;22)(p24;q11.2) translocation in a patient with a clinically typical chronic myeloid leukemia. *Genes Chromosomes Cancer* 44, 329-333.
- Griffin, J.H., Leung, J., Bruner, R.J., Caligiuri, M.A., and Briesewitz, R. (2003). Discovery of a fusion kinase in EOL-1 cells and idiopathic hypereosinophilic syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 7830-7835.
- Grimley, P.M., Dong, F., and Rui, H. (1999). Stat5a and Stat5b: fraternal twins of signal transduction and transcriptional activation. *Cytokine & growth factor reviews* 10, 131-157.
- Guasch, G., Mack, G.J., Popovici, C., Dastugue, N., Birnbaum, D., Rattner, J.B., and Pebusque, M.J. (2000). FGFR1 is fused to the centrosome-associated protein CEP110 in the 8p12 stem cell myeloproliferative disorder with t(8;9)(p12;q33). *Blood* 95, 1788-1796.
- Gunin, A.G., Kornilova, N.K., Vasilieva, O.V., and Petrov, V.V. (2011). Age-related changes in proliferation, the numbers of mast cells, eosinophils, and cd45-positive cells in human dermis. *The journals of gerontology Series A, Biological sciences and medical sciences* 66, 385-392.
- Gurish, M.F., and Austen, K.F. (2012). Developmental origin and functional specialization of mast cell subsets. *Immunity* 37, 25-33.
- 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.
- Hantschel, O., Warsch, W., Eckelhart, E., Kaupe, I., Grebien, F., Wagner, K.U., Superti-Furga, G., and Sexl, V. (2012). BCR-ABL uncouples canonical JAK2-STAT5 signaling in chronic myeloid leukemia. *Nature chemical biology* 8, 285-293.
- Hartmann, K., Wardelmann, E., Ma, Y., Merkelbach-Bruse, S., Preussner, L.M., Woolery, C., Baldus, S.E., Heinicke, T., Thiele, J., Buettner, R., *et al.* (2005). Novel germline mutation of KIT associated with familial gastrointestinal stromal tumors and mastocytosis. *Gastroenterology* 129, 1042-1046.
- Hassanein, M., Almahayni, M.H., Ahmed, S.O., Gaballa, S., and El Fakih, R. (2016). FLT3 Inhibitors for Treating Acute Myeloid Leukemia. *Clinical Lymphoma Myeloma and Leukemia* 16, 543-549.
- He, R., Greipp, P.T., Rangan, A., Mai, M., Chen, D., Reichard, K.K., Nelsen, L.L., Pardanani, A., Hanson, C.A., and Viswanatha, D.S. (2016). BCR-JAK2 fusion in a myeloproliferative neoplasm with associated eosinophilia. *Cancer genetics* 209, 223-228.
- Helbig, G., Soja, A., Bartkowska-Chrobok, A., and Kyrzcz-Krzemien, S. (2012). Chronic eosinophilic leukemia-not otherwise specified has a poor prognosis with unresponsiveness to conventional treatment and high risk of acute transformation. *Am J Hematol* 87, 643-645.

- Helbig, G., Stella-Holowiecka, B., Majewski, M., Lewandowska, M., and Holowiecki, J. (2007). Interferon α induces a good molecular response in a patient with chronic eosinophilic leukemia (CEL) carrying the JAK2V617F point mutation. *Haematologica* 92, e118-e119.
- Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, P.S., and Griffith, R. (1992). Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Bio/technology* (Nature Publishing Company) 10, 413-417.
- 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.
- Horigome, K., Bullock, E.D., and Johnson, E.M., Jr. (1994). Effects of nerve growth factor on rat peritoneal mast cells. Survival promotion and immediate-early gene induction. *The Journal of biological chemistry* 269, 2695-2702.
- Horny, H.P., Akin, C., and Arber, D. (2016). Mastocytosis (mast cell disease). In World Health Organization (WHO) Classification of Tumours Classification of Tumours Pathology & Genetics Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues, S.H. Swerdlow, E. Campo, N.L. Harris, E.S. Jaffe, S.A. Pileri, H. Stein, and J. Thiele, eds. (Lyon, France: IARC Press).
- Horny, H.P., Akin, C., Metcalf, D., Escribano, L., Bennett, J.M., Valent, P., and Bain, B.J. (2008). Mastocytosis (mast cell disease). In World Health Organization (WHO) Classification of Tumours Classification of Tumours Pathology & Genetics Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues, S.H. Swerdlow, E. Campo, N.L. Harris, E.S. Jaffe, S.A. Pileri, H. Stein, J. Thiele, and J.W. Vardiman, eds. (Lyon, France: IARC Press), pp. 54-63.
- Horny, H.P., Parwaresch, M.R., and Lennert, K. (1985). Bone marrow findings in systemic mastocytosis. *Human pathology* 16, 808-814.
- Horny, H.P., Sillaber, C., Menke, D., Kaiserling, E., Wehrmann, M., Stehberger, B., Chott, A., Lechner, K., Lennert, K., and Valent, P. (1998). Diagnostic Value of Immunostaining for Tryptase in Patients with Mastocytosis. *American Journal of Surgical Pathology* September 22, 1132-1140.
- Horny, H.P., Sotlar, K., and Valent, P. (2007). Mastocytosis: state of the art. *Pathobiology : journal of immunopathology, molecular and cellular biology* 74, 121-132.
- Horny, H.P., and Valent, P. (2002). Histopathological and immunohistochemical aspects of mastocytosis. *International archives of allergy and immunology* 127, 115-117.
- Horvath, C.M. (2000). STAT proteins and transcriptional responses to extracellular signals. *Trends in biochemical sciences* 25, 496-502.
- Hou, Y., Song, L., Zhu, P., Zhang, B., Tao, Y., Xu, X., Li, F., Wu, K., Liang, J., Shao, D., *et al.* (2012). Single-cell exome sequencing and monoclonal evolution of a JAK2-negative myeloproliferative neoplasm. *Cell* 148, 873-885.
- Iscoe, N.N., Sieber, F., and Winterhalter, K.H. (1974). Erythroid colony formation in cultures of mouse and human bone marrow: Analysis of the requirement for erythropoietin by gel filtration and affinity chromatography on agarose-concanavalin A. *Journal of Cellular Physiology* 83, 309-320.

- 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.
- Jaffe, E.S., Harris, N.L., Stein, H., and Vardiman, J.W. (2001). *World Health Organization Classification of Tumours: Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. IARC Press; Lyon, France.
- Jamur, M.C., Grodzki, A.C., Berenstein, E.H., Hamawy, M.M., Siraganian, R.P., and Oliver, C. (2005). Identification and characterization of undifferentiated mast cells in mouse bone marrow. *Blood* *105*, 4282-4289.
- Jan, M., Snyder, T.M., Corces-Zimmerman, M.R., Vyas, P., Weissman, I.L., Quake, S.R., and Majeti, R. (2012). Clonal evolution of preleukemic hematopoietic stem cells precedes human acute myeloid leukemia. *Science translational medicine* *4*, 149ra118.
- Jawhar, M., Naumann, N., Schwaab, J., Baurmann, H., Casper, J., Dang, T.A., Dietze, L., Dohner, K., Hanel, A., Lathan, B., *et al.* (2017a). Imatinib in myeloid/lymphoid neoplasms with eosinophilia and rearrangement of PDGFRB in chronic or blast phase. *Ann Hematol* *96*, 1463-1470.
- Jawhar, M., Schwaab, J., Alvarez-Twose, I., Shoumariyeh, K., Naumann, N., Lübke, J., Perkins, C., Munoz-Gonzalez, J.I., Meggendorfer, M., Kennedy, V., *et al.* (2019). MARS: Mutation-Adjusted Risk Score for Advanced Systemic Mastocytosis. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, Jco1900640.
- Jawhar, M., Schwaab, J., Hausmann, D., Clemens, J., Naumann, N., Henzler, T., Horny, H.P., Sotlar, K., Schoenberg, S.O., Cross, N.C., *et al.* (2016a). Splenomegaly, elevated alkaline phosphatase and mutations in the SRSF2/ASXL1/RUNX1 gene panel are strong adverse prognostic markers in patients with systemic mastocytosis. *Leukemia* *30*, 2342-2350.
- Jawhar, M., Schwaab, J., Horny, H.P., Sotlar, K., Naumann, N., Fabarius, A., Valent, P., Cross, N.C., Hofmann, W.K., Metzgeroth, G., *et al.* (2016b). Impact of centralized evaluation of bone marrow histology in systemic mastocytosis. *European journal of clinical investigation* *46*, 392-397.
- Jawhar, M., Schwaab, J., Meggendorfer, M., Naumann, N., Horny, H.P., Sotlar, K., Haferlach, T., Schmitt, K., Fabarius, A., Valent, P., *et al.* (2017b). The clinical and molecular diversity of mast cell leukemia with or without associated hematologic neoplasm. *Haematologica* *102*, 1035-1043.
- Jawhar, M., Schwaab, J., Naumann, N., Horny, H.P., Sotlar, K., Haferlach, T., Metzgeroth, G., Fabarius, A., Valent, P., Hofmann, W.K., *et al.* (2017c). Response and progression on midostaurin in advanced systemic mastocytosis: KIT D816V and other molecular markers. *Blood* *130*, 137-145.
- Jawhar, M., Schwaab, J., Schnittger, S., Meggendorfer, M., Pffirmann, M., Sotlar, K., Horny, H.P., Metzgeroth, G., Kluger, S., Naumann, N., *et al.* (2016c). Additional mutations in SRSF2, ASXL1 and/or RUNX1 identify a high-risk group of patients with KIT D816V(+) advanced systemic mastocytosis. *Leukemia* *30*, 136-143.
- Jawhar, M., Schwaab, J., Schnittger, S., Sotlar, K., Horny, H.P., Metzgeroth, G., Müller, 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.

Jovanovic, J.V., Score, J., Waghorn, K., Cilloni, D., Gottardi, E., Metzgeroth, G., Erben, P., Popp, H., Walz, C., Hochhaus, A., *et al.* (2007). Low-dose imatinib mesylate leads to rapid induction of major molecular responses and achievement of complete molecular remission in FIP1L1-PDGFR α -positive chronic eosinophilic leukemia. *Blood* 109, 4635-4640.

Kasamon, Y.L., Ko, C.W., Subramaniam, S., Ma, L., Yang, Y., Nie, L., Shord, S., Przepiorka, D., Farrell, A.T., McKee, A.E., *et al.* (2018). FDA Approval Summary: Midostaurin for the Treatment of Advanced Systemic Mastocytosis. *The oncologist*.

Kay, A.B. (2016). Paul Ehrlich and the Early History of Granulocytes. *Microbiology spectrum* 4.

Kiel, M.J., Velusamy, T., Rolland, D., Sahasrabudhe, A.A., Chung, F., Bailey, N.G., Schrader, A., Li, B., Li, J.Z., Ozel, A.B., *et al.* (2014). Integrated genomic sequencing reveals mutational landscape of T-cell prolymphocytic leukemia. *Blood* 124, 1460-1472.

Kirshenbaum, A.S., Goff, J.P., Dreskin, S.C., Irani, A.M., Schwartz, L.B., and Metcalfe, D.D. (1989). IL-3-dependent growth of basophil-like cells and mastlike cells from human bone marrow. *The Journal of Immunology* 142, 2424-2429.

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. *The Journal of Immunology* 146, 1410-1415.

Kitamura, Y., Shimada, M., Hatanaka, K., and Miyano, Y. (1977). Development of mast cells from grafted bone marrow cells in irradiated mice. *Nature* 268, 442.

Kitano, K., Ichikawa, N., Shimodaira, S., Ito, T., Ishida, F., and Kiyosawa, K. (1997). Eosinophilia associated with clonal T-cell proliferation. *Leukemia & lymphoma* 27, 335-342.

Klammt, J., Neumann, D., Gevers, E.F., Andrew, S.F., Schwartz, I.D., Rockstroh, D., Colombo, R., Sanchez, M.A., Vokurkova, D., Kowalczyk, J., *et al.* (2018). Dominant-negative STAT5B mutations cause growth hormone insensitivity with short stature and mild immune dysregulation. *Nature communications* 9, 2105.

Klion, A.D. (2015). How I treat hypereosinophilic syndromes. *Blood* 126, 1069-1077.

Klion, A.D., Noel, P., Akin, C., Law, M.A., Gilliland, D.G., Cools, J., Metcalfe, D.D., and Nutman, T.B. (2003). Elevated serum tryptase levels identify a subset of patients with a myeloproliferative variant of idiopathic hypereosinophilic syndrome associated with tissue fibrosis, poor prognosis, and imatinib responsiveness. *Blood* 101, 4660-4666.

Komi, D.E.A., Rambasek, T., and Wohrl, S. (2017). Mastocytosis: from a Molecular Point of View. *Clin Rev Allergy Immunol*.

Kontro, M., Kuusanmaki, H., Eldfors, S., Burmeister, T., Andersson, E.I., Bruserud, O., Brummendorf, T.H., Edgren, H., Gjertsen, B.T., Itala-Remes, M., *et al.* (2014). Novel activating STAT5B mutations as putative drivers of T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 28, 1738-1742.

Krauth, M.T., Mirkina, I., Herrmann, H., Baumgartner, C., Kneidinger, M., and Valent, P. (2009). Midostaurin (PKC412) inhibits immunoglobulin E-dependent activation and mediator release in human blood basophils and mast cells. *Clinical and experimental*

allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology 39, 1711-1720.

Kucuk, C., Jiang, B., Hu, X., Zhang, W., Chan, J.K., Xiao, W., Lack, N., Alkan, C., Williams, J.C., Avery, K.N., *et al.* (2015). Activating mutations of STAT5B and STAT3 in lymphomas derived from gammadelta-T or NK cells. *Nature communications* 6, 6025.

Landau, D.A., Carter, S.L., Stojanov, P., McKenna, A., Stevenson, K., Lawrence, M.S., Sougnez, C., Stewart, C., Sivachenko, A., Wang, L., *et al.* (2013). Evolution and impact of subclonal mutations in chronic lymphocytic leukemia. *Cell* 152, 714-726.

Lefevre, G., Copin, M.C., Staumont-Salle, D., Avenel-Audran, M., Aubert, H., Taieb, A., Salles, G., Maisonneuve, H., Ghomari, K., Ackerman, F., *et al.* (2014). The lymphoid variant of hypereosinophilic syndrome: study of 21 patients with CD3-CD4+ aberrant T-cell phenotype. *Medicine* 93, 255-266.

Legrand, F., Renneville, A., MacIntyre, E., Mastrilli, S., Ackermann, F., Cayuela, J.M., Rousselot, P., Schmidt-Tanguy, A., Fain, O., Michel, M., *et al.* (2013). The Spectrum of FIP1L1-PDGFR α -Associated Chronic Eosinophilic Leukemia: New Insights Based on a Survey of 44 Cases. *Medicine* 92, e1-e9.

Lehrer, R.I., Szklarek, D., Barton, A., Ganz, T., Hamann, K.J., and Gleich, G.J. (1989). Antibacterial properties of eosinophil major basic protein and eosinophil cationic protein. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 142, 4428-4434.

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.

Lennartsson, J., and Ronnstrand, L. (2012). Stem cell factor receptor/c-Kit: from basic science to clinical implications. *Physiological reviews* 92, 1619-1649.

Lennert, K., and Parwaresch, M.R. (1979). Mast cells and mast cell neoplasia: a review*. *Histopathology* 3, 349-365.

Lierman, E., Folens, C., Stover, E.H., Mentens, N., Van Miegroet, H., Scheers, W., Boogaerts, M., Vandenberghe, P., Marynen, P., and Cools, J. (2006). Sorafenib is a potent inhibitor of FIP1L1-PDGFR α and the imatinib-resistant FIP1L1-PDGFR α T674I mutant. *Blood* 108, 1374-1376.

Lim, K.H., Tefferi, A., Lasho, T.L., Finke, C., Patnaik, M., Butterfield, J.H., McClure, R.F., Li, C.Y., and Pardanani, A. (2009). Systemic mastocytosis in 342 consecutive adults: survival studies and prognostic factors. *Blood* 113, 5727-5736.

Lin, Y., Zheng, Y., Wang, Z.C., and Wang, S.Y. (2016). Prognostic significance of ASXL1 mutations in myelodysplastic syndromes and chronic myelomonocytic leukemia: A meta-analysis. *Hematology (Amsterdam, Netherlands)* 21, 454-461.

Liu, X., Robinson, G.W., Gouilleux, F., Groner, B., and Hennighausen, L. (1995). Cloning and expression of Stat5 and an additional homologue (Stat5b) involved in prolactin signal transduction in mouse mammary tissue. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 8831-8835.

Liu, X., Robinson, G.W., Wagner, K.U., Garrett, L., Wynshaw-Boris, A., and Hennighausen, L. (1997). Stat5a is mandatory for adult mammary gland development and lactogenesis. *Genes & development* 11, 179-186.

- Liu, Y., Easton, J., Shao, Y., Maciaszek, J., Wang, Z., Wilkinson, M.R., McCastlain, K., Edmonson, M., Pounds, S.B., Shi, L., *et al.* (2017). The genomic landscape of pediatric and young adult T-lineage acute lymphoblastic leukemia. *Nature genetics* 49, 1211-1218.
- Lopez, A.F., Elliott, M.J., Woodcock, J., and Vadas, M.A. (1992). GM-CSF, IL-3 and IL-5: cross-competition on human haemopoietic cells. *Immunology today* 13, 495-500.
- Lopez, C., Bergmann, A.K., Paul, U., Murga Penas, E.M., Nagel, I., Betts, M.J., Johansson, P., Ritgen, M., Baumann, T., Aymerich, M., *et al.* (2016). Genes encoding members of the JAK-STAT pathway or epigenetic regulators are recurrently mutated in T-cell prolymphocytic leukaemia. *British journal of haematology* 173, 265-273.
- Lübke, J., Naumann, N., Kluger, S., Schwaab, J., Metzgeroth, G., Evans, E., Gardino, A.K., Lengauer, C., Hofmann, W.K., Fabarius, A., *et al.* (2019). Inhibitory effects of midostaurin and avapritinib on myeloid progenitors derived from patients with KIT D816V positive advanced systemic mastocytosis. *Leukemia* 33, 1195-1205.
- Luciano, L., Catalano, L., Sarrantonio, C., Guerriero, A., Califano, C., and Rotoli, B. (1999). AlphaIFN-induced hematologic and cytogenetic remission in chronic eosinophilic leukemia with t(1;5). *Haematologica* 84, 651-653.
- Lundberg, P., Karow, A., Nienhold, R., Looser, R., Hao-Shen, H., Nissen, I., Girsberger, S., Lehmann, T., Passweg, J., Stern, M., *et al.* (2014). Clonal evolution and clinical correlates of somatic mutations in myeloproliferative neoplasms. *Blood* 123, 2220-2228.
- Luo, Q., Shen, J., Yang, Y., Tang, H., Shi, M., Liu, J., Liu, Z., Shi, X., and Yi, Y. (2018). CSF3R T618I, ASXL1 G942 fs and STAT5B N642H trimutation co-contribute to a rare chronic neutrophilic leukaemia manifested by rapidly progressive leucocytosis, severe infections, persistent fever and deep venous thrombosis. *British journal of haematology* 180, 892-894.
- MacPherson, J.C., Comhair, S.A., Erzurum, S.C., Klein, D.F., Lipscomb, M.F., Kavuru, M.S., Samoszuk, M.K., and Hazen, S.L. (2001). Eosinophils are a major source of nitric oxide-derived oxidants in severe asthma: characterization of pathways available to eosinophils for generating reactive nitrogen species. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 166, 5763-5772.
- Malcovati, L., Karimi, M., Papaemmanuil, E., Ambaglio, I., Jadersten, M., Jansson, M., Elena, C., Galli, A., Walldin, G., Della Porta, M.G., *et al.* (2015). SF3B1 mutation identifies a distinct subset of myelodysplastic syndrome with ring sideroblasts. *Blood* 126, 233-241.
- Marshall, J.S. (2004). Mast-cell responses to pathogens. *Nature reviews Immunology* 4, 787-799.
- Masson, K., and Ronnstrand, L. (2009). Oncogenic signaling from the hematopoietic growth factor receptors c-Kit and Flt3. *Cellular signalling* 21, 1717-1726.
- McNagny, K., and Graf, T. (2002). Making eosinophils through subtle shifts in transcription factor expression. *The Journal of experimental medicine* 195, F43-47.
- Melchor, L., Brioli, A., Wardell, C.P., Murison, A., Potter, N.E., Kaiser, M.F., Fryer, R.A., Johnson, D.C., Begum, D.B., Hulkki Wilson, S., *et al.* (2014). Single-cell genetic analysis reveals the composition of initiating clones and phylogenetic patterns of branching and parallel evolution in myeloma. *Leukemia* 28, 1705-1715.

- Metcalfe, D.D. (1991). Classification and diagnosis of mastocytosis: current status. *The Journal of investigative dermatology* 96, 2S-4S; discussion 4S, 60S-65S.
- Metcalfe, D.D. (2008). Mast cells and mastocytosis. *Blood* 112, 946-956.
- Metzgeroth, G., Erben, P., Martin, H., Mousset, S., Teichmann, M., Walz, C., Klippstein, T., Hochhaus, A., Cross, N.C., Hofmann, W.K., *et al.* (2012). Limited clinical activity of nilotinib and sorafenib in FIP1L1-PDGFR α positive chronic eosinophilic leukemia with imatinib-resistant T674I mutation. *Leukemia* 26, 162-164.
- Mishra, A., Hogan, S.P., Lee, J.J., Foster, P.S., and Rothenberg, M.E. (1999). Fundamental signals that regulate eosinophil homing to the gastrointestinal tract. *The Journal of clinical investigation* 103, 1719-1727.
- Mol, C.D., Lim, K.B., Sridhar, V., Zou, H., Chien, E.Y., Sang, B.C., Nowakowski, J., Kassel, D.B., Cronin, C.N., and McRee, D.E. (2003). Structure of a c-kit product complex reveals the basis for kinase transactivation. *The Journal of biological chemistry* 278, 31461-31464.
- Mui, A.L., Wakao, H., Harada, N., O'Farrell, A.M., and Miyajima, A. (1995). Interleukin-3, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, and interleukin-5 transduce signals through two forms of STAT5. *Journal of leukocyte biology* 57, 799-803.
- Murati, A., Gelsi-Boyer, V., Adelaide, J., Perot, C., Talmant, P., Giraudier, S., Lode, L., Letessier, A., Delaval, B., Brunel, V., *et al.* (2005). PCM1-JAK2 fusion in myeloproliferative disorders and acute erythroid leukemia with t(8;9) translocation. *Leukemia* 19, 1692-1696.
- Naoe, T., and Kiyoi, H. (2013). Gene mutations of acute myeloid leukemia in the genome era. *International journal of hematology* 97, 165-174.
- Naumann, N., Hoffmann, O., Bugert, P., Schwaab, J., Fabarius, A., Metzgeroth, G., Reiter, L., Haselmann, V., Schneider, S., Kristensen, T., *et al.* (2018a). Interlaboratory comparison of a KIT D816V detection assay in patients with systemic mastocytosis by chip-based digital PCR. *Oncology Research and Treatment* 41, 99-99.
- Naumann, N., Jawhar, M., Schwaab, J., Kluger, S., Lübke, J., Metzgeroth, G., Popp, H.D., Khaled, N., Horny, H.P., Sotlar, K., *et al.* (2018b). Incidence and prognostic impact of cytogenetic aberrations in patients with systemic mastocytosis. *Genes Chromosomes Cancer* 57, 252-259.
- Noack, F., Sotlar, K., Notter, M., Thiel, E., Valent, P., and Horny, H.P. (2004). Aleukemic mast cell leukemia with abnormal immunophenotype and c-kit mutation D816V. *Leukemia & lymphoma* 45, 2295-2302.
- Ogbogu, P.U., Bochner, B.S., Butterfield, J.H., Gleich, G.J., Huss-Marp, J., Kahn, J.E., Leiferman, K.M., Nutman, T.B., Pfab, F., Ring, J., *et al.* (2009). Hypereosinophilic syndrome: a multicenter, retrospective analysis of clinical characteristics and response to therapy. *The Journal of allergy and clinical immunology* 124, 1319-1325.e1313.
- Okayama, Y., and Kawakami, T. (2006). Development, migration, and survival of mast cells. *Immunologic research* 34, 97-115.
- Omura, T., Heldin, C.H., and Ostman, A. (1997). Immunoglobulin-like domain 4-mediated receptor-receptor interactions contribute to platelet-derived growth factor-induced receptor dimerization. *The Journal of biological chemistry* 272, 12676-12682.
- Page, B.D., Khoury, H., Laister, R.C., Fletcher, S., Vellozo, M., Manzoli, A., Yue, P., Turkson, J., Minden, M.D., and Gunning, P.T. (2012). Small molecule STAT5-SH2

domain inhibitors exhibit potent antileukemia activity. *Journal of medicinal chemistry* 55, 1047-1055.

Papaemmanuil, E., Gerstung, M., Malcovati, L., Tauro, S., Gndem, G., Van Loo, P., Yoon, C.J., Ellis, P., Wedge, D.C., Pellagatti, A., *et al.* (2013). Clinical and biological implications of driver mutations in myelodysplastic syndromes. *Blood* 122, 3616-3627.

Pardanani, A. (2015). Systemic mastocytosis in adults: 2015 update on diagnosis, risk stratification, and management. *Am J Hematol* 90, 250-262.

Pardanani, A. (2016). Systemic mastocytosis in adults: 2017 update on diagnosis, risk stratification and management. *Am J Hematol* 91, 1146-1159.

Pardanani, A., D'Souza, A., Knudson, R.A., Hanson, C.A., Ketterling, R.P., and Tefferi, A. (2012). Long-term follow-up of FIP1L1-PDGFR α -mutated patients with eosinophilia: survival and clinical outcome. *Leukemia* 26, 2439-2441.

Pardanani, A., Ketterling, R.P., Brockman, S.R., Flynn, H.C., Paternoster, S.F., Shearer, B.M., Reeder, T.L., Li, C.Y., Cross, N.C., Cools, J., *et al.* (2003). CHIC2 deletion, a surrogate for FIP1L1-PDGFR α fusion, occurs in systemic mastocytosis associated with eosinophilia and predicts response to imatinib mesylate therapy. *Blood* 102, 3093-3096.

Pardanani, A., Lasho, T., Wassie, E., Finke, C., Zblewski, D., Hanson, C.A., Ketterling, R.P., Gangat, N., and Tefferi, A. (2016). Predictors of survival in WHO-defined hypereosinophilic syndrome and idiopathic hypereosinophilia and the role of next-generation sequencing. *Leukemia* 30, 1924-1926.

Pardanani, A., Lim, K.H., Lasho, T.L., Finke, C., McClure, R.F., Li, C.Y., and Tefferi, A. (2009). Prognostically relevant breakdown of 123 patients with systemic mastocytosis associated with other myeloid malignancies. *Blood* 114, 3769-3772.

Peeters, P., Raynaud, S.D., Cools, J., Wlodarska, I., Grosgeorge, J., Philip, P., Monpoux, F., Van Rompaey, L., Baens, M., Van den Berghe, H., *et al.* (1997). Fusion of TEL, the ETS-variant gene 6 (ETV6), to the receptor-associated kinase JAK2 as a result of t(9;12) in a lymphoid and t(9;15;12) in a myeloid leukemia. *Blood* 90, 2535-2540.

Peter, B., Winter, G.E., Blatt, K., Bennett, K.L., Stefanzi, G., Rix, U., Eisenwort, G., Hadzijasufovic, E., Gridling, M., Dutreix, C., *et al.* (2016). Target interaction profiling of midostaurin and its metabolites in neoplastic mast cells predicts distinct effects on activation and growth. *Leukemia* 30, 464-472.

Pham, H.T.T., Maurer, B., Prchal-Murphy, M., Grausenburger, R., Grundschober, E., Javaheri, T., Nivarthi, H., Boersma, A., Kolbe, T., Elabd, M., *et al.* (2018). STAT5BN642H is a driver mutation for T cell neoplasia. *The Journal of clinical investigation* 128, 387-401.

Piliponsky, A.M., Gleich, G.J., Bar, I., and Levi-Schaffer, F. (2002). Effects of eosinophils on mast cells: a new pathway for the perpetuation of allergic inflammation. *Molecular immunology* 38, 1369.

Piliponsky, A.M., Pickholtz, D., Gleich, G.J., and Levi-Schaffer, F. (2001). Human eosinophils induce histamine release from antigen-activated rat peritoneal mast cells: a possible role for mast cells in late-phase allergic reactions. *The Journal of allergy and clinical immunology* 107, 993-1000.

Popovici, C., Zhang, B., Gregoire, M.J., Jonveaux, P., Lafage-Pochitaloff, M., Birnbaum, D., and Pebusque, M.J. (1999). The t(6;8)(q27;p11) translocation in a stem

cell myeloproliferative disorder fuses a novel gene, FOP, to fibroblast growth factor receptor 1. *Blood* 93, 1381-1389.

Propper, D.J., McDonald, A.C., Man, A., Thavasu, P., Balkwill, F., Braybrooke, J.P., Caponigro, F., Graf, P., Dutreix, C., Blackie, R., *et al.* (2001). Phase I and pharmacokinetic study of PKC412, an inhibitor of protein kinase C. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 19, 1485-1492.

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

Quiquandon, I., Claisse, J.F., Capiod, J.C., Delobel, J., and Prin, L. (1995). alpha-Interferon and hypereosinophilic syndrome with trisomy 8: karyotypic remission. *Blood* 85, 2284-2285.

Rajala, H.L., Eldfors, S., Kuusanmaki, H., van Adrichem, A.J., Olson, T., Lagstrom, S., Andersson, E.I., Jerez, A., Clemente, M.J., Yan, Y., *et al.* (2013). Discovery of somatic STAT5b mutations in large granular lymphocytic leukemia. *Blood* 121, 4541-4550.

Reiter, A., and Gotlib, J. (2017). Myeloid neoplasms with eosinophilia. *Blood* 129, 704-714.

Reiter, A., Walz, C., Watmore, A., Schoch, C., Blau, I., Schlegelberger, B., Berger, U., Telford, N., Aruliah, S., Yin, J.A., *et al.* (2005). The t(8;9)(p22;p24) is a recurrent abnormality in chronic and acute leukemia that fuses PCM1 to JAK2. *Cancer research* 65, 2662-2667.

Rosbotham, J.L., Malik, N.M., Syrris, P., Jeffery, S., Bedlow, A., Gharraie, S., Murday, V.A., Holden, C.A., and Carter, N.D. (1999). Lack of c-kit mutation in familial urticaria pigmentosa. *The British journal of dermatology* 140, 849-852.

Rose, S. (2018). Rapid Responses to Avapritinib (BLU-285) in Mastocytosis. *Cancer Discovery* 8, 133-133.

Rothenberg, M.E. (1998). Eosinophilia. *The New England journal of medicine* 338, 1592-1600.

Roufosse, F., Cogan, E., and Goldman, M. (2004). Recent advances in pathogenesis and management of hypereosinophilic syndromes. *Allergy* 59, 673-689.

Roufosse, F., Schandene, L., Sibille, C., Kennes, B., Efir, A., Cogan, E., and Goldman, M. (1999). T-cell receptor-independent activation of clonal Th2 cells associated with chronic hypereosinophilia. *Blood* 94, 994-1002.

Roufosse, F., Schandene, L., Sibille, C., Willard-Gallo, K., Kennes, B., Efir, A., Goldman, M., and Cogan, E. (2000). Clonal Th2 lymphocytes in patients with the idiopathic hypereosinophilic syndrome. *British journal of haematology* 109, 540-548.

Saiki, R., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K., Horn, G., Erlich, H., and Arnheim, N. (1985). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230, 1350-1354.

Sanderson, C.J. (1992). Interleukin-5, eosinophils, and disease. *Blood* 79, 3101-3109.

Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 74, 5463-5467.

- Scherber, R.M., and Borate, U. (2018). How we diagnose and treat systemic mastocytosis in adults. *British journal of haematology* 180, 11-23.
- Schwaab, J., Jawhar, M., Naumann, N., Schmitt-Graeff, A., Fabarius, A., Horny, H.P., Cross, N.C., Hofmann, W.K., Reiter, A., and Metzgeroth, G. (2016). Diagnostic challenges in the work up of hypereosinophilia: pitfalls in bone marrow core biopsy interpretation. *Ann Hematol* 95, 557-562.
- Schwaab, J., Schnittger, S., Sotlar, K., Walz, C., Fabarius, A., Pffirmann, M., Kohlmann, A., Grossmann, V., Meggendorfer, M., Horny, H.P., *et al.* (2013). Comprehensive mutational profiling in advanced systemic mastocytosis. *Blood* 122, 2460-2466.
- Schwaab, J., Umbach, R., Metzgeroth, G., Naumann, N., Jawhar, M., Sotlar, K., Horny, H.P., Gaiser, T., Hofmann, W.K., Schnittger, S., *et al.* (2015). KIT D816V and JAK2 V617F mutations are seen recurrently in hypereosinophilia of unknown significance. *Am J Hematol* 90, 774-777.
- Shin, H.Y., and Reich, N.C. (2013). Dynamic trafficking of STAT5 depends on an unconventional nuclear localization signal. *Journal of cell science* 126, 3333-3343.
- Simon, H.U., Yousefi, S., Dommann-Scherrer, C.C., Zimmermann, D.R., Bauer, S., Barandun, J., and Blaser, K. (1996). Expansion of cytokine-producing CD4-CD8- T cells associated with abnormal Fas expression and hypereosinophilia. *The Journal of experimental medicine* 183, 1071-1082.
- Smedley, D., Demiroglu, A., Abdul-Rauf, M., Heath, C., Cooper, C., Shipley, J., and Cross, N.C. (1999). ZNF198-FGFR1 transforms Ba/F3 cells to growth factor independence and results in high level tyrosine phosphorylation of STATS 1 and 5. *Neoplasia (New York, NY)* 1, 349-355.
- Solomon, A., Aloe, L., Pe'er, J., Frucht-Pery, J., Bonini, S., Bonini, S., and Levi-Schaffer, F. (1998). Nerve growth factor is preformed in and activates human peripheral blood eosinophils. *The Journal of allergy and clinical immunology* 102, 454-460.
- Sotlar, K., Colak, S., Bache, A., Berezowska, S., Krokowski, M., Bultmann, B., Valent, P., and Horny, H.P. (2010). Variable presence of KITD816V in clonal haematological non-mast cell lineage diseases associated with systemic mastocytosis (SM-AHNMD). *The Journal of pathology* 220, 586-595.
- Sotlar, K., Valent, P., and Horny, H.-P. (2012). Mastozytosen und myeloische Neoplasien mit Eosinophilie. *Der Pathologe* 33, 539-552.
- Sperr, W.R., Horny, H.P., Lechner, K., and Valent, P. (2000). Clinical and biologic diversity of leukemias occurring in patients with mastocytosis. *Leukemia & lymphoma* 37, 473-486.
- Sperr, W.R., Horny, H.P., and Valent, P. (2002). Spectrum of associated clonal hematologic non-mast cell lineage disorders occurring in patients with systemic mastocytosis. *International archives of allergy and immunology* 127, 140-142.
- Sperr, W.R., and Valent, P. (2012). Diagnosis, progression patterns and prognostication in mastocytosis. *Expert review of hematology* 5, 261-274.
- Stone, R.M., Mandrekar, S., Sanford, B.L., Geyer, S., Bloomfield, C.D., Dohner, K., Thiede, C., Marcucci, G., Lo-Coco, F., Klisovic, R.B., *et al.* (2015). The multi-kinase inhibitor midostaurin prolongs survival compared with placebo in combination with daunorubicin/cytarabine induction, high-dose consolidation, and as maintenance

therapy in newly diagnosed acute myeloid leukemia: an international prospective randomized p-controlled double-blind trial (CALGB 10603/RATIFY). *Blood* 126, 6.

Stone, R.M., Mandrekar, S.J., Sanford, B.L., Laumann, K., Geyer, S., Bloomfield, C.D., Thiede, C., Prior, T.W., Dohner, K., Marcucci, G., *et al.* (2017). Midostaurin plus Chemotherapy for Acute Myeloid Leukemia with a FLT3 Mutation. *The New England journal of medicine* 377, 454-464.

Stone, R.M., Manley, P.W., Larson, R.A., and Capdeville, R. (2018). Midostaurin: its odyssey from discovery to approval for treating acute myeloid leukemia and advanced systemic mastocytosis. *Blood advances* 2, 444-453.

Stover, E.H., Chen, J., Lee, B.H., Cools, J., McDowell, E., Adelsperger, J., Cullen, D., Coburn, A., Moore, S.A., Okabe, R., *et al.* (2005). The small molecule tyrosine kinase inhibitor AMN107 inhibits TEL-PDGFRbeta and FIP1L1-PDGFRalpha in vitro and in vivo. *Blood* 106, 3206-3213.

Tefferi, A., Gotlib, J., and Pardanani, A. (2010). Hypereosinophilic syndrome and clonal eosinophilia: point-of-care diagnostic algorithm and treatment update. *Mayo Clinic proceedings* 85, 158-164.

Tefferi, A., and Pardanani, A. (2004). Clinical, genetic, and therapeutic insights into systemic mast cell disease. *Current opinion in hematology* 11, 58-64.

Tefferi, A., Patnaik, M.M., and Pardanani, A. (2006). Eosinophilia: secondary, clonal and idiopathic. *British journal of haematology* 133, 468-492.

Theoharides, T.C., Kempuraj, D., Tagen, M., Conti, P., and Kalogeromitros, D. (2007). Differential release of mast cell mediators and the pathogenesis of inflammation. *Immunological reviews* 217, 65-78.

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

Toksoz, D., Zsebo, K.M., Smith, K.A., Hu, S., Brankow, D., Suggs, S.V., Martin, F.H., and Williams, D.A. (1992). Support of human hematopoiesis in long-term bone marrow cultures by murine stromal cells selectively expressing the membrane-bound and secreted forms of the human homolog of the steel gene product, stem cell factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89, 7350-7354.

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.

v. Recklinghausen, F. (1863). Ueber Eiter- und Bindegewebskörperchen. *Archiv für pathologische Anatomie und Physiologie und für klinische Medicin* 28, 157-197.

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., Escribano, L., Födinger, M., Hartmann, K., Brockow, K., Castells, M., Sperr, W.R., Kluin-Nelemans, H.C., Hamdy, N.A.T., *et al.* (2007). Standards and standardization in mastocytosis: Consensus Statements on Diagnostics, Treatment Recommendations and Response Criteria. *European journal of clinical investigation* 37, 435-453.

Valent, P., Akin, C., Hartmann, K., George, T.I., Sotlar, K., Peter, B., Gleixner, K.V., Blatt, K., Sperr, W.R., Manley, P.W., *et al.* (2017a). Midostaurin: a magic bullet that blocks mast cell expansion and activation. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology* 28, 2367-2376.

Valent, P., Akin, C., Hartmann, K., Nilsson, G., Reiter, A., Hermine, O., Sotlar, K., Sperr, W.R., Escribano, L., George, T.I., *et al.* (2017b). Advances in the Classification and Treatment of Mastocytosis: Current Status and Outlook toward the Future. *Cancer research* 77, 1261-1270.

Valent, P., Akin, C., Sperr, W.R., Horny, H.P., Arock, M., Lechner, K., Bennett, J.M., and Metcalfe, D.D. (2003). Diagnosis and treatment of systemic mastocytosis: state of the art. *British journal of haematology* 122, 695-717.

Valent, P., Gleich, G.J., Reiter, A., Roufosse, F., Weller, P.F., Hellmann, A., Metzgeroth, G., Leiferman, K.M., Arock, M., Sotlar, K., *et al.* (2012a). Pathogenesis and classification of eosinophil disorders: a review of recent developments in the field. *Expert review of hematology* 5, 157-176.

Valent, P., Horny, H.P., Escribano, L., Longley, B.J., Li, C.Y., Schwartz, L.B., Marone, G., Nunez, R., Akin, C., Sotlar, K., *et al.* (2001a). Diagnostic criteria and classification of mastocytosis: a consensus proposal. *Leukemia research* 25, 603-625.

Valent, P., Horny, H.P., and Li, C.Y. (2001b). Mastocytosis (mast cell disease). In *World Health Organization (WHO) Classification of Tumours Pathology & Genetics Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*, E.S. Jaffe, N.L. Harris, H. Stein, and J.W. Vardiman, eds. (Lyon, France: IARC Press), pp. 291-302.

Valent, P., Klion, A.D., Horny, H.P., Roufosse, F., Gotlib, J., Weller, P.F., Hellmann, A., Metzgeroth, G., Leiferman, K.M., Arock, M., *et al.* (2012b). Contemporary consensus proposal on criteria and classification of eosinophilic disorders and related syndromes. *The Journal of allergy and clinical immunology* 130, 607-612.e609.

Valentini, C.G., Rondoni, M., Pogliani, E.M., Van Lint, M.T., Cattaneo, C., Marbello, L., Pulsoni, A., Giona, F., Martinelli, G., Leone, G., *et al.* (2008). Mast cell leukemia: a report of ten cases. *Ann Hematol* 87, 505-508.

Vardiman, J.W., Thiele, J., Arber, D.A., Brunning, R.D., Borowitz, M.J., Porwit, A., Harris, N.L., Le Beau, M.M., Hellström-Lindberg, E., Tefferi, A., *et al.* (2009). The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood* 114, 937-951.

Venge, P., Bystrom, J., Carlson, M., Hakansson, L., Karawaczyk, M., Peterson, C., Seveus, L., and Trulsson, A. (1999). Eosinophil cationic protein (ECP): molecular and biological properties and the use of ECP as a marker of eosinophil activation in disease. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 29, 1172-1186.

Verstovsek, S. (2013). Advanced systemic mastocytosis: the impact of KIT mutations in diagnosis, treatment, and progression. *European journal of haematology* 90, 89-98.

Virchis, A., Ganeshaguru, K., Hart, S., Jones, D., Fletcher, L., Wright, F., Wickremasinghe, R., Man, A., Csermak, K., Meyer, T., *et al.* (2002). A novel treatment approach for low grade lymphoproliferative disorders using PKC412 (CGP41251), an inhibitor of protein kinase C. *The hematology journal : the official journal of the European Haematology Association* 3, 131-136.

- Wakao, H., Gouilleux, F., and Groner, B. (1994). Mammary gland factor (MGF) is a novel member of the cytokine regulated transcription factor gene family and confers the prolactin response. *The EMBO journal* 13, 2182-2191.
- Wang, K., Li, M., and Hakonarson, H. (2010). ANNOVAR: functional annotation of genetic variants from high-throughput sequencing data. *Nucleic acids research* 38, e164.
- 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. *Am J Hematol* 88, 219-224.
- Wang, Y., Yin, O.Q., Graf, P., Kisicki, J.C., and Schran, H. (2008). Dose- and time-dependent pharmacokinetics of midostaurin in patients with diabetes mellitus. *Journal of clinical pharmacology* 48, 763-775.
- Wasmoen, T.L., Bell, M.P., Loegering, D.A., Gleich, G.J., Prendergast, F.G., and McKean, D.J. (1988). Biochemical and amino acid sequence analysis of human eosinophil granule major basic protein. *The Journal of biological chemistry* 263, 12559-12563.
- Weber, A., Knop, J., and Maurer, M. (2003). Pattern analysis of human cutaneous mast cell populations by total body surface mapping. *The British journal of dermatology* 148, 224-228.
- Weller, P.F. (1994). Eosinophils: structure and functions. *Current opinion in immunology* 6, 85-90.
- Wimazal, F., Germing, U., Kundi, M., Noesslinger, T., Blum, S., Geissler, P., Baumgartner, C., Pfeilstoecker, M., Valent, P., and Sperr, W.R. (2010). Evaluation of the prognostic significance of eosinophilia and basophilia in a larger cohort of patients with myelodysplastic syndromes. *Cancer* 116, 2372-2381.
- Wong, C.K., Ng, S.S., Lun, S.W., Cao, J., and Lam, C.W. (2009). Signalling mechanisms regulating the activation of human eosinophils by mast-cell-derived chymase: implications for mast cell-eosinophil interaction in allergic inflammation. *Immunology* 126, 579-587.
- Wu, W., Chen, Y., and Hazen, S.L. (1999). Eosinophil peroxidase nitrates protein tyrosyl residues. Implications for oxidative damage by nitrating intermediates in eosinophilic inflammatory disorders. *The Journal of biological chemistry* 274, 25933-25944.
- Xiao, S., Nalabolu, S.R., Aster, J.C., Ma, J., Abruzzo, L., Jaffe, E.S., Stone, R., Weissman, S.M., Hudson, T.J., and Fletcher, J.A. (1998). FGFR1 is fused with a novel zinc-finger gene, ZNF198, in the t(8;13) leukaemia/lymphoma syndrome. *Nature genetics* 18, 84-87.
- 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.
- Young, J.D., Peterson, C.G., Venge, P., and Cohn, Z.A. (1986). Mechanism of membrane damage mediated by human eosinophil cationic protein. *Nature* 321, 613-616.

Zhang, B., Asadi, S., Weng, Z., Sismanopoulos, N., and Theoharides, T.C. (2012). Stimulated human mast cells secrete mitochondrial components that have autocrine and paracrine inflammatory actions. *PloS one* 7, e49767.

Zhang, L.Y., Smith, M.L., Schultheis, B., Fitzgibbon, J., Lister, T.A., Melo, J.V., Cross, N.C., and Cavenagh, J.D. (2006). A novel K509I mutation of KIT identified in familial mastocytosis-in vitro and in vivo responsiveness to imatinib therapy. *Leukemia research* 30, 373-378.

Zheutlin, L.M., Ackerman, S.J., Gleich, G.J., and Thomas, L.L. (1984). Stimulation of basophil and rat mast cell histamine release by eosinophil granule-derived cationic proteins. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 133, 2180-2185.

Zhrebker, L., Cooper, B., and Krause, J.R. (2014). Systemic mastocytosis with associated acute myelogenous leukemia. *Proceedings (Baylor University Medical Center)* 27, 22-24.

Eigene Publikationen:

Cross, N.C.P., Hoade, Y., Tapper, W.J., Carreno-Tarragona, G., Fanelli, T., Jawhar, M., Naumann, N., Pieniak, I., **Lübke, J.**, Ali, S., *et al.* (2019). Recurrent activating STAT5B N642H mutation in myeloid neoplasms with eosinophilia. *Leukemia* 33, 415-425.

Jawhar, M., Schwaab, J., Alvarez-Twose, I., Shoumariyeh, K., Naumann, N., **Lübke, J.**, Perkins, C., Munoz-Gonzalez, J.I., Meggendorfer, M., Kennedy, V., *et al.* (2019). MARS: Mutation-Adjusted Risk Score for Advanced Systemic Mastocytosis. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, Jco1900640.

Lübke, J., Naumann, N., Kluger, S., Schwaab, J., Metzgeroth, G., Evans, E., Gardino, A.K., Lengauer, C., Hofmann, W.K., Fabarius, A., *et al.* (2019). Inhibitory effects of midostaurin and avapritinib on myeloid progenitors derived from patients with KIT D816V positive advanced systemic mastocytosis. *Leukemia* 33, 1195-1205.

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

Schwaab, J., Naumann, N., **Lübke, J.**, Jawhar, M., Somerville, T.C.P., Williams, M.S., Jost, P.J., Lichtenegger, F.S., La Rosée, P., Storch, N., *et al.* (2020). Response to tyrosine kinase inhibitors in myeloid neoplasms associated with PCM1-JAK2, BCR-JAK2 and ETV6-ABL1 fusion genes. *American Journal of Hematology*. <https://doi.org/10.1002/ajh.25825>.

Schwaab, J., Hartmann, N., Naumann, N., Jawhar, M., Weiß, C., Metzgeroth, G., Schmid, A., **Lübke, J.**, Reiter, L., Fabarius, A., *et al.* (2019). Impact of inadequate diagnostic work-up on underestimated incidence and prevalence of advanced systemic mastocytosis. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice*. Accepted.

7 Anhang

Übersicht der methodischen Vorgehensweisen zur Auswertung des advSM-Patientenkollektivs

In folgender Abbildung sind die Schritte 2.2.1 bis 2.2.15 in methodischer Reihenfolge systematisch dargestellt.

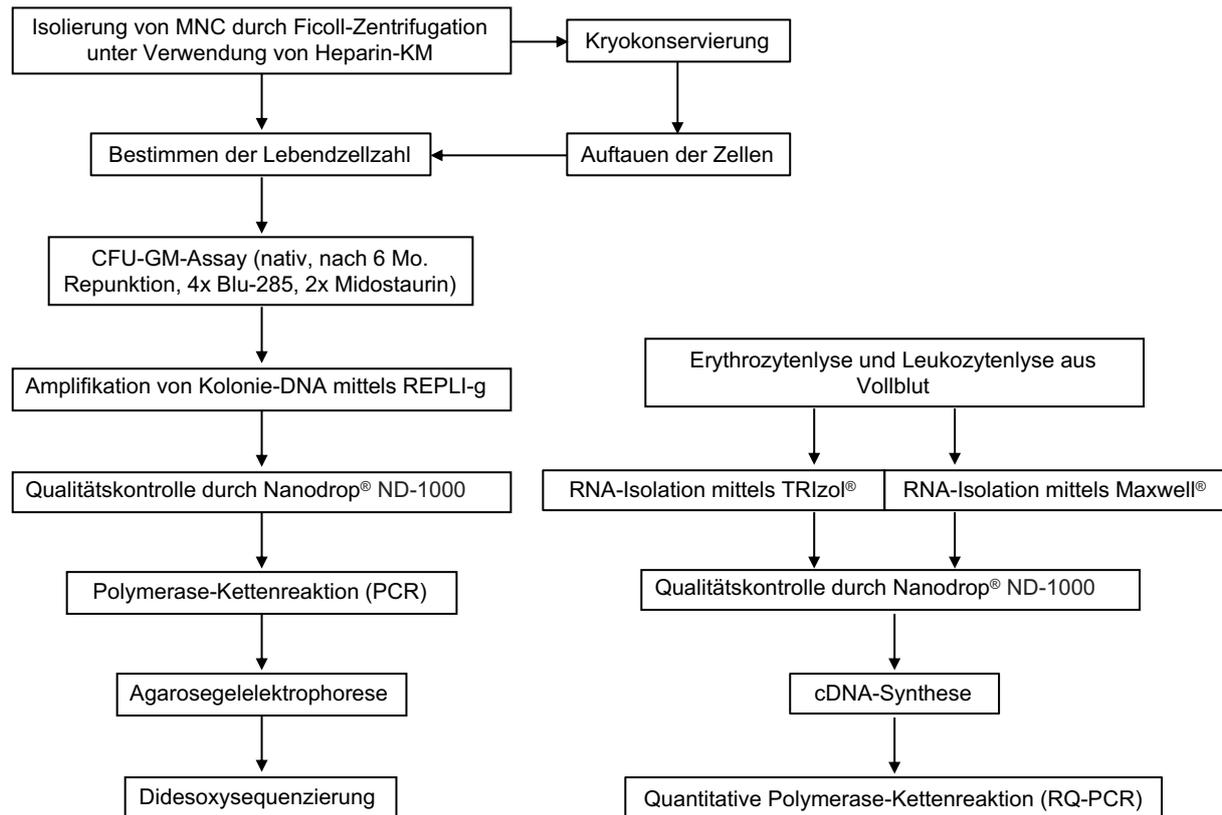


Abbildung 23: Übersicht der durchgeführten Methoden im Rahmen dieser Arbeit.

Flowchart der durchgeführten Methoden zur Bestimmung der hemmenden Wirkung von Midostaurin (*in vivo* und *in vitro*) und Avapritinib (*in vitro*) auf myeloische Progenitorzellen von Patienten mit *KIT* D816V positiver fortgeschrittener systemischer Mastozytose (links) und Bestimmung der *KIT* D816V exprimierten Allellast (rechts).

Abkürzungen: CFU-GM, *colony-forming-unit-granulocyte-macrophage*; MNC, mononukleäre Zellen.

Modifizierte Ansprechkriterien nach Valent und Reduktion der *KIT* D816V exprimierten Allellast in peripherem Blut

Das Ansprechen der CFU-GM Kolonien der Patienten *in vitro* (Reduktion von *KIT* D816V positiven Kolonien $\geq 50\%$) wurde mit den modifizierten Ansprechkriterien nach Valent und der Reduktion der *KIT* D816V exprimierten Allellast im peripheren Blut

verglichen. Die modifizierten Ansprechkriterien (Tabelle 15) entstammen der pivotalen Zulassungsstudie von Midostaurin (Gotlib *et al.*, 2016). In multivarianten Analysen zeigten Jawhar *et al.*, dass die initiale Absenz von Mutationen im S/A/R Genpanel sowie die Reduktion der *KIT* D816V exprimierten Allellast im peripheren Blut $\geq 25\%$ zum Monat sechs (vgl. Abbildung 25) die beiden einzigen unabhängigen Prädiktoren sind, die mit einem erhöhten Gesamtüberleben unter Midostaurin-Therapie vereinbar sind (Jawhar *et al.*, 2017c).

Antwort	C-findings ^a	Subkategorie	MC Infiltration im Organ	Tryptase i.S.	Organomegalie ^b
Vollständiges Ansprechen	Verbesserung in ≥ 1 C-finding	Komplette Remission ^c	n.v.	$\downarrow < 20\text{ng/ml}$	n.v.
		Partielle Remission ^d	$\downarrow > 50\%$	$\downarrow > 50\%$	$\downarrow > 50\%$
		Nur klinische Remission	k.Ä.	$\downarrow \leq 50\% - 0\%$	k.Ä.
		Unspezifisch	Kann nicht subtypisiert werden ^e		
Partielles Ansprechen	Verbesserung in ≥ 1 C-finding $> 50\%$	Gutes partielles Ansprechen ^f			
	Verbesserung in ≥ 1 C-finding $> 20\% \leq 50\%$	Geringes partielles Ansprechen			
Keine Remission	Keine Änderung der C-findings	Stabil			
	≥ 1 C-findings mit Verschlechterung $> 20\%$	Progression			

Tabelle 16: Modifizierte Ansprechkriterien nach Valent.

^aFür ein vollständiges oder partielles Ansprechen darf keine Progression in einem *C-finding* gesehen werden. Nicht quantifizierbare C-findings (bspw. Aszites und Osteolysen) wurden ausgeschlossen. ^bOrganomegalie umfasst Hepatomegalie, Splenomegalie und/oder Lymphadenopathie. ^cFür die komplette Remission müssen alle drei genannten Kriterien zutreffen. ^dFür die partielle Remission muss mindestens einer der genannten Kriterien zutreffen. ^eSubtyp kann aufgrund eines Fehlens an Daten zu Knochenmarkinfiltration und/oder Leber-/Milz-Untersuchungen und/oder des Tryptasespiegels i.S. nicht eindeutig bestimmt werden. ^fMinimaler Anstieg, der als hämatologisches Ansprechen gedeutet wurde: Hämoglobin $\geq 1,5$ g/dl; absolute Neutrophilenzahl $\geq 0,2 \times 10^9$ /L; Thrombozyten $\geq 20 \times 10^9$ /L. Abkürzungen: i.S., im Serum; k.Ä., keine Änderung; MC, Mastzelle; n.v., nicht vorhanden. Tabelle modifiziert nach Gotlib *et al.*, 2016.

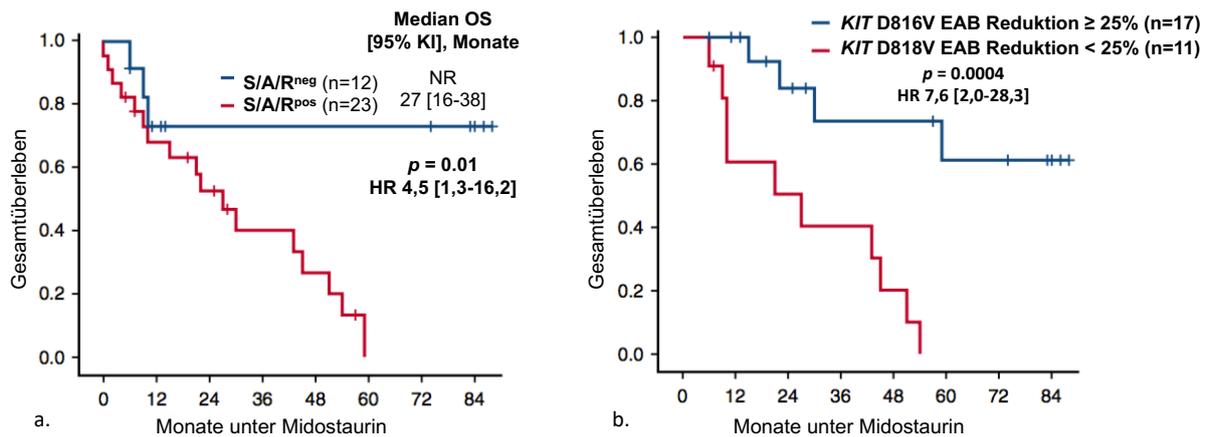


Abbildung 24: Einfluss von Zusatzmutationen und Reduktion der *KIT* D816V exprimierten Allellast auf das Gesamtüberleben.

a. Für die Analyse der Überlebenszeitdaten bei initialer S/A/R Negativität ($n = 12$) versus initialer S/A/R Positivität ($n = 23$) wird das Kaplan-Meier-Verfahren verwendet. Die Überlebenszeiten wurden mittels Log-rank-Test untereinander verglichen. Für Patienten mit S/A/R Negativität wurde das mediane Gesamtüberleben nicht erreicht. Bei Patienten mit S/A/R Positivität wurde das mediane Gesamtüberleben auf 27 Monate bestimmt ($p = 0,01$). Das Sterberisiko ist in der Gruppe mit S/A/R Positivität um das 4,5-fache erhöht (Hazard Ratio).

b. Für die Analyse der Überlebenszeitdaten bei Reduktion der *KIT* D816V exprimierten Allellast $\geq 25\%$ zum Monat sechs ($n = 17$) versus Reduktion der *KIT* D816V exprimierten Allellast $< 25\%$ zum Monat sechs ($n = 11$) wird das Kaplan-Meier-Verfahren verwendet. Die Überlebenszeiten zwischen beiden Gruppen konnten mittels Log-rank-Test signifikant unterschieden werden ($p = 0,0004$). Das Sterberisiko ist in der Gruppe ohne Reduktion der *KIT* D816V exprimierten Allellast $\geq 25\%$ um das 7,6-fache erhöht.

Abkürzungen: EAB, expressed allele burden; HR, Hazard Ratio; NR, nicht erreicht; OS, overall survival.

Abbildung modifiziert nach Jawhar *et al.*, 2017c.

Darstellung der strukturellen Verknüpfungen der STAT5-Proteine

Mitglieder der STAT-Protein-Familie sind intrazelluläre Transkriptionsfaktoren, die an der Signaltransduktion extrazellulärer Botenstoffe (u.a. IL-3, IL-5 und GM-CSF) beteiligt sind und damit u.a. das Immunsystem, das Zellwachstum und auch die Proliferationsrate jener Zellen beeinflussen können.

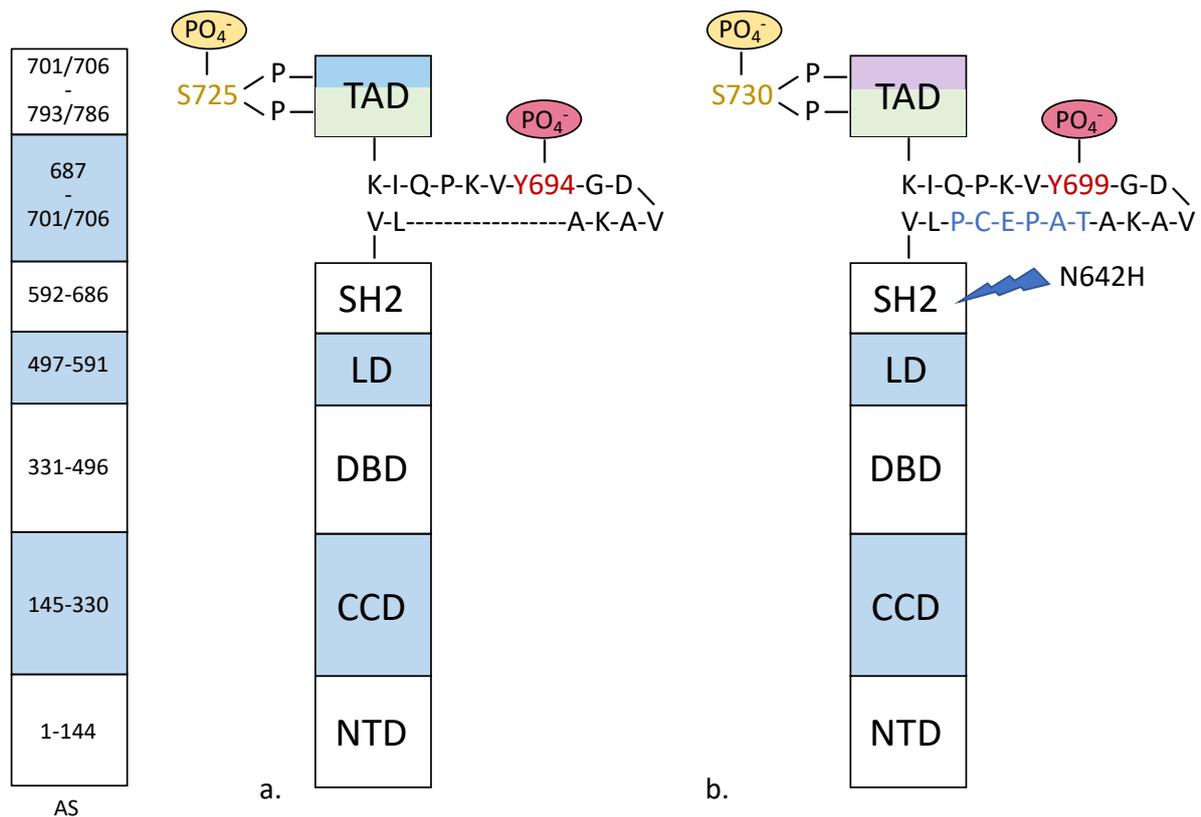


Abbildung 25: Darstellung der strukturellen Verknüpfungen der STAT5-Proteine.

Das STAT5-Protein besteht wie andere Proteine der STAT-Familie aus konservierten, definierten strukturellen und funktionellen Regionen. Dazu gehört die N-terminale Domäne (NTD), die Coiled-Coil-Domäne (CCD), die DNA-Bindungsdomäne (DBD), die Linker-Domäne (LD), die SH2-Domäne (Src-homology 2), und eine Transaktivierungsdomäne (TAD) am C-Terminus. STAT5a in **a.** und STAT5b in **b.** unterscheiden sich einerseits am C-terminalen Ende der SH2-Domäne (siehe dazu blaue Aminosäuregruppen) sowie signifikant in der TAD-Domäne (blau und lila Anteile). Die TAD-Domäne umgibt das positionell hochkonservierte Tyrosin (rot). STAT5 besitzt zudem konservierte Serinphosphorylierungsstellen (bronzefarben). Die N642H Punktmutation im Zentrum der SH2-Domäne bedingt eine Substitution der Aminosäure Asparagin gegen Histidin. Die phosphorylierten STAT-Proteine bilden durch die intermolekulare, nicht kovalente Interaktion zweier SH2-Domänen Homo- bzw. Heterodimere, die eine Translokation in den Nucleus erlauben.

Abkürzung: AS, Aminosäure.

Abbildung modifiziert nach Gimley *et al.*, 1999.

Diagnostischer Algorithmus der Eosinophilie

In folgender Abbildung findet der diagnostische Algorithmus der Eosinophilie unter Berücksichtigung der WHO-Kriterien von 2016 Darstellung.

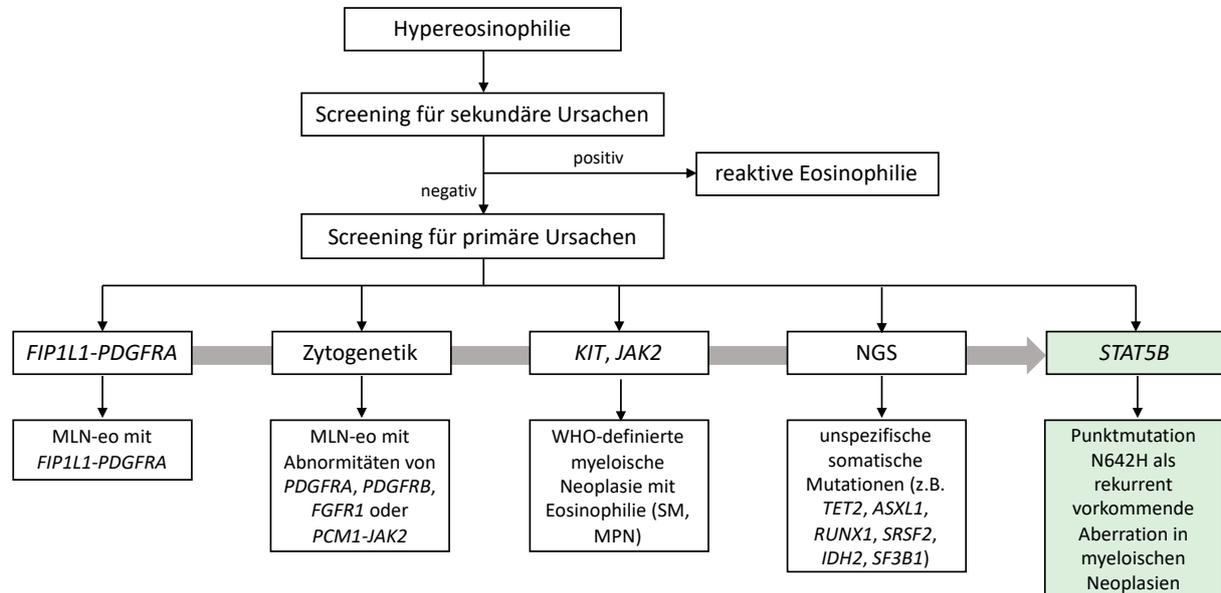


Abbildung 26: Diagnostischer Algorithmus der Eosinophilie.

Initial wird bei vorliegender Hypereosinophilie der Ausschluss einer reaktiven, sekundären Ursache empfohlen. Im weiteren diagnostischen Workflow (grau hinterlegter Pfeil) sollte anschließend auf primäre Ursachen gescreent werden. Dazu gehört das Imatinib-sensible *FIP1L1-PDGFR A* Fusionsgen, sowie weitere Abnormalitäten von *PDGFRA*, *PDGFRB*, *FGFR1* oder *PCM1-JAK2* Fusionsgen, die mit der Diagnose einer myeloischen und lymphatischen Neoplasie mit Eosinophilie und Rearrangierung von *PDGFRA*, *PDGFRB*, *FGFR1* oder mit *PCM1-JAK2* Fusionsgen (MLN-eo) vereinbar sind. Bei negativer Diagnostik sollte im weiteren Verlauf auf die Punktmutationen *KIT* D816V und *JAK2* V617F in Hinblick auf myeloische Neoplasien getestet werden. Nach Ausschluss ist die Analyse weiterer unspezifischer somatischer Mutationen (z.B. *TET2*, *ASXL1*, *RUNX1*, *SRSF2*, *IDH2*, *SF3B1*) mittels *next generation sequencing* (NGS) indiziert. Ist die Ätiologie der Eosinophilie weiterhin ungeklärt, ist eine *STAT5B* Mutationsanalyse empfehlenswert.

Abkürzungen: MPN, myeloproliferative Neoplasie; SM, systemische Mastozytose, WHO, *world health organization*.

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Die WHO 2016 Klassifikation der myeloischen Neoplasien.	2
Abb. 2: Auswahl klinisch relevanter Mediatoren der aktivierten Mastzelle und deren Auswirkungen auf diverse Organsysteme.	4
Abb. 3: Schematischer Aufbau, Aktivierung und Signaltransduktion des KIT-Rezeptors.	7
Abb 4: Chemische Struktur von Midostaurin (PKC 412).	12
Abb 5: Timeline der wesentlichen Entwicklungsstufen von Midostaurin (PKC 412)..	13
Abb 6: Chemische Struktur Avapritinib (BLU 285).	15
Abb. 7: Kinomselektivität von Midostaurin (PKC 412) und Avapritinib (BLU 285) im Vergleich.	16
Abb. 8: Studiendesign des advSM-Patientenkollektivs.	33
Abb. 9: Isolierung von mononukleären Zellen aus Knochenmark.	35
Abb. 10: Bestimmung der Lebendzellzahl.	36
Abb. 11: Aufsicht auf eine CFU-GM-Kolonie unter 100x Vergrößerung.	37
Abb. 12: Ablauf der Polymerase-Kettenreaktion (PCR).	41
Abb. 13: Ablauf der allelspezifischen quantitativen <i>real-time</i> Polymerase-Kettenreaktion.	46
Abb. 14: Ablauf des STAT5B N642H Tetra-Primer ARMS Assay.	48
Abb. 15: Elektropherogramm nach Sanger-Sequenzierung (Reverse-Sequenz) im Gen <i>KIT</i> (Ausschnitt jeweils aus c.2443-c.2451) bei Patient #11.	57
Abb. 16: Zusammenfassende Darstellung der <i>in vivo</i> und <i>in vitro</i> Daten hinsichtlich des Anteils <i>KIT</i> D816V positiver CFU-GM Kolonien in Relation zur Gesamtheit an Kolonien.	58
Abb. 17: Vergleichende patientenspezifische Darstellung der relativen Reduktion des Anteils von Midostaurin-nativen, Midostaurin- und Avapritinib-beimpften <i>KIT</i> D816V positiven CFU-GM Kolonien.	59
Abb. 18: Korrelation der relativen Reduktion des Anteils <i>KIT</i> D816V positiver, Midostaurin-nativer CFU-GM Kolonien zwischen dem „Baseline Assay“ und dem „ <i>in vivo</i> Midostaurin Assay“ mit der relativen Reduktion des Anteils <i>KIT</i> D816V positiver, Midostaurin-nativer CFU-GM Kolonien zwischen dem „Baseline Assay“ und dem „ <i>in vitro</i> Midostaurin Assay“.	61
Abb. 19: Gelelektrophorese nach ARMS-PCR Assay zur Detektion der STATB N642H Mutation bei Patienten mit Eosinophilie.	65
Abb. 20: Molekulare Übersicht des Patientenkollektivs mit Eosinophilie und STAT5B N642H positiven Mutationsstatus (n = 27).	68

Abb. 21: Kaplan-Meier-Kurven der Überlebensdaten von Patienten mit Eosinophilie und positivem <i>STAT5B</i> N642H Mutationsstatus.	69
Abb. 22: Klonale Mutationshierarchie bei n = 4 Patienten mit Eosinophilie.....	70
Abb. 23: Übersicht der durchgeführten Methoden im Rahmen dieser Arbeit.	106
Abb. 24: Einfluss von Zusatzmutationen und Reduktion der KIT D816V exprimierten Allellast auf das Gesamtüberleben.....	108
Abb. 25: Darstellung der strukturellen Verknüpfungen der STAT5-Proteine.....	109
Abb. 26: Diagnostischer Algorithmus der Eosinophilie.....	110

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: WHO-Klassifikation der Mastozytose.	9
Tab. 2: Diagnostische WHO-Kriterien der Systemischen Mastozytosen.	9
Tab. 3: WHO-Klassifikation von Erkrankungen der Eosinophilen.	23
Tab. 4: Ansatz des Denaturierungspuffers D2.	38
Tab. 5: Ansatz des Master-Mix.	38
Tab. 6: Synthetische Oligonukleotide (Primer) der PCR.	40
Tab. 7: Synthetische Oligonukleotide (Primer) der rt-qPCR.	45
Tab. 8: PCR Sonden.	45
Tab. 9: Synthetische Oligonukleotide (Primer) der PCR.	48
Tab. 10: Zusammenfassende Übersicht der initialen klinischen, laborchemischen, histologischen und molekularen Charakteristika von 13 Patienten mit KIT D816V positiver fortgeschrittener SM.	52
Tab. 11: Initiale klinische, laborchemische, histologische und molekulare Profile von 13 Patienten mit <i>KIT</i> D816V positiver fortgeschrittener SM.	54
Tab. 12: Ergebnisse der CFU-GM Kolonien unter Midostaurin- und Avapritinibbehandlung in 13 Patienten mit KIT D816V positiver fortgeschrittener SM.	55
Tab. 13: Korrelation zwischen der Reduktion des KIT D816V EAB im PB und der Reduktion des Anteils Midostaurin-nativer, mit Midostaurin beimpfter, KIT D816V positiver CFU-GM Kolonien.	63
Tab. 14: Korrelation zwischen dem Mutationsstatus im S/A/R-Genpanel und der Reduktion des Anteils Midostaurin-nativer, mit Midostaurin beimpfter, KIT D816V positiver CFU-GM Kolonien.	63
Tab. 15: Klinische und laborchemische Charakteristika der 27 STAT5B N642H positiven Patienten mit Eosinophilie.	66
Tab. 16: Modifizierte Ansprechkriterien nach Valent.	107

8 Lebenslauf

PERSONALIEN

Name und Vorname: Lübke, Johannes
Geburtsdatum: 11. Februar 1996
Geburtsort: Cloppenburg
Familienstand: ledig
Vater: Günter Lübke
Mutter: Mechthild Lübke

SCHULISCHER WERDEGANG

2002 – 2006 Grundschule St. Peter Wildeshausen
2006 – 2014 Gymnasium Kolleg St. Thomas Vechta
11.07.2014 Abitur

UNIVERSITÄRER WERDEGANG

WS 2014/15 Beginn des Studiums der Humanmedizin an der
Universität Heidelberg, Medizinische Fakultät Mannheim
07.09.2016 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (M1)
31.10.2019 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (M2)

9 Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Andreas Reiter für das mir entgegengebrachte Vertrauen bei der Überlassung des Dissertationsthemas, für die exzellente Einbindung in seine Forschungsgruppe und das stets offene Ohr in wissenschaftlichen und privaten Belangen, auch im Hinblick auf meine weitere Zukunft bedanken.

Herrn Prof. Dr. med. Wolf-Karsten Hofmann, Direktor der III. Medizinischen Klinik der Universitätsmedizin Mannheim, danke ich für die Möglichkeit der Promotion im Wissenschaftlichen Labor.

Meinen Betreuern Herrn PD Dr. med. Mohamad Jawhar und Frau Dr. sc. hum. Nicole Naumann danke ich für die außergewöhnlich große fachliche und persönliche Unterstützung, für die Einarbeitung im Labor, für die vielen Ratschläge und Hilfestellungen, für die konstruktive Kritik, ihren Bemühungen hinsichtlich des Vorantreibens der Publikation sowie den stets motivierenden Worten in jedem Abschnitt meiner Promotion zu allen Tages- und Nachtzeiten trotz ihrer hohen Anforderungen und Verpflichtungen in Klinik, Wissenschaftlichem Labor und Forschung. Ich hätte mir keine bessere Betreuung als die eurige vorstellen können.

Bei Frau Prof. Dr. rer. nat. Alice Fabarius möchte ich mich für die wertvolle Unterstützung im Laboralltag und im Promotionsverfahren bedanken.

Ein besonderer Dank für den Einbezug in weitere Forschungsschwerpunkte der Arbeitsgruppe Reiter und auch für ihre sonst äußerst erfrischend unkomplizierte und offene Art in allen Belangen gebührt Frau Dr. med. Juliana Schwaab.

Herrn Dr. med. Sebastian Kluger danke ich für den vollumfänglichen Rat bei der wissenschaftlichen Bearbeitung dieses Themas. Für die kompetente Unterstützung und Einweisung an der Sterilbank danke ich insbesondere Frau Susanne Brendel. Gleichsam bedanken möchte ich mich auch bei allen weiteren Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des hämatologischen Forschungslabors für die angenehme Zusammenarbeit.

Den größten Dank für ihren bedingungslosen Rückhalt, das fortwährende Vertrauen und die Wegbegleitung bis zum heutigen Tag gebührt meinen Eltern Frau Mechthild Lübke und Herrn Günter Lübke, die auf ihre Weise zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.