

**Aus dem Institut für Pathologie der Universität Tübingen
Abteilung für Spezielle Histo- und Cytopathologie
Direktor: Professor Dr. E. Kaiserling**

**Nachweis der c-KIT Punktmutation Asp816→Val
in mikrodissezierten
Mastzellen und Leukämiezellen
bei systemischer Mastozytose mit
assoziierter chronischer myelomonozytärer
Leukämie**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen**

**vorgelegt von
Claudius Hubert Fridrich
aus
Stuttgart**

2004

Dekan: Professor Dr. C. D. Claussen

1. Berichterstatter: Professor Dr. H.-P. Horny

2. Berichterstatter: Professor Dr. P. Valent

3. Berichterstatter: Professor Dr. H. J. Radzun

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1.	Geschichte	1
1.2	Physiologisches Wachstum, Funktion und Färbungsverhalten von Mastzellen	1
1.3.	Manifestationsformen und Klinik der Mastozytosen.....	3
1.4.	Klassifikation der Mastozytosen	5
1.5.	Diagnose der Mastozytosen	7
1.5.1	Hauptkriterium für die Diagnose der systemischen Mastozytose	7
1.5.2	Nebenkriterien für die Diagnose einer systemischen Mastozytose	8
1.5.2.a	Nachweis atypischer spindelförmiger Mastzellen	8
1.5.2.b	Nachweis der c-kit Mutation Asp816→Val.....	8
1.5.2.c	Aberrante Expression von CD2/CD25	8
1.5.2.d	Erhöhte Mastzelltryptase im Serum.....	9
1.6	Pathogenese der Mastozytosen	9
1.6.1	Stammzellfaktorabhängiges Wachstum von Mastzellen und die c-kit Tyrosinkinase (KIT).....	10
1.6.2	Mutationen im c-kit Gen.....	11
1.7	Die c-kit Punktmutation Asp816→Val.....	12
1.8	Ziel der Arbeit	13
2.	Material und Methoden	14
2.1	Kasuistik	14
2.2	Material.....	15
2.2.1	Kontroll-DNA	15
2.2.2	Untersuchtes Patientenmaterial	15
2.3	Methoden	16
2.3.1	Immunfärbung der Gewebeschnitte.....	16
2.3.2	Einzelzellmikrodissektion.....	17
2.3.3	Probenverarbeitung und Proteinase K-Verdau.....	19

2.3.4	PCR-Verfahren:.....	20
2.3.4.a	PCR.....	21
2.3.4.b	Nested-PCR	23
2.3.4.c	Mutationsnachweis	24
2.3.5	Sequenzierung der PCR-Produkte	26
3.	Ergebnisse	27
3.1	Histologische und immunohistochemische Ergebnisse	27
3.2	Mikrodissektion der Einzelzellen.....	29
3.3	Nested PCR der c-kit DNA in mikrodissezierten Einzelzellen	32
3.4.	Mutationsnachweis	35
3.4.1	Light Cycler Mutationsnachweis mittels Schmelzpunktanalyse der HMC-1 Zellen	35
3.4.2	Light Cycler Schmelzpunktanalysen der Gewebeproben zum Mutationsnachweis	36
3.5	Direkte Sequenzierung der Light Cycler nested-PCR-Produkte	40
4.	Diskussion	41
4.1	Diskussion der Methoden	41
4.1.1	Dissektion der Zellen	41
4.1.2	Amplifikation der DNA	42
4.2	Diskussion der Ergebnisse	44
5.	Zusammenfassung.....	48
	Abbildungsverzeichnis.....	49
	Tabellenverzeichnis.....	49
	Literaturverzeichnis	50

1. Einleitung

1.1. Geschichte

1869 beschrieben Nettleship und Tay eine Hautkrankheit, die mit pigmentierten makulopapulösen Effloreszenzen einhergeht und einen roten Dermographismus aufweist (Nettleship und Tay, 1869). Die Krankheit wurde als Urticaria pigmentosa bezeichnet. Kurz nach der Entdeckung der Mastzellen durch Paul Ehrlich im Jahre 1879 wurden in den Hauteffloreszenzen von Urticaria-pigmentosa-Patienten Anhäufungen von Mastzellen gefunden (Ehrlich, 1879). Diese Akkumulation von Mastzellen, jetzt Mastozytose genannt, hielt man lange Zeit für eine auf die Haut beschränkte Erkrankung. Erst 1949 beschrieb Ellis dann die erste systemische Form der Mastozytose unter Beteiligung viszeraler Organe (Ellis, 1949).

1.2 Physiologisches Wachstum, Funktion und Färbungsverhalten von Mastzellen

Mastzellen kommen in allen Bindegeweben in verschieden hoher Anzahl vor. Hohe Anzahlen von Mastzellen finden sich physiologischerweise z.B. in der Uvea und in serösen Körperhöhlen, wohingegen sie in Organen wie Milz, Niere oder Leber nur in geringer Zahl nachweisbar sind.

Mastzellen gehören zur myelomonozytischen Zelllinie. Sie stammen von pluripotenten CD34 positiven Knochenmarksstammzellen ab und proliferieren über eine nicht nachweisbare Vorläuferzellstufe zu gewebespezifischen Mastzellen im Zielorgan. Die endgültige Differenzierung erfolgt wohl im Zielgewebe unter dem Einfluß von lokalen Faktoren wie dem „mast cell growth factor“ (MGF), der synonym als „stem cell factor“ (SCF) bezeichnet wird.

Morphologisch sind Mastzellen mittelgroße (10-15 µm), durch ein rundes Zytoplasma mit ovalen bis runden, 1 µm messenden Granula gekennzeichnete Zel-

len. Der Zellkern ist rund und weist gelegentliche Invaginationen auf. Eine echte Segmentierung jedoch ist selten.

Intrazytoplasmatische Granula enthalten hochaktives Histamin, Heparin, Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), Prostaglandine, Leukotriene und leukotaktische Mediatoren, die bei IgE-vermittelter Stimulierung der Mastzellen, z.B. bei allergischen Reaktionen, degranulieren und ihren Inhalt sezernieren (Jorpes, 1939, Riley, 1953, Ishizaka und Ishizaka, 1969).

In Standardfärbungen wie Haematoxylin / Eosin sind Mastzellen schwer auszumachen. Optimale Färbemethoden sind Giemsa, Toluidinblau oder Spezialfärbungen mit Naphtol-AS-D-Chlorazetatesterase (CAE) sowie die immunhistochemische Markierung der Zellen mit einem Antikörper gegen die Mastzelltryptase, die eine spezifische Markierung zuläßt (Horny et al., 1998). Tryptase ist eine intrazytoplasmatische Serinprotease, die bereits in unreifen Mastzellen exprimiert wird. Somit besitzt die immunhistochemische Markierung eine hohe Sensitivität und Spezifität für Mastzellen. Eine andere mastzellspezifische Protease, die Chymase, wird erst relativ spät in der Entwicklung der Mastzellen exprimiert, so daß sie für histopathologische Färbungen eine untergeordnete Rolle spielt. Zur Unterscheidung basophiler Granulozyten von Mastzellen kommt dem Oberflächenantigen CD117 (c-kit) eine bedeutende Rolle zu. Da basophile Leukozyten sowohl metachromatische Granula enthalten als auch Tryptase- bzw. Chlorazetatesterase-positiv sein können, lassen sie sich mit den oben genannten Färbungen nur schwer von Mastzellen unterscheiden. Mastzellen sind jedoch stets CD117 positiv, während Basophile dieses Oberflächenantigen nicht exprimieren (Tab. 1).

Tab. 1: Oberflächenantigene von Mastzellen und Basophilen

Oberflächenantigen	Normale Mastzellen	MC bei SM im KM	HMC-1 Zellen	Basophile Leukozyten
CD34	-	-	-	-
CD117/KIT	+	+	+	-
Histamin	+	+	+	+
Tryptase	+	+	+	+ / -
Chymase	+ / -	+ / -	-	-
CD2	-	+	+ / -	-
CD14	-	-	-	-
CD15	-	-	-	-
CD25	-	+	+	+
CD68	+	+	+	+ / -
Chlorazetatesterase	+	+ / -	+ / -	+

1.3. Manifestationsformen und Klinik der Mastozytosen

Mastozytose ist ein Oberbegriff für eine sehr heterogene Gruppe von Krankheiten, die alle mit einer pathologisch gesteigerten Mastzellproliferation in einem oder mehreren Organsystemen einhergehen (Lennert und Parwaresch, 1979, Horny et al., 1985, Stein, 1986, Horan, 1991). Prinzipiell werden kutane und systemische Formen unterschieden. Letztere können sowohl indolente als auch aggressive Verläufe zeigen (Lennert und Parwaresch, 1979, Parwaresch und Horny, 1985).

Die Urticaria pigmentosa (UP) ist mit über 80% die häufigste Manifestationsform einer Mastozytose. Diese kutane Form der Erkrankung manifestiert sich in der Regel bereits in der Kindheit und geht typischerweise mit makulopapulösen Hauteffloreszenzen und dem Darier-Zeichen einher. Dabei handelt es sich um eine urtikarielle Reaktion nach mechanischer Reizung. Die Urticaria pigmentosa (UP) weist eine hohe Spontanremissionsrate auf (Caplan, 1963, Lennert und

Parwaresch, 1979). Weitaus seltenere Formen der kutanen Mastozytose sind das kutane Mastozytom und die diffuse kutane Mastozytose. Diese sind, wie die *Urticaria pigmentosa*, meist mit einer guten Prognose verbunden.

Die systemische Mastozytose kann sich in jedem Alter manifestieren und ist durch eine pathologische Mastzellproliferation in einem oder mehreren extrakutanen Organen gekennzeichnet. In den meisten Fällen ist das Knochenmark betroffen, aber auch Leber und Milz sind häufige Manifestationsorte. Die systemische Mastozytose kann mit einem *Urticaria pigmentosa*-artigem Hautbefall assoziiert sein (Lennert und Parwaresch, 1979).

Die systemischen Mastozytosen lassen sich weiter unterteilen in die indolente systemische Mastozytose (ISM) und die aggressive systemische Mastozytose (ASM). Die indolente systemische Mastozytose (ISM) zeigt in praktisch 100% der Fälle einen Knochenmarksbefall, jedoch ist eine Infiltration der meist reifen, metachromatisch granulierten Mastzellen zumeist gering (< 30%), und die Knochenmarksarchitektur bleibt erhalten. Das periphere Blutbild ist fast immer unauffällig.

Bei der aggressiven systemischen Mastozytose hingegen zeigt die Knochenmarkshistologie einen variablen Umbau der Strukturen durch meist unreife, wenig granulierten Mastzellen. Des Weiteren finden sich Organbeteiligungen wie Hepatomegalie oder Splenomegalie und sogenannte C-Symptome. Definitionsgemäß und im Gegensatz zur indolenten systemischen Mastozytose kommt es dabei zu einer ausgeprägten Funktionseinschränkung der betroffenen Organe. Zusätzlich können sich im Knochenmark und auch im peripheren Blutbild Anzeichen für eine Myeloproliferation oder Myelodysplasie finden (Valent et al., 2001).

In bis zu 20% der systemischen Mastozytosen werden assoziierte hämatologische, nicht von Mastzellen ausgehende Erkrankungen beschrieben. Die häufigsten Begleiterkrankungen sind das myeloproliferative Syndrom und das myelodysplastische Syndrom. Ebenso wurden systemische Mastozytosen mit assoziierter akuter myeloischer Leukämie oder Plasmozytom beschrieben (Brunning et al., 1983, Travis et al., 1988, Horny et al., 1990, Lawrence et al., 1991). Ent-

scheidend für die Prognose der Erkrankten ist hier der Verlauf der assoziierten hämatologischen Neoplasie.

Eine weitere Variante der Mastozytosen ist die seltene, hochaggressive, prognostisch *infauste* Mastzelleukämie (Travis et al., 1986). Eine ebensolche Rarität stellt das Mastzellsarkom dar. Hierbei handelt es sich um einen lokal destruierend wachsenden Tumor atypischer Mastzellen ohne primär systemische Beteiligung (Valent et al., 2001).

1.4. Klassifikation der Mastozytosen

Im September 2000 erarbeitete die „Year 2000 Working Conference“ in Wien ein Konsensuspapier zur Klassifikation der Mastozytosen. Diese Klassifikation wurde mittlerweile in das WHO-Buch zur Diagnostik und Systematik maligner hämatologischer Erkrankungen übernommen. Es teilt die Mastozytosen folgendermaßen ein (Valent et al., 2001, vgl. Tab. 2):

Tab. 2: Klassifikation der Mastozytosen nach der "Year 2000 Working Conference on Mastocytosis"

Klassifikation der Mastozytosen

- Kutane Mastozytose (CM)
 - Urticaria Pigmentosa
 - Diffuse kutane Mastozytose
 - Mastozytom der Haut

- Indolente Systemische Mastozytose (ISM)
 - Typische ISM
 - ISM auf das Knochenmark beschränkt
(= Isolierte Knochenmarksmastozytose)
 - Smouldering Systemische Mastozytose

- Systemische Mastozytose mit assoziierter klonaler hämatologischer nicht-mastzellartiger Erkrankung (SM - AHNMD)

- Aggressive systemische Mastozytose (ASM)

- Mastzelleukämie

- Mastzellsarkom

- Extrakutanes Mastozytom

1.5. Diagnose der Mastozytosen

Die Differenzierung zwischen systemischer und kutaner Mastozytose ist nur anhand einer Knochenmarksbiopsie möglich, wodurch gegebenenfalls bereits eine systemische Beteiligung nachgewiesen werden kann.

Die Diagnose einer kutanen Mastozytose orientiert sich an den typischen klinischen Symptomen der Hauteffloreszenzen sowie dem Fehlen von Diagnosekriterien für eine systemische Mastozytose.

Die für die Diagnosestellung der systemischen Mastozytose erarbeiteten Kriterien gliedern sich in ein Hauptkriterium und vier Nebenkriterien. Um die Diagnose „Systemische Mastozytose“ stellen zu können, müssen *per definitionem* entweder ein Hauptkriterium und ein Nebenkriterium oder mindestens drei Nebenkriterien erfüllt sein. Im folgenden sollen diese Diagnosekriterien kurz erläutert werden.

1.5.1 *Hauptkriterium für die Diagnose der systemischen Mastozytose*

Als Hauptkriterium für die Diagnose einer systemischen Mastozytose gilt der histologische Nachweis multifokaler, kompakter Infiltrate aus Mastzellen im Knochenmark oder in einem extramedullären Organsystem (Horny et al., 2001). Diese Infiltrate sollten aus Zellverbänden von mindestens 15 - 20 Mastzellen bestehen. Zur sicheren Identifizierung der Mastzellen wird ausdrücklich eine mastzellspezifische immunhistochemische Färbung wie Anti-Tryptase empfohlen (Horny und Valent, 1998).

1.5.2 *Nebenkriterien für die Diagnose einer systemischen Mastozytose*

Die WHO-Klassifikation enthält vier Nebenkriterien für die Diagnose einer systemischen Mastozytose:

1.5.2.a Nachweis atypischer spindelförmiger Mastzellen

Histologisch im Knochenmark oder anderen Organen nachgewiesene bzw. zytologisch in Knochenmarksausstrichen nachgewiesene Mastzellinfiltrate müssen zu mehr als 25% aus atypischen spindelzelligen Mastzellen bestehen (Valent et al., 2001).

1.5.2.b Nachweis der c-kit Mutation Asp816→Val

Wachstum und Proliferation von Mastzellen werden durch die stammzellefaktorabhängige Tyrosinkinase KIT vermittelt. Mutationen in diesem Gen, speziell die Mutation Asp816→Val, führen zu einer ligandenunabhängigen Stimulation der Zellproliferation und können somit eine systemische Mastozytose mitverursachen bzw. deren Prognose mitbeeinflussen (Longley et al., 1999). In Abschnitt 1.6 ist dieser Pathomechanismus genauer beschrieben.

1.5.2.c Aberrante Expression von CD2/CD25

Auf Zelloberflächen werden zellspezifische Oberflächenantigene exprimiert. Insbesondere die Expression von CD2 oder CD25 ist in diesem Zusammenhang von besonderem Interesse, da sie normalerweise auf T-Lymphozyten und natürliche Killerzellen beschränkt ist und in normalen oder reaktiv vermehrten Mastzellen gänzlich fehlt (Escribano et al., 2001). Interessanterweise findet sich die CD2/CD25-Expression auf Mastzellen in Patienten mit systemischer Masto-

zytose sowie bei Mastzelleukämie als auch in einem Subklon der Mastzelleukämiezelllinie HMC-1 (Escribano et al., 1997; Valent et al., 1995). Somit stellt der Nachweis einer abnormen Expression von CD2 und / oder CD25 eine überaus spezifische und sensitive Methode zum Nachweis neoplastischer Mastozytosen bei systemischer Mastozytose dar.

1.5.2.d Erhöhte Mastzelltryptase im Serum

Tryptase wird hochspezifisch von Mastzellen exprimiert (Schwartz et al., 1987). Man unterscheidet eine α - und eine β -Tryptase (Schwartz, 2001). Während die α -Tryptase wohl hauptsächlich durch die Mastzellen sezerniert wird, wird die β -Tryptase überwiegend in Mastzellgranula gespeichert und ist nur nach Mastzellaktivierung, etwa im Rahmen anaphylaktoider Reaktionen, im Serum nachweisbar. Die Bestimmung des kompletten Tryptasespiegels (α - und β -Tryptase) im Serum oder Plasma gibt daher hauptsächlich den α -Tryptasespiegel wieder und korreliert gut mit der Mastzellzahl (Schwartz, 2001). Der mittlere totale Tryptasespiegel bei gesunden Menschen liegt bei etwa 5 ng/ml. Tryptasespiegel von mehr als 20 ng/ml sind hochgradig verdächtig für das Vorliegen einer systemischen Mastozytose (Schwartz, 2001). Somit korreliert der Serumtryptasespiegel mit der Ausdehnung der Erkrankung.

1.6 Pathogenese der Mastozytosen

Ob die kutane Mastozytose, Urticaria pigmentosa, eine klonale Form der Mastozytose ist, ist derzeit unklar. Dagegen legen verschiedene Publikationen die Vermutung nahe, daß die meisten Formen der adulten Mastozytosen klonalen und somit neoplastischen Ursprungs sind. Dies gründet sich vor allem auf dem Nachweis der somatischen Mutation Asp816→Val des c-kit Gens, die auch bei Patienten mit systemischer Mastozytose identifiziert werden konnte (Nagata et

et al. 1995, Nakata et al., 1995, Longley et al., 1996). Die vorgenannten Autoren beschrieben den klonalen Ursprung der systemischen Mastozytosen und der systemischen Mastozytosen mit assoziierter hämatologischer Erkrankung. Dieselben Mutationen wurden aber nicht nur in den neoplastischen Mastzellen, sondern auch in den Zellen der assoziierten hämatologischen Erkrankung beschrieben (Beghini et al., 2000, Ning et al., 2001). Allerdings wurden bisher nicht gezielt einzelne Zellen aus histologischen Schnitten, sondern vor allem Zellen des peripheren Blutes bzw. Knochenmarksaspirationszytologien als Untersuchungsobjekte verwendet.

1.6.1 Stammzellfaktorabhängiges Wachstum von Mastzellen und die c-kit Tyrosinkinase (KIT)

Die Mastzellproliferation und die Mastzelldifferenzierung aus CD34 positiven Vorläuferzellen wird vor allem durch die Interaktion des „stem cell factors“ (SCF) mit der transmembranösen Tyrosinkinase KIT induziert (Qui et al., 1988, Irani et al., 1992, Valent et al, 1992).

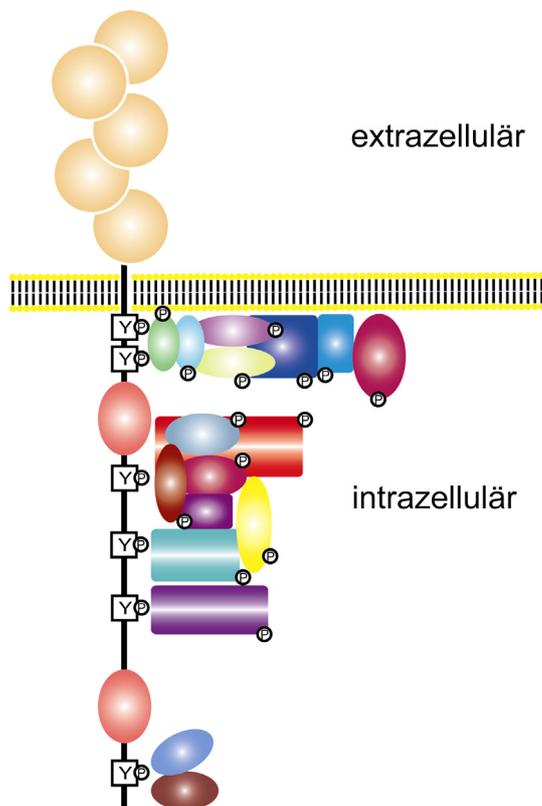


Abb. 1: Die Abbildung, verändert nach Scheijen und Griffin (2002), zeigt einen schematischen Aufbau der intra- und extrazellulären funktionellen Untereinheiten der Tyrosinkinase c-KIT

KIT ist eine Typ III transmembranöse Tyrosinkinase und wurde als humanes Äquivalent des felines protoonkogenen v-Kit identifiziert (Yarden et al., 1987). V-Kit kann nach Transfektion mit dem felines Sarkomavirus (HZ4) Neoplasien induzieren. Die transmembranöse Tyrosinkinase KIT wird auf Mastzellen, aber auch auf Zellen der myeloischen und lymphozytischen Reihe, Melanozyten und Keimzellen exprimiert (Manova et al., 1990, Orr-Urteger et al., 1990, Ashman et al., 1991, Ogawa et al., 1991, Papayannopoulou et al., 1991, Sillaber et al., 1991, Reisbach et al., 1993).

KIT wird durch das Gen *c-kit* kodiert, das auf dem langen Arm des Chromosoms 4 liegt. Ein 975-aminosäurenlanges Translationsprodukt bildet die Primärstruktur der Tyrosinkinase. Das N-terminale Ende bildet eine extrazelluläre, das C-terminale Ende eine intrazelluläre Domäne (Qui et al., 1988, vgl. Abb. 1).

Nach Stimulation durch den „stem cell factor“ (SCF) erfolgt eine Dimerisierung des Rezeptors KIT. Die anschließende intrazelluläre Autophosphorylierung aktiviert signaltransduzierende intrazelluläre second-messenger-Kinasen und somit die Phosphorylierung der Zielsubstrate, welche eine Zellproliferation und Zelldifferenzierung induzieren.

1.6.2 *Mutationen im c-kit Gen*

Innerhalb des *c-kit* Gens wurden mehrere somatische Mutationen beschrieben, die unterschiedliche Auswirkungen auf die Funktion der Tyrosinkinase KIT haben. Neben sogenannten stummen Mutationen, bei denen Funktion und Wirkungsweise des Proteins unverändert bleiben, können funktionelle Mutationen über eine Beeinflussung der Signaltransduktion des Rezeptors eine Beeinträchtigung der Mastzellfunktion verursachen. Dies wurde durch Untersuchungen an knock-out Mäusen mit Defekten im *c-kit* Gen oder des „stem cell factors“ (SCF) deutlich (Kitamura et al., 1978, Pawson, 1995). Beim Menschen verursachen diese Mutationen Piebaldismus (Albinismus congenitus circumscriptus partialis), einhergehend mit Taubheit, melanozytenfreien Hautstellen und weißer Stirnlocke (Fleischman et al., 1991, Giebel und Spritz, 1991).

Funktionelle Mutationen können aber auch einen Zugewinn an Funktion („gain of function“) verursachen. Dies kann von einer „stem cell factor“-abhängigen zu einer „stem cell factor“-unabhängigen Proliferation von Mastzellen führen (Kitayama, 1995).

Die Mutationen im c-kit Gen lassen sich in zwei Klassen unterteilen. Eine Klasse enthält die Mutation in der im aktiven Zentrum liegenden Proteinsequenz. Dies hat zur Folge, daß sich die Quartärstruktur der KIT-Kinase verändert und eine „stem cell factor“-unabhängige Kinaseaktivität induziert werden kann. Die zweite Klasse beinhaltet die Mutation in den Regulationsabschnitten der Tyrosinkinase KIT. Hierbei sind die nicht direkt im aktiven Zentrum der Kinase liegenden Abschnitte betroffen. Es konnte zum Beispiel eine intrazellulär gelegene α -Helix identifiziert werden, die im physiologischen Zustand die Kinaseaktivität am freien „stem cell factor“ Rezeptor unterdrückt. Tritt hier eine Veränderung der Struktur auf, ist die Signaltransduktion von extra- nach intrazellulär betroffen. Daraus resultiert eine ligandenunabhängige Kinaseaktivität (May et al., 1999).

1.7 Die c-kit Punktmutation Asp816→Val

Eine der Mutationen im Bereich des aktiven Zentrums des c-kit Gens ist die Mutation Asp816→Val, die bei Patienten mit systemischer Mastozytose mit und ohne Hautbeteiligung bzw. assoziierter hämatologischer Erkrankung nachgewiesen wurde (Furitsu et al., 1993, Nagata et al., 1995, Longley et al., 1996, Afonja et al., 1998, Worobec et al., 1998, Sperr et al., 1998, Longley et al., 1999, Akin et al., 2000, Sotlar et al., 2000). Sie wurde erstmals in einer aus einer Mastzelleukämie etablierten Zelllinie (HMC-1) detektiert (Furitsu et al., 1993). Die Mutation Asp816→Val ist eine Punktmutation, der ein Austausch des Adenins gegen Thymin an Position **nt 7176** der genomischen DNA zugrunde liegt. Es entsteht ein Aminosäureaustausch von Asparagin gegen Valin im Codon 816 in der Proteinsequenz. Dieser Aminosäureaustausch führt zu einer Konformationsänderung des aktiven Zentrums der Tyrosinkinase. Daraus resul-

tiert eine Autophosphorylierung des Tyrosinkinase-Rezeptors, die eine Autostimulation und somit eine ligandenunabhängige Zellproliferation induziert (Furitsu et al., 1993, Kitayama et al., 1995).

1.8 Ziel der Arbeit

Bei den systemischen Mastozytosen spielt die Tyrosinkinase KIT eine entscheidende Rolle bezüglich der Entstehung der Erkrankung. In der kodierenden Sequenz von KIT sind verschiedene Punktmutationen beschrieben. Die häufigste dieser Mutationen ist Asp816→Val, welche nicht nur in Mastzellen, sondern auch in Blutzellen und verschiedenen anderen Gewebetypen beschrieben wurde (Nagata et al., 1995, Longley et al., 1999, Sotlar et al., 2000).

In einer vorhergehenden Studie untersuchten Sotlar et al. bei einem Patienten mit systemischer Mastozytose und assoziierter chronischer myelomonozytärer Leukämie das Knochenmark auf die Punktmutation Asp816→Val (Sotlar et al., 2000). Hierbei wurden per manueller Gewebemikrodissektion und PCR-Amplifikation kompakte Knochenmarksinfiltrate von Mastzellen einerseits, Infiltrate myelomonozytischer Zellen andererseits untersucht. Sowohl in den Mastzellinfiltraten als auch in den leukämischen Infiltraten konnte die Punktmutation nachgewiesen werden. Allerdings wurde dies nicht an reinen Zellpopulationen gezeigt, da die Infiltrate auch von anderen Knochenmarkszellen durchsetzt waren. Somit konnte zelltypenfremde DNA in der Analyse nicht sicher ausgeschlossen werden (Sotlar et al., 2000).

Zur Beantwortung der Frage, ob im vorliegenden Fall einer systemischen Mastozytose mit assoziierter chronischer Myelomonozytenleukämie beide Neoplasien aus einem gemeinsamen Progenitor hervorgegangen sind, wurden per Lasermikrodissektion separierte reine Zellpopulationen beider Neoplasien auf das Vorkommen der somatischen c-kit Mutation Asp816→Val untersucht. Der Mutationsnachweis wurde mittels Schmelzpunktanalysen mit spezifischen Hybridisierungssonden geführt.

2. Material und Methoden

2.1 Kasuistik

Ein 68 Jahre alter Patient stellte sich erstmals 1993 in der Klinik mit Nachtschweiß, Gewichtsverlust und Gelenkbeschwerden vor. Es wurde die Diagnose einer seropositiven rheumatoiden Arthritis gestellt. Eine Splenomegalie oder Lymphadenopathie bestanden nicht. Außerdem litt der Patient an einer leichten normozytären Anämie mit einem Hämoglobinwert von 10,6 g/dl und 146 000 Thrombozyten pro μl . Das übrige Blutbild war ohne pathologischen Befund. Der Patient wurde mit Methotrexat, nichtsteroidalen Antirheumatika, Prednison und Antihistaminika behandelt, worauf sich die rheumatischen Symptome besserten. Die normozytäre Anämie jedoch blieb bestehen. Aufgrund dessen wurde eine Knochenmarkspunktion durchgeführt, die ein hyperzelluläres Mark mit fokalen, atypischen Mastzellinfiltraten zeigte. Dieser Befund führte zur Diagnose einer Mastozytose. In den folgenden Staginguntersuchungen fand sich eine Vermehrung locker verstreuter Mastzellen in der Mukosa von Dünn- und Dickdarm. Eine Beteiligung der Haut im Sinne von Urticaria pigmentosa-artigen Läsionen zeigte sich nicht.

Innerhalb der nächsten fünf Jahre entwickelte der Patient eine transfusionsbedürftige Anämie, eine Monozytose ($>1000/\mu\text{l}$) und eine Hepatosplenomegalie. Die Diagnose einer „systemischen Mastozytose mit assoziierter chronischer myelomonozytärer Leukämie“ wurde gestellt. Im Juni 1997 trat eine Progression der Leukämie ein, wobei im Blutbild 19 000 Leukozyten pro μl und 162 000 Thrombozyten pro μl nachgewiesen wurden. Der Hämoglobinwert lag bei 7,6 g/dl. Das Differentialblutbild zeigte eine Linksverschiebung mit 11% Blasten und 6% Monozyten. Die erneut durchgeführte Knochenmarkspunktion ergab ein hyperzelluläres Knochenmark mit stark gesteigerter Myelopoese, einem hohen Anteil unreifer monozytischer Zellen, vielen atypischen Mastzellen und 10% Blasten. Daraufhin wurde eine zytostatische Therapie mit Hydroxyharnstoff eingeleitet.

Im November 1997 entwickelte der Patient eine Pseudomonas-aeruginosa-Pneumonie, die sich unter Antibiotikatherapie zurückbildete. Trotzdem verschlechterte sich der klinische Zustand des Patienten derart, daß er im Januar 1998 verstarb. Eine Autopsie wurde nicht durchgeführt.

2.2 *Material*

2.2.1 *Kontroll-DNA*

Die Zelllinie HMC-1 ist von einer Mastzelleukämie abgeleitet und trägt heterozygot die c-kit Mutation Asp816→Val (Furitsu et al., 1993). Diese Zellen wurden als Positivkontrollen und zum Etablieren der molekularbiologischen Assays eingesetzt. Extrahierte DNA der HMC-1-Zellen wurde von Prof. Dr. med. P. Valent (Universität Wien, Abt. für Hämatologie und Onkologie) zur Verfügung gestellt. Als geeignete Negativkontrolle wurde DNA aus gesundem Plazentagewebe extrahiert.

2.2.2 *Untersuchtes Patientenmaterial*

Retrospektiv standen für die im Rahmen dieser Studie durchgeführten Untersuchungen zwei in Paraffin eingebettete Knochenmarksstanzen aus den Jahren 1993 und 1997 zur Verfügung, die dem Patienten der Kasuistik entstammten. Diese zu diagnostischen Zwecken durchgeführten Knochenmarksstanzen wurden jeweils aus dem Beckenkamm entnommen. Beide Proben wurden in 5%-igem Formalin (pH 7,0) fixiert und mittels EDTA entkalkt.

Außerdem standen von dem Patienten Kolonbiopsien aus dem Jahre 1993 zur Verfügung, welche ebenfalls zu diagnostischen Zwecken im Rahmen von Staginguntersuchungen gewonnen wurden. Diese wurden ebenfalls in 5%-igem Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet.

Alle im Rahmen dieser Dissertation untersuchten Gewebsschnitte bzw. Zellen des Knochenmarks stammen von diesem Untersuchungsmaterial her.

Von den Paraffinblöcken wurden 10 jeweils 10 µm dicke Schnitte angefertigt, auf Glasobjektträger aufgezogen und bei -70°C trocken gelagert.

2.3 Methoden

2.3.1 Immunfärbung der Gewebeschnitte

Um die Identifikation von Mastzellen einerseits und leukämischer Zellen andererseits für die Mikrodissektion zu erleichtern, wurden jeweils immunhistologische Spezialfärbungen mit spezifischen Antikörpern durchgeführt. Zur Markierung der Mastzellen kam ein spezifischer Antikörper gegen die Mastzell-Tryptase (AA1, DAKO Diagnostika, Hamburg, FRG) zum Einsatz (Horny et al., 1998). Die Detektion der leukämischen Zellen erfolgte mittels Anti-CD15 (Leu-M1, Becton Dickinson, USA), einem Marker für die Zellen der unreifen Granulopoese.

Dazu wurden von den Paraffinblöcken der beiden Knochenmarksbiopsien aus den Jahren 1993 und 1997 ca. 10 µm dicke Gewebeschnitte auf sialanisierten Glasobjektträgern aufgezogen und, entsprechend vorbeschriebener Standardtechniken, gefärbt (Horny et al., 1998). Zusammenfassend wurden die Schnitte in Xylol entparaffiniert und die endogene Peroxidasereaktion mittels 15-minütiger Inkubation in 5%-igem Wasserstoffperoxid in Methanol geblockt. Danach wurden die Schnitte zweimal mit Tris-Puffer (pH 7,6) gespült und 10 Minuten mit Tris-gepufferter 0,1%-iger Protease XIV (Sigma, St. Louis, MO) überschichtet. Um unspezifische Bindungen von Antikörpern zu vermeiden, wurde 1%-iges Pferdeserum (Vector Laboratories, Burlingham, CA) dem im Verhältnis 1:1000 verdünnten Antikörperansatz zugefügt und der Schnitt 60 Minuten inkubiert. Nach der erfolgten spezifischen Antikörperbindung wurde Diaminobenzi-

din (DAB) als Substrat für die Färbereaktion hinzupipettiert. Anschließend wurde eine Kerngegenfärbung mit Hämalaun durchgeführt.

2.3.2 *Einzelzellmikrodissektion*

Um ausschließlich Zellen eines Typs, d.h., Mastzellen, leukämische Zellen oder Dickdarmepithelien molekularbiologisch untersuchen zu können, erfolgte eine Mikrodissektion dieser Zellen mit einem PALM „Robot Micro Beam“ System (Schütze und Lahr, 1998). Das Prinzip der Laserdissektion mit diesem System beruht auf der hohen Photonendichte, die im Fokus eines circa 1 μm durchmessenden, fokussierten 337 nm Stickstofflaserstrahls auftritt. In einem inversen Mikroskop können Gewebeschnitte mit dem Laserstrahl manipuliert und Zellmaterial aus dem Gewebeverband herauskatapultiert werden. Gewebe kann geschnitten werden, indem man hohe Energien verwendet und den Brennpunkt des Strahls auf den Schnitt fokussiert. Verringert man die Energie und den Fokus, werden die gewünschten Zellen auf einer Photonenwelle nach oben in den Deckel eines Eppendorfgefäßes „geschwemmt“ und dort in einer Schicht aufgetragenen PCR-Öls (Sigma) aufgefangen (Abb. 2).

Auf diese Weise kann eine sehr exakte, kontaktfreie und damit kontaminationsarme Separation verschiedener Zelltypen von einem Schnitt erfolgen (Schütze und Lahr, 1999).

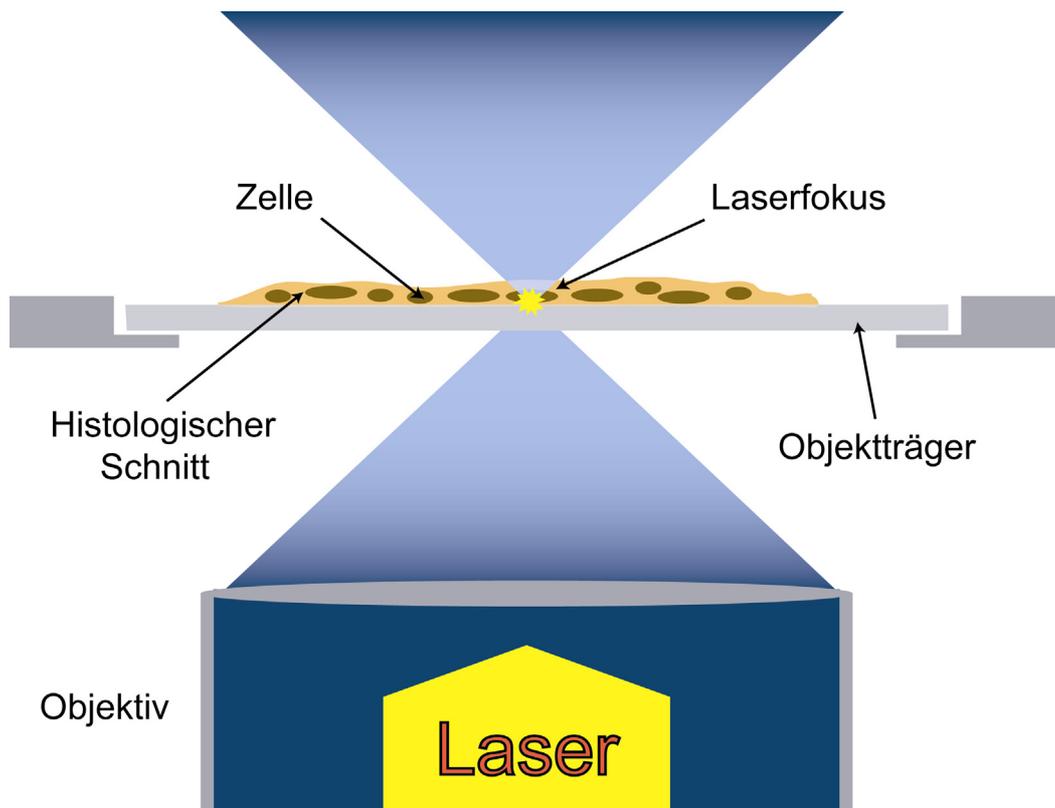


Abb. 2: Die Abbildung zeigt einen schematischen Aufbau des „PALM Robot Micro Beam“ Systems nach PALM. Der Laserstrahl wird so fokussiert, daß sein Brennpunkt auf dem histologischen Schnitt liegt und das histologische Material aus dem Zellverband herausgelöst wird.

In der Praxis wurden die auf Objektträger aufgezogenen Schnitte ohne Deckglas mit einem inversen Mikroskop der Firma Zeiss mikroskopiert. Will man größere Gewebsanteile mikrodissenizieren, können die histologischen Schnitte zusätzlich auf eine Plastikmembran aufgezoen werden. Für die Einzelzellmikrodissenektion stellte sich heraus, daß das in der immunhistologischen Routinediagnostik übliche Aufziehen der Gewebeschnitte auf Glasobjektträger genügte. Über dem Gewebeschnitt wurde der Deckel eines mit Mineralöl bestrichenen PCR-Gefäßes positioniert. Computergestützt erfolgte nun die „Anregung“ der ausgewählten Zellen mit einem auf den Schnitt fokussierten Laserstrahl, der die Zelle in den Deckel des Reaktionsgefäßes katapultierte, wo sie an dem dünnen Ölfilm haften blieb.

Um den DNA-Gehalt des mikrodisszezierten Zellmaterials in ausreichendem Maße für die anschließende PCR zu erhöhen, wurden jeweils 50 Zellen einer zu untersuchenden Zellreihe in dem Deckel eines PCR-Gefäßes "gepoolt". Dies war notwendig, da die zelluläre DNA durch die Vorbehandlung (Formalinfixierung und EDTA-Entkalkung) bereits deutlich degradiert war und die Untersuchung ungepoolter Einzelzellen wenig aussichtsreich gewesen wäre.

Aus den Knochenmarksstanzen des Jahres 1993 wurden 17 Reaktionsgefäße mit jeweils 50 Mastzellen aus den kompakten Infiltraten, 24 Reaktionsgefäße mit locker verstreut liegenden Mastzellen und 30 Reaktionsgefäße mit CD15 positiven leukämischen Zellen separiert. Aus den Biopsien des Kolons von 1993 wurden 25 Reaktionsgefäße mit locker verstreuten Mastzellen und 10 Reaktionsgefäße mit kolomukosalen Epithelzellen entnommen.

Aus der Knochenmarksstanze von 1997 wurden 10 Reaktionsgefäße mit Mastzellen der kompakten Infiltrate, 10 Reaktionsgefäße mit locker verstreut liegenden und zwei Reaktionsgefäße mit CD15 positiven Zellen gewonnen, so daß sich eine Gesamtzahl von 128 Reaktionsgefäßen ergab.

Nach jedem fünften Reaktionsgefäß wurde eine Negativkontrolle, d.h., ein Reaktionsgefäß ohne Zellen, aber mit Reaktionsansatz zur Kontaminationskontrolle mitprozessiert.

2.3.3 *Probenverarbeitung und Proteinase K-Verdau*

Um die DNA der mikrodisszezierten Zellen auf die Mutation Asp816→Val untersuchen zu können, mußte die DNA amplifiziert werden. Dies setzte eine Lysierung der Zellmembranen bzw. die Trennung der DNA von Histonen voraus, so daß der zu amplifizierende DNA-Abschnitt als Doppelstrang-DNA vorlag.

Zuerst wurden die an den Deckeln der Reaktionsgefäße in dem aufgetragenen Ölfilm haftenden Zellen mit 40 µl PCR-Puffer (50mM Tris, 1 mM EDTA, 0,5% Tween-20, pH 8,5) unter Pipettieren im Deckel emulgiert und acht Stunden auf dem Kopf stehend inkubiert. Nach der Inkubation wurde fünf Minuten bei 13 000 U/min und Raumtemperatur zentrifugiert und die Proben in ein neues PCR-Cup

überführt. Um das Verdunsten und Kondensieren des Reaktionsgemisches am Deckel bzw. dem Rand des PCR-Gefäßes zu verhindern, wurden die Proben mit 50 µl Mineralöl überschichtet. Zur Lyse der Zellmembranen wurden die Proben anschließend für 10 Minuten auf 95°C im Thermocycler erhitzt und wieder auf Raumtemperatur abgekühlt. Anschließend wurden 8 µl Proteinase K, mit 1 µg/µl Enzym (Proteinase K PCR-Grade, Roche, Mannheim, Germany), zu den 40 µl PCR-Puffer hinzupipettiert und 12 Stunden bei 55°C im Thermocycler inkubiert. Danach folgte eine Denaturierung der Proteinase K bei 95°C für 10 Minuten. In jedes Gefäß wurden 52 µl PCR-Mix (vgl. 2.3.4.a) zu einem Gesamtvolumen von 100 µl pipettiert.

2.3.4 PCR-Verfahren:

Zur Amplifikation der DNA folgte eine PCR-Reaktion mit anschließender nested-PCR, um die Sensitivität der Nachweismethode zu maximieren. Die Durchführung einer nested-PCR und die damit verbundene maximale Sensitivitätssteigerung wurden aufgrund der geringen DNA-Menge und der durch die Vorbehandlung mit Formalin und EDTA degradierten DNA notwendig. Eine nested-PCR verwendet Primer, die innerhalb des Amplifikats der konventionellen PCR liegen. So können in weiteren Reaktionszyklen mit neuen Primern die Amplifikate der ersten PCR als Matrizen verwendet werden. Die Sensitivität erhöht sich dadurch um den Faktor 10^2 bis 10^3 (Abb. 3).

Die Primer der PCR wurden so ausgewählt, daß sie ein spezifisches Amplifikat ergaben und sicher die Punktmutation Asp816→Val an Position **nt 7176** im Exon 17 des c-kit-Genes überspannten.

Als äußere Primer für die konventionelle PCR wurden „c-kit S“ (5'-CAG CCA GAA ATA TCC TCC TTA CT-3') und „c-kit C“ (5'-CAT TAT GAA AGT CAC GGA AAC AAT-3') verwendet. Diese ergaben ein Amplifikat mit 191 bp Länge. Für die nested-PCR kamen die Primer „c-kit B“ (5'-TTG CAG GAC TGT CAA GCA GAG-3') und „c-kit U“ (5'-CAC AAA GAT TTG TGA TTT TGG TCT A-3') zum Einsatz. Hier ergab sich ein Amplifikat der Länge 105 bp.

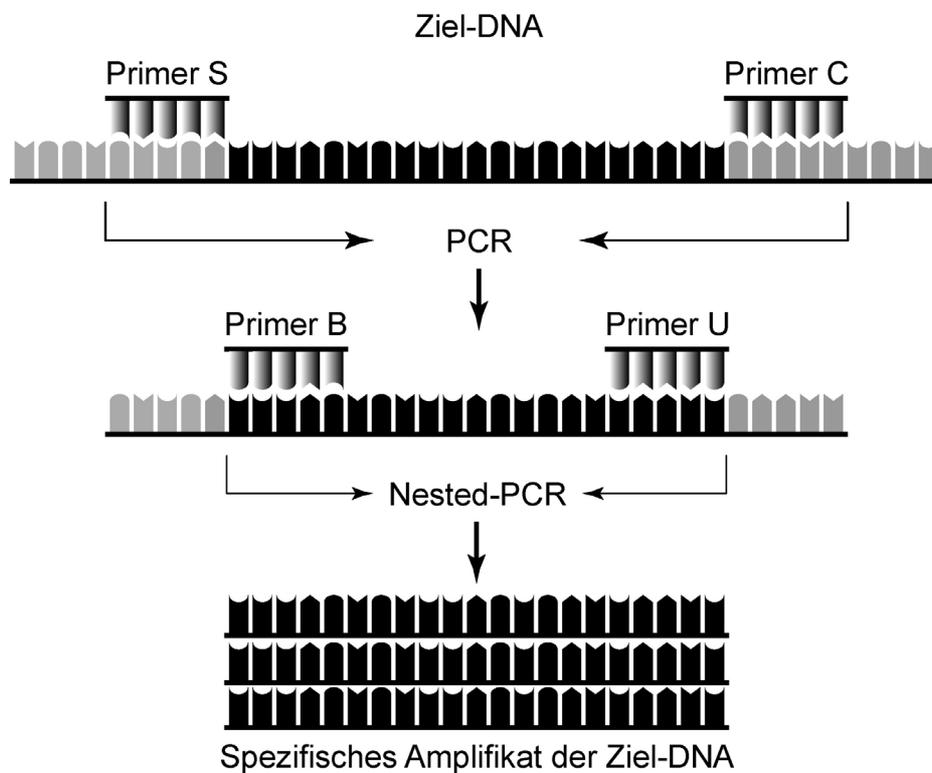


Abb. 3: Prinzip der nested-PCR: Die Primer S und C amplifizieren eine DNA-Sequenz, innerhalb derer die Primer der nested-PCR B und U liegen. Somit erhöht sich die Sensibilität des Amplifikationsverfahrens.

2.3.4.a PCR

Alle initialen PCR-Reaktionen wurden in einem Gesamtvolumen von 100 μ l durchgeführt. Den aus dem Proteinase K-Verdau resultierenden 48 μ l wurden 52 μ l PCR-Mix zugefügt. Dieser Mix enthielt den PCR-Puffer (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCL pH 8,3, 1,5 mM MgCl₂), die dNTPs (200 μ M jeder dNTP-Art), die hitzestabile DNA-Polymerase (1 U thermostabile DNA-Polymerase AmpliTaq-

Gold DNA polymerase; Perkin Elmer; Weiterstadt, Germany) und 15 mM der Primer c-kit S und c-kit B.

Die Amplifikation der DNA erfolgte in einem „Perkin Elmer Gene Amp 9700 thermocycler“ und wurde als hot-start-PCR prozessiert. Bei einer hot-start-PCR wird eine spezielle DNA-Polymerase durch zehninütiges Erhitzen auf 95°C aktiviert. Hierbei wird das inaktive Enzym durch chemische Konformationsänderung irreversibel in die aktive Form überführt. Dadurch wird verhindert, daß die DNA-Polymerase bereits bei Raumtemperatur, vor dem Start des PCR-Programms, im Thermocycler aktiviert wird. Die Amplifikation läuft damit in einem genau definierten Temperaturspektrum ab und eine Elongation der bei Raumtemperatur unspezifisch gebundenen Primer wird ausgeschlossen.

Das Programm der hot-start-PCR umfaßt 40 PCR-Zyklen, bestehend aus:

- 30 s Denaturierungsphase bei 94°C
- 30 s Hybridisierungsphase bei 56°C
- 45 s Elongationsphase bei 72°C

Dem ersten Zyklus ging eine zehninütige Denaturierungsphase bzw. Aktivierungsphase der DNA-Polymerase bei 94°C voraus. Dem letzten Zyklus folgte eine vierminütige Verlängerungsphase bei 72°C (Abb. 4).

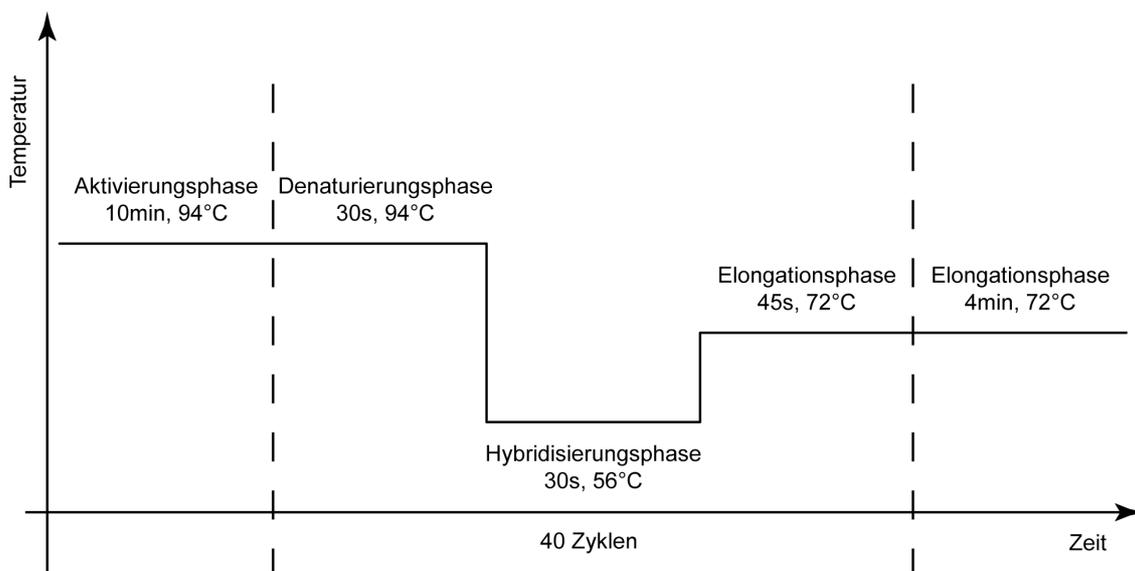


Abb.4: PCR-Programm des Thermocyclers

2.3.4.b Nested-PCR

Die nested-PCRs wurden einem „Light Cycler sequence detection system“ (ROCHE Molecular Systems, Mannheim, Germany) mit dem vom Hersteller empfohlenen „DNA Master Hybridization Probes kit“ prozessiert. Dem PCR-Ansatz für die nested-PCR wurden 2 µl des Amplifikationsergebnisses der ersten PCR zugesetzt. Der PCR-Mix für die nested-PCR bzw. den Mutationsnachweis enthielt Taq Polymerase, Light Cycler Hybridization 1 x reaction Puffer, dNTP Mischung (mit dUTP anstatt dTTP), 3 mmol/l Mg Cl₂, 5 pmol der Primer „c-kit U“ und „c-kit C“ und 6 pmol der Hybridisierungsproben „c-kit sensor“ und „c-kit anchor“. Die Proben wurden 45 Zyklen lang mit folgendem Programm amplifiziert: Der zehnssekündigen Denaturierungsphase bei 95°C folgten eine Hybridisierungsphase bei 56°C von 10 Sekunden Dauer und eine zehnssekündige Elongationsphase bei 72°C (Abb. 5)

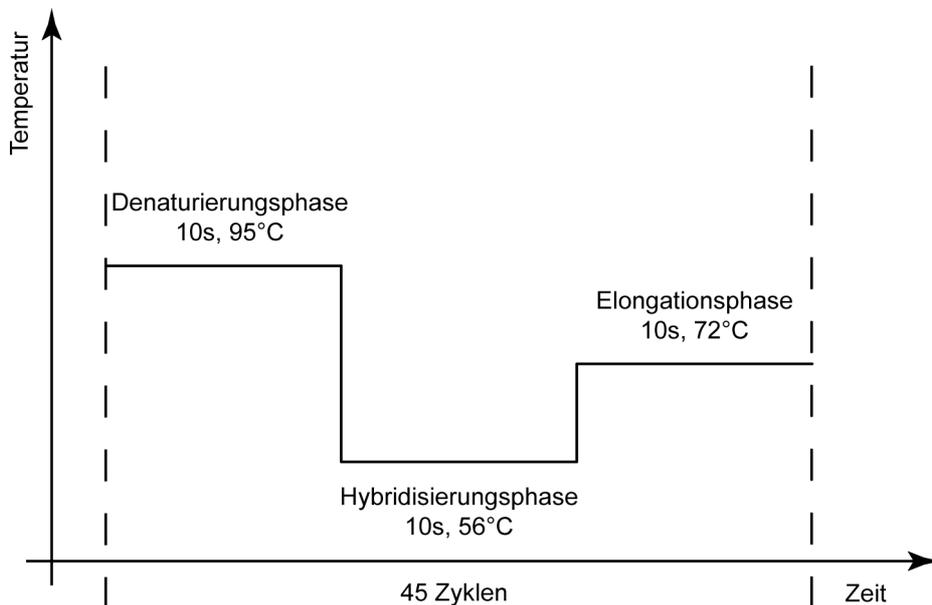


Abb. 5: Nested-PCR-Programm des Light Cyclers

2.3.4.c Mutationsnachweis

Dem ersten Zyklus ging eine zehnminütige Denaturierungsphase bei 95°C voraus, dem letzten Zyklus folgte eine fünfminütige Elongationsphase bei 56°C.

Die nested-PCR und der Mutationsnachweis wurden in einem Arbeitsschritt mit dem „LightCycler sequence detection system“ (ROCHE Molecular Systems, Mannheim, Germany) durchgeführt. Die Hybridisierungsproben bestanden aus zwei unterschiedlichen Oligonukleotiden, die eine komplementäre Basenstruktur eines Teils des c-kit-Genes aufwiesen. Die Hybridisierungsprobe „c-kit sensor“ (5'- AGC CAG AGA CAT CAA GAA TGA TTC TA-3') überspannt die Punktmutation des c-kit Gens an Position **nt 7176** und ist am 3'-Ende mit Fluoreszein konjugiert. Die andere Hybridisierungsprobe „c-kit anchor“ (5'-ATG TGG TTA AAG GAA ACG TGA GTA CCC A-3') ist am 5'-Ende mit Light Cycler-Red 640 verknüpft. Das Design beider Hybridisierungssonden wurde von der Firma TIB MOLBIOL (Berlin, Germany) entworfen. Durch Hybridisierung der beiden Sonden mit ihrer Zielsequenz gelangen die beiden mit den Sonden konjugierten Fluorophore in unmittelbare Nachbarschaft. Das vom Light Cycler emittierte Licht regt das Fluoreszein der „c-kit sensor“ Sonde an. Die vom Fluoreszein emittierte Energie wird jetzt auf das Fluorophor Light Cycler-Red 640 der Sonde c-kit „anchor“ transferiert. Von diesem wird das Licht mit einer bestimmten Wellenlänge (640 nm) emittiert und kontinuierlich von Photozellen des Light Cyclers gemessen. Bei optimaler Hybridisierungstemperatur sollte also ein Maximum an emittiertem Licht gemessen werden. Erhöht man nun die Temperatur, so kommt es zur Ablösung einer Sonde und somit zur räumlichen Entfernung der beiden Fluorophore, so daß sich die transferierte Energie und später das detektierte Licht vermindern (Abb. 6).

Die Schmelzpunktanalyse zur Mutationserkennung wird nach Abschluß des letzten PCR-Zykluses prozessiert. Hier geht eine Denaturierungsphase der Amplifikationsprodukte von fünf Minuten bei 95°C voraus, so daß sich die komplementären Stränge der DNA trennen und bei anschließender schneller Abkühlung des Reaktionsgemisches auf 40°C die Anlagerung der Hybridisierungssonden ermöglichen. Danach wird die Temperatur von 40°C in Tempera-

turschritten von 0,3°C/s bis zu einer Endtemperatur von 94°C erhöht und das emittierte Licht gemessen. Sobald der Schmelzpunkt der „c-kit sensor“ Sonde erreicht ist, löst sich diese von der Ziel-DNA ab, so daß der Energietransfer zwischen „sensor“ und „anchor“ Sonde unterbrochen wird und der Light Cycler insgesamt einen scharfen Energieabfall registriert. Die Software des Light Cyclers kalkuliert diesen temperaturabhängigen Energieabfall und stellt ihn in der Schmelzpunktkurve, bei der ein maximaler Energieabfall eintritt, als Gipfel („melting peak“) dar (Abb. 6).

Die Anwesenheit einer Punktmutation an der Stelle **nt 7176** verminderte die optimale Hybridisierungstemperatur mit der Probe „c-kit sensor“. Dies führte zu einer Verschiebung des Maximums der Schmelzpunktkurve über der Temperatur. Dadurch konnte sie von der zur Sonde exakt komplementären Wildtypsequenz unterschieden werden.

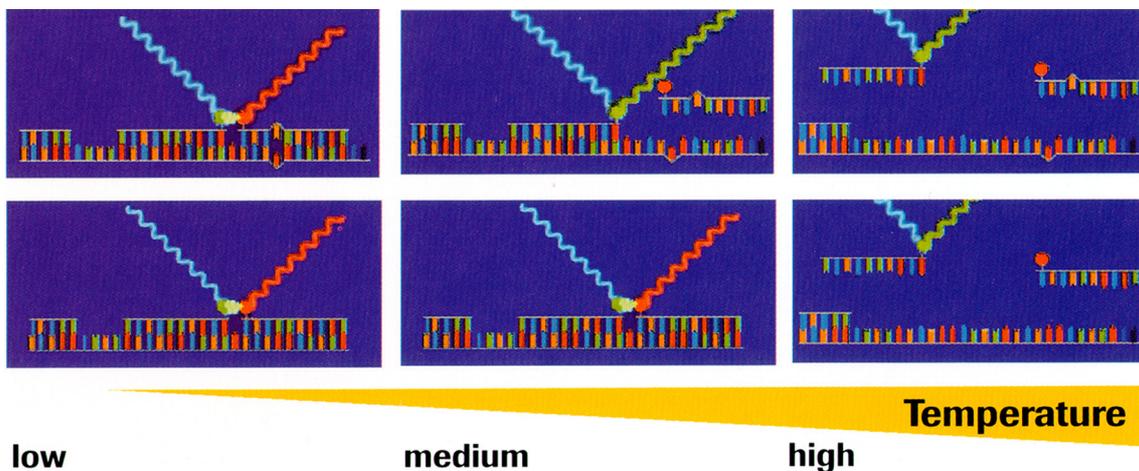


Abb. 6: Prinzip der Mutationsanalyse mittels Schmelzpunktkurven und Hybridisierungssonden. Die obere Bildreihe zeigt eine nicht exakt komplementäre DNA-Sequenz zur „c-kit-sensor“-Hybridisierungssonde, die untere einen komplementären Strang. Bei niedriger Temperatur wird die gleiche Energiemenge (rot) nach Anregung (blau) emittiert. Bei mittlerer Temperatur löst sich die nicht komplementäre Sonde ab, und die emittierte Energie wird reduziert (grün). Bei hoher Temperatur lösen sich alle Sonden ab, und die emittierte Energie ist gering (grün).

2.3.5 Sequenzierung der PCR-Produkte

Die Bestätigung der im Light Cycler gewonnenen Mutationsanalysen erfolgte mittels klassischer Sequenzierung. Diese sogenannte direkte Sequenzierung der PCR-Produkte wurde bei ausgewählten Produkten der nested-PCR-Reaktionen angewandt. Die auf ein 2% Agarosegel (in TAE-Puffer) aufgetragenen Reaktionsprodukte der nested-PCR wurden nach der Gelelektrophorese unter UV-Licht ausgewertet. Die spezifischen Amplifikationsbanden auf Höhe von 105 bp wurden unter UV-Licht-Kontrolle aus dem Gel geschnitten. Aus den so isolierten Gelstücken wurden die Amplifikationsprodukte mit dem Gelextraktionskit (Quiagen, Hilden, Germany), entsprechend der Herstellerempfehlung, aufgereinigt. Hierzu wurden die Gelstücke in ihrem dreifachen Volumen des mitgelieferten QG-Puffers 10 Minuten bei 50°C unter ständigem Rütteln aufgelöst. Anschließend wurde der pH-Wert auf 7,5 eingestellt und danach eine dem Gelstückvolumen entsprechende Menge Isopropanol zupipettiert. Die Proben wurden dann auf Austauschersäulen pipettiert und eine Minute zentrifugiert. Die DNA bleibt dabei an die Austauschersäulen gebunden. Die Säulen wurden anschließend mit PE-Puffer gewaschen, um die DNA von Gelbestandteilen und Verunreinigungen zu befreien. Anschließend wurde die DNA mit 20 µl destilliertem H₂O eluiert und unter Zentrifugation in einem neuen Eppendorfgefäß aufgenommen.

Die folgende Sequenzierung wurde mit dem Primer „c-kit C“ als Sequenzierungsprimer nach der Dye-Deoxy-Terminator Methode mit einem 377 ABI Prism Sequenzer (PE Applied Biosystems, CA, USA) durchgeführt.

3. Ergebnisse

3.1 Histologische und immunohistochemische Ergebnisse

Die Mastzellen der kompakten Infiltrate und die locker verstreuten Mastzellen im Knochenmark sowie die Mastzellinfiltrate in der Darmmukosa wurden mittels immunohistochemischer Markierung mit einem Antikörper gegen Mastzelltryptase hervorgehoben (Abb. 7-9, 11 und 12). Die leukämischen Zellen und die Epithelzellen zeigten dabei keine unspezifischen Färbereaktionen mit dem Antikörper.

Die leukämischen Knochenmarksinfiltrate der chronisch myeloischen Monozytenleukämie (CMML) wurden mit einem Antikörper gegen CD15 markiert (Abb. 10).

Diese spezifischen Markierungen dienen als Grundlage für die Identifikation der entsprechenden Zellen und deren selektiven Mikrodissektion.

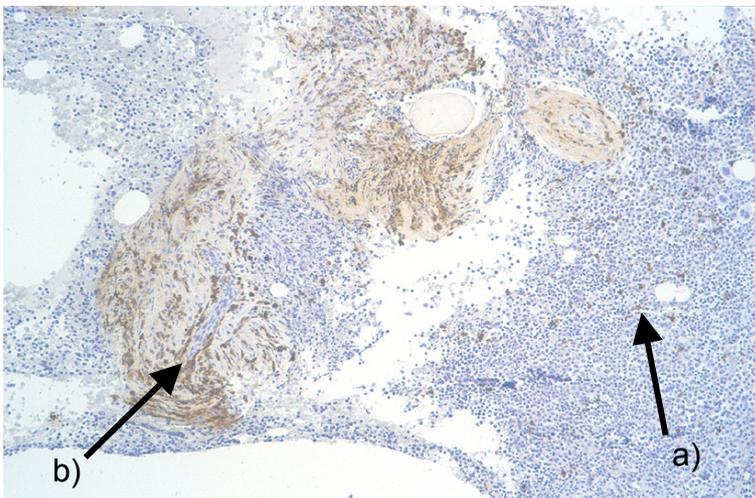


Abb. 7:
Die Übersichtsvergrößerung des Knochenmarks zeigt bei Tryptasefärbung locker verstreute Mastzellen (Pfeil a) und kompakte Mastzellinfiltrate (Pfeil b).

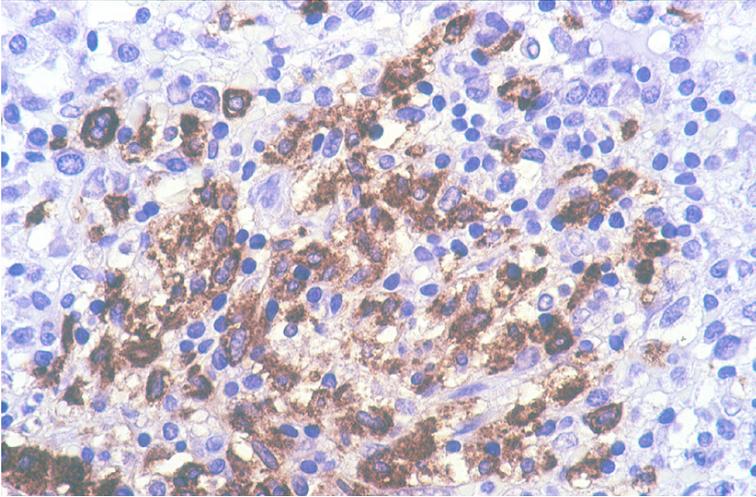


Abb. 8:
Ein kompaktes Mastzell-
infiltrat bei 400-facher
Vergrößerung des
Knochenmarks in der
Tryptasefärbung

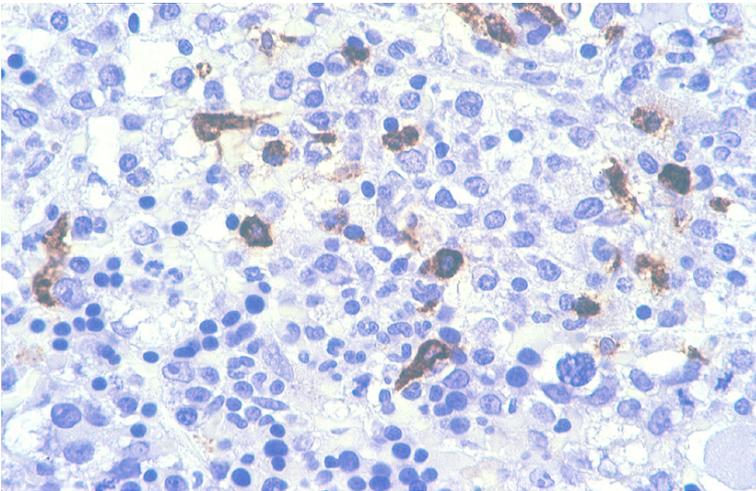


Abb. 9:
Locker verstreute Mast-
zellen im Knochenmark,
bei 400-facher Vergröße-
rung in der Tryptasefär-
bung

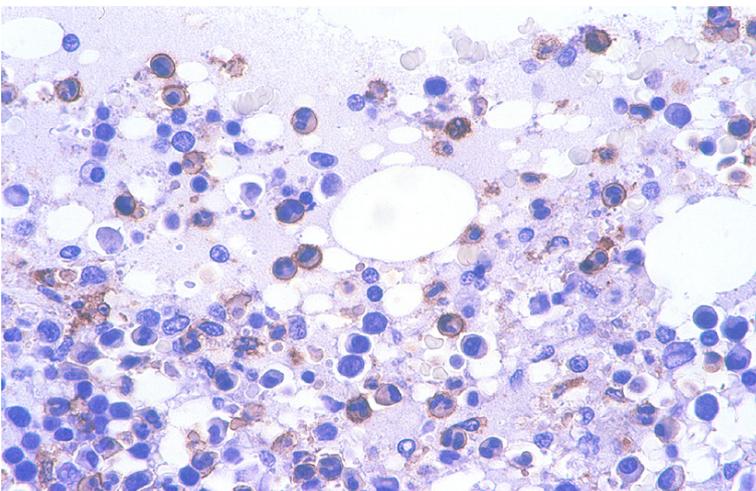


Abb. 10:
CD15 positive Zellen bei
400-facher Vergröße-
rung des Knochenmarks

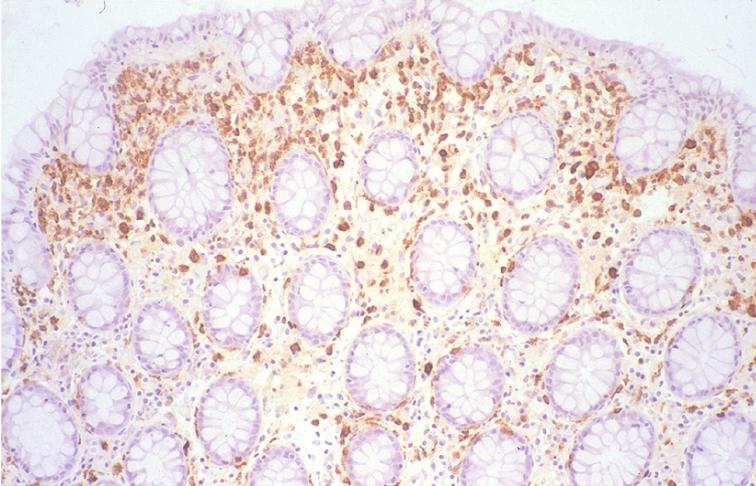


Abb. 11:
Eine Übersichtsvergrößerung des Kolons in der Tryptasefärbung zeigt die locker verstreuten Mastzellen.

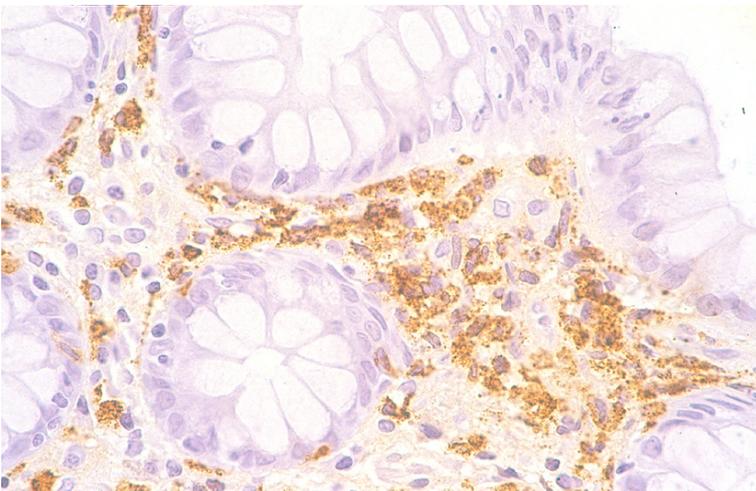


Abb. 12:
Die 400-fache Vergrößerung des Kolons in der Tryptasefärbung zeigt die gut gegen die Epithelien differenzierbaren locker verstreuten Mastzellen.

3.2 Mikrodissektion der Einzelzellen

Die Variabilität des Laserfokus ließ ein Katapultieren der Zellen in das Reaktionsgefäß auch ohne vorheriges Umschneiden der Zellen zu. Durch diese sehr präzise Art der Dissektion konnten die immunhistologisch spezifisch markierten Zellen sicher vom umliegenden Gewebe differenziert und abgegrenzt werden (Abb. 13-15). Es wurden insgesamt 128 Reaktionsgefäße mit jeweils 50 Zellen gesammelt. Aus dem Knochenmark von 1993 erhielt man somit 17 Eppendorf-Reaktionsgefäße mit Mastzellen aus kompakten Mastzellinfiltraten, 24 Reak-

tionsgefäße mit locker verstreuten Mastzellen und 13 Reaktionsgefäße mit CD15 positiven Zellen. Aus der Kolonbiopsie aus dem Jahre 1993 wurden 25 Reaktionsgefäße locker verstreuter Mastzellen und 10 Reaktionsgefäße mit Epithelzellen der kolomukosalen Krypten gewonnen. Aus der Knochenmarksprobe von 1997 wurden 10 Reaktionsgefäße mit Mastzellen aus kompakten Mastzellinfiltraten, 10 Reaktionsgefäße mit locker verstreuten Mastzellen und 2 Reaktionsgefäße mit CD15 positiven Zellen selektiert. Die Anzahl der Reaktionsgefäße, die für die drei untersuchten Zellarten aus den verschiedenen Biopsien gewonnen wurden, sind in Tabelle 3 angegeben.

Tab. 3: Mikrodissezierte Zellen

	Gewebe	Lokalisation	Anzahl Proben
1993	Knochenmark	Kompakte Mastzellinfiltrate	17
		Locker verstreute Mastzellen	24
		CD15 positive Zellen	30
	Kolon	Epithelzellen	10
		Locker verstreute Mastzellen	25
1997	Knochenmark	Kompakte Mastzellinfiltrate	10
		Locker verstreute Mastzellen	10
		CD15 positive Zellen	2

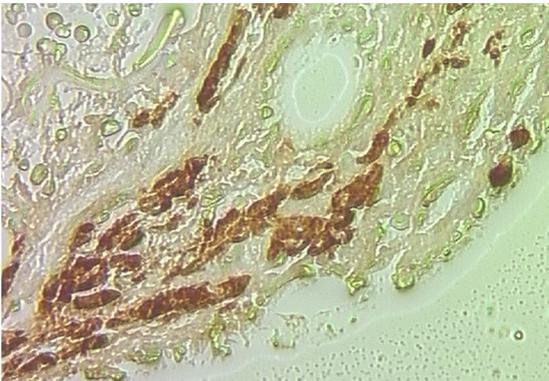


Abb. 13a: Knochenmark, 400-fach, Tryptase, vor Mikrodissektion

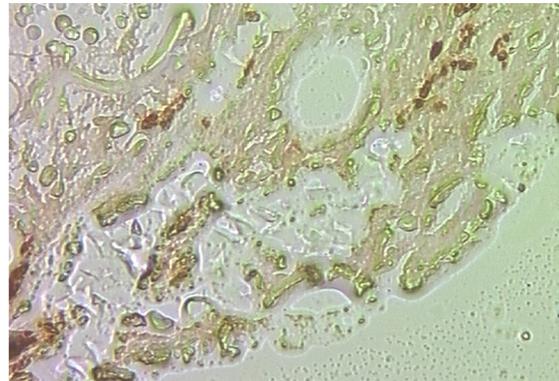


Abb. 13b: Knochenmark, 400-fach, Tryptase, nach Mikrodissektion

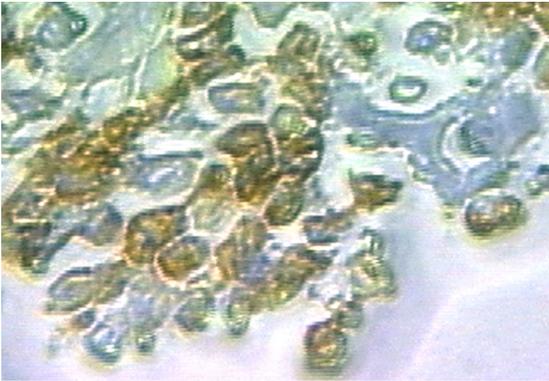


Abb. 14a: Knochenmark, 630-fach, CD15, vor Mikrodissektion

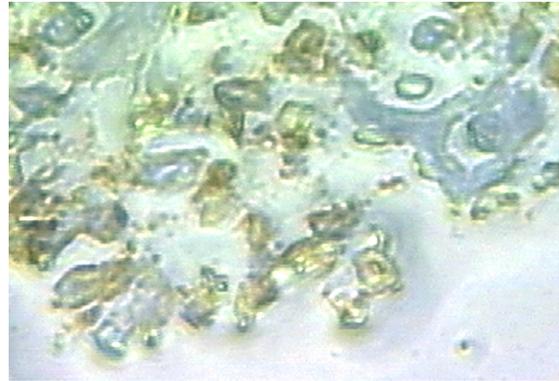


Abb. 14b: Knochenmark, 630-fach, CD15, nach Mikrodissektion

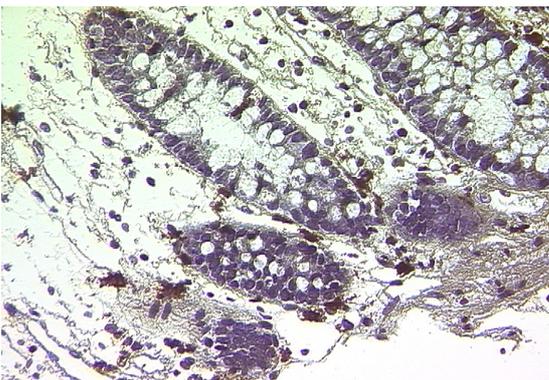


Abb. 15a: Kolon, 400-fach, Tryptase, vor Mikrodissektion

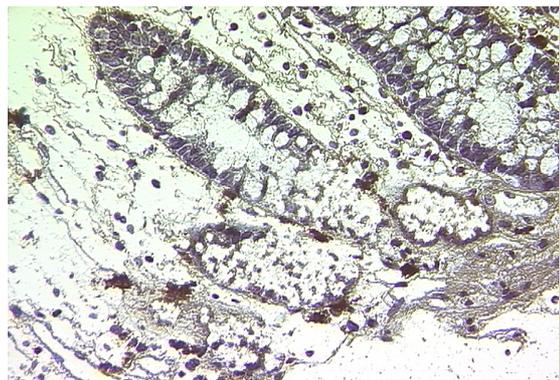


Abb. 15b: Kolon, 400-fach, Tryptase, nach Mikrodissektion

3.3 Nested PCR der c-kit DNA in mikrodisezierten Einzelzellen

Es wurden 128 PCR-Gefäße mit jeweils 50 Zellen auf die Anwesenheit der c-kit-Mutation Asp816→Val bei dem in der Kasuistik beschriebenen Patienten mit systemischer Mastozytose und assoziierter chronischer myelomonozytischer Leukämie untersucht. Insgesamt wurde nach konventioneller PCR und nested-PCR, dem in Abschnitt 2.3.4 a/b beschriebenen Protokoll folgend, in 50% der Reaktionsgefäße ein Amplifikationsprodukt erzeugt. Die Produkte der konventionellen PCR wurden grundsätzlich nicht auf ein Agarosegel aufgetragen, sondern jede Probe sofort in der nested-PCR prozessiert, da, wie Vorversuche zeigten, ein positives Ergebnis mittels konventioneller PCR nicht zu erwarten war.

Obwohl 50 Zellen pro Reaktionsgefäß gepoolt wurden, erhielt man auch nach nested-PCR-Amplifikation nicht aus jedem Gefäß ein Produkt. Wie aus Tabelle 4 zu entnehmen ist, reichte die Amplifikationsrate der aus den Knochenmarksstanzen bzw. den Kolonbiopsien mikrodisezierten Zellen (1993) von 37% (26 von 71 Reaktionsgefäßen; Biopsie 1993) bis hin zu 77% (17 von 22) bei den aus dem Knochenmark von 1997 mikrodisezierten Zellen.

Die aus dem von 1993 stammenden Knochenmark selektierten Mastzellen der kompakten Mastzellinfiltrate wurden in 29%, die locker verstreuten Mastzellen ebenfalls in 29% und die CD15 positiven Zellen in 43% der Reaktionsgefäße amplifiziert. Die Mastzellen sowie die Epithelzellen aus den Kolonbiopsien von 1993 wurden jeweils in 60% der Reaktionsgefäße amplifiziert.

Bei den Reaktionsgefäßen, die aus der Knochenmarksstanze von 1997 gewonnen wurden, stellte sich das Ergebnis wie folgt dar: Die Mastzellen aus den kompakten Mastzellinfiltraten erbrachten in 70%, die locker verstreuten Mastzellen in 90% und die CD15 positiven Zellen in 50% der Fälle ein Amplifikationsprodukt, welches weiter analysiert werden konnte.

In Abbildung 16 ist die Amplifikationsrate relativ zur Gesamtanzahl der mikrodisezierten Proben aufgetragen. Hier läßt sich erkennen, wie das Alter der DNA (bzw. der Biopsie) den Amplifikationserfolg beeinflusst. Beim Vergleich der Amplifikationsraten der Mastzellen aus den Jahren 1993 und 1997 zeigte sich

eine erfolgreiche Amplifikation der Proben von 1993 in jeweils 29% bzw. der von 1997 in 70% und 90%. Die CD15 positiven Zellen erlauben wegen zu geringer Anzahl der Proben keine Aussage über die Amplifikationsrate.

In allen mitprozessierten Negativkontrollen wurde kein Amplifikationsprodukt erzeugt.

Tab. 4: Produkte nach PCR und nested-PCR

	Gewebe	Lokalisation	Produkte/Proben (%)	
1993	Knochenmark	Kompakte Mastzellinfiltrate	5 / 17	(29%)
		Locker verstreute Mastzellen	7 / 24	(29%)
		CD15 positive Zellen	13 / 30	(43%)
	Kolon	Epithelzellen	6 / 10	(60%)
		Locker verstreute Mastzellen	15 / 25	(60%)
1997	Knochenmark	Kompakte Mastzellinfiltrate	7 / 10	(70%)
		Locker verstreute Mastzellen	9 / 10	(90%)
		CD15 positive Zellen	1 / 2	(50%)

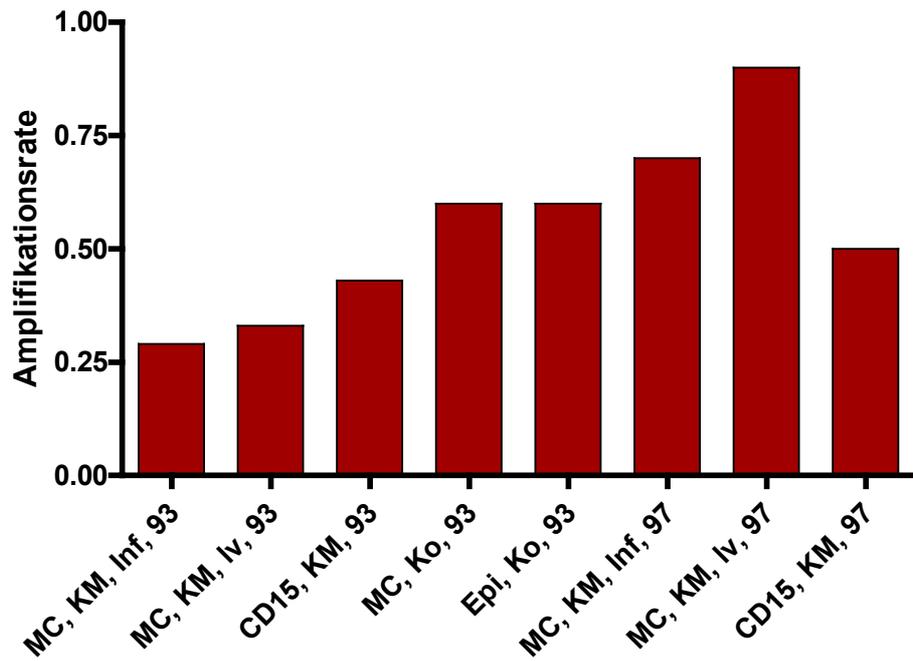


Abb. 16: Die Abbildung zeigt die Amplifikationsrate der mikrodisezierten Proben.
 (MC = Mastzelle, CD15 = CD15 positive Zellen, Epi = Epithelien, KM = Knochenmark, Ko = Kolon, Iv = locker verstreute Zellen, Inf = Infiltrate. 93/97 = 1993/1997)

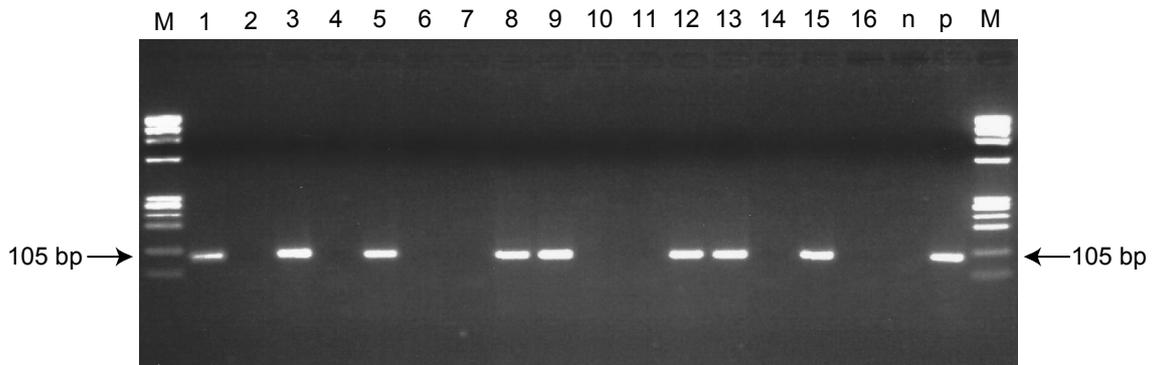


Abb. 17: Die Abbildung zeigt die auf ein Agarosegel aufgetragenen nested-PCR Produkte.
 (M = Marker ϕ x174, 1 - 4 Mastzellen aus Knochenmark, 5 - 8 = Mastzellen aus Kolon, 9 - 12 CD15 positive Zellen, 13 - 16 Kolonepithelien)

3.4. Mutationsnachweis

3.4.1 *Light Cycler Mutationsnachweis mittels Schmelzpunktanalyse der HMC-1 Zellen*

Die Bestimmung der wildtyp- und mutationsspezifischen Schmelzpunkte der für diesen Assay entworfenen Hybridisierungssonden „c-kit sensor“ und „c-kit anchor“ erfolgte an DNA der HMC-1 Zelllinie, welche die c-kit Mutation Asp816→Val heterozygot trägt. Als Negativkontrolle diente DNA, welche aus humaner Plazenta extrahiert wurde. HMC-1 DNA und Plazenta DNA wurden jeweils mit den nested-PCR-Primern „c-kit B“ und „c-kit U“ amplifiziert und anschließend mittels Schmelzpunktanalyse untersucht. Für die Plazenta DNA zeigte sich dabei nur ein definierter Peak bei einer somit für die c-kit-Wildtypsequenz spezifischen Schmelztemperatur von 64°C (Abb. 18).

Die Schmelzpunktanalyse der amplifizierten HMC-1 DNA durch die Light Cycler Software erbrachte einen Doppelpeak. Dabei lag einer der Peaks bei 64°C und entsprach somit erwartungsgemäß der für die Wildtyp-c-kit-Sequenz an Plazenta DNA emittierten spezifischen Schmelztemperatur. Der zweite Peak lag um ca. 3°C tiefer bei 61°C und entsprach somit dem spezifischen Schmelzpunkt für die c-kit Mutation Asp816→Val. Das Vorkommen der A→T Transition an Position **nt 7176** des c-kit Gens (Codon 816) führte somit zu einer Verringerung der Schmelztemperatur der Hybridisierungssonden c-kit sensor um 3°C. Die aus dieser Punktmutation resultierende Verschiebung der Schmelzkurven ist in der grafischen Darstellung durch die Light Cycler Software eindeutig zu identifizieren und ließ sich in wiederholten Experimenten spezifisch reproduzieren.

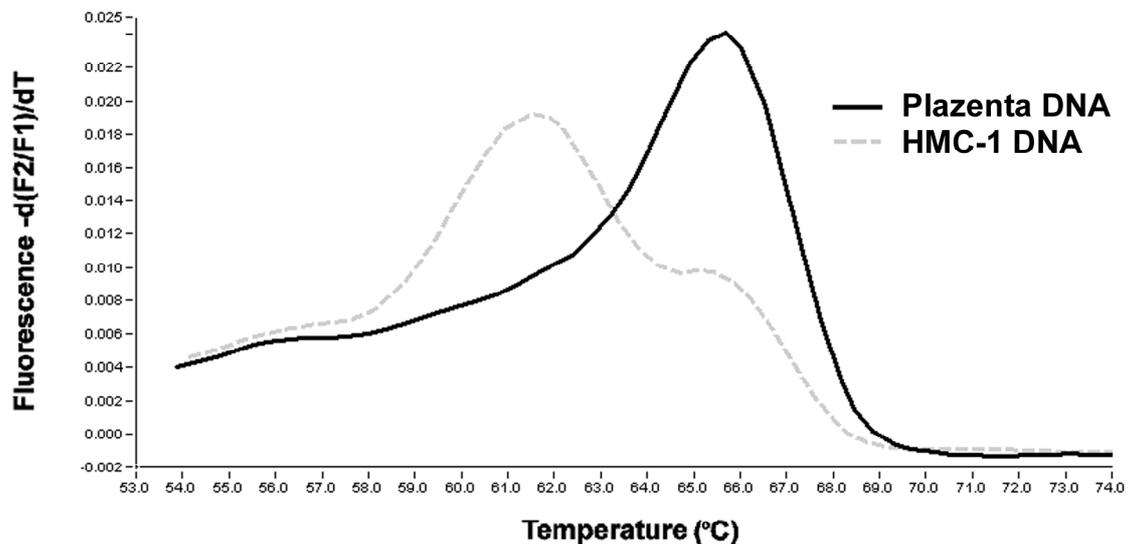


Abb. 18: Die Abbildung zeigt die zwei Schmelzkurven der Plazenta DNA und der HMC-1 DNA. Die Plazenta DNA Kurve bildet ein Maximum gemäß der Wildtypsequenz ab. Die HMC-1 DNA zeigt eine doppelgipfelige Kurve, entsprechend der heterozygoten Sequenz (Wildtyp und Mutation).

3.4.2 *Light Cycler Schmelzpunktanalysen der Gewebeproben zum Mutationsnachweis*

Bei Untersuchung der aus dem Knochenmark bzw. den Kolonbiopsien mikrodissezierten Mastzellen stellte sich in der Schmelzpunktanalyse analog zur Schmelzpunktkurve der HMC-1 DNA ein Doppelpeak dar. Ein Peak lag bei 64°C, entsprechend der Wildtypsequenz, und ein um ca. 3°C niedriger Peak lag bei 61°C, entsprechend der c-kit-Mutation Asp-816→Val. Die heterozygoten Sequenzen liefern somit eine zweigipfelige Kurve mit Maxima bei 64°C und 61°C, vergleichbar mit denen der HMC-1 Zellen. Auch hier sorgt die A→T Transition an Position **nt 7176** des c-kit-Gens (Codon 816) für die Verringerung der Schmelztemperatur um ca. 3°C (Abbildung 19).

Bei der c-kit Mutation ist die Affinität der Hybridisierungsprobe „c-kit sensor“ mit der entsprechenden Zielsequenz geringer, d.h., es ist weniger Energie nötig,

um die bestehenden Wasserstoffbrücken zu trennen, und die Sonden lösen sich schon bei niedrigerer Temperatur ab. Durch die räumliche Entfernung der Sonden wird somit auch weniger Licht emittiert.

Anhand der Schmelzpunktanalyse konnte die heterozygote Mutation im Knochenmark von 1993 sowohl in den Mastzellen der kompakten Mastzellinfiltrate in zwei von fünf Amplifikationsprodukten als auch in vier von sieben Produkten der locker verstreuten Infiltrate detektiert werden. Eine Präsenz der c-kit-Mutation war auch in vier von 13 Amplifikationsprodukten aus CD15 positiven Zellen festzustellen.

In den Mastzellen der Kolonbiopsie von 1993 wurde die Mutation Asp816→Val in fünf von 15 Amplifikationsprodukten gefunden. Im Gegensatz dazu war bei der Analyse der Epithelien der Darmmukosa die Mutation Asp816→Val nicht nachweisbar. Im Knochenmark von 1997 manifestierte sich die Mutation bei den Mastzellen aus kompakten Mastzellinfiltraten in einer von sieben, bei den locker verstreuten in vier von neun Amplifikationsprodukten und bei den CD15 positiven Zellen in einem Amplifikationsprodukt (Tabelle 5, Abbildung 20).

Tab. 5: Mikrodisezierte Zellen und Amplifikationsergebnisse

	Gewebe	Lokalisation	Anzahl	Ampl	Mutation
1993	KM	MC, kompakte Infiltrate	17	5	2
		MC, locker verstreut	24	7	4
		CD15 ⁺ Zellen	30	13	4
	Kolon	MC	25	15	5
		Epithelzellen	10	6	0
1997	KM	MC, kompakte Infiltrate	10	7	1
		MC, locker verstreut	10	9	4
		CD15 ⁺ Zellen	2	1	1

MC = Mastzellen, KM = Knochenmark

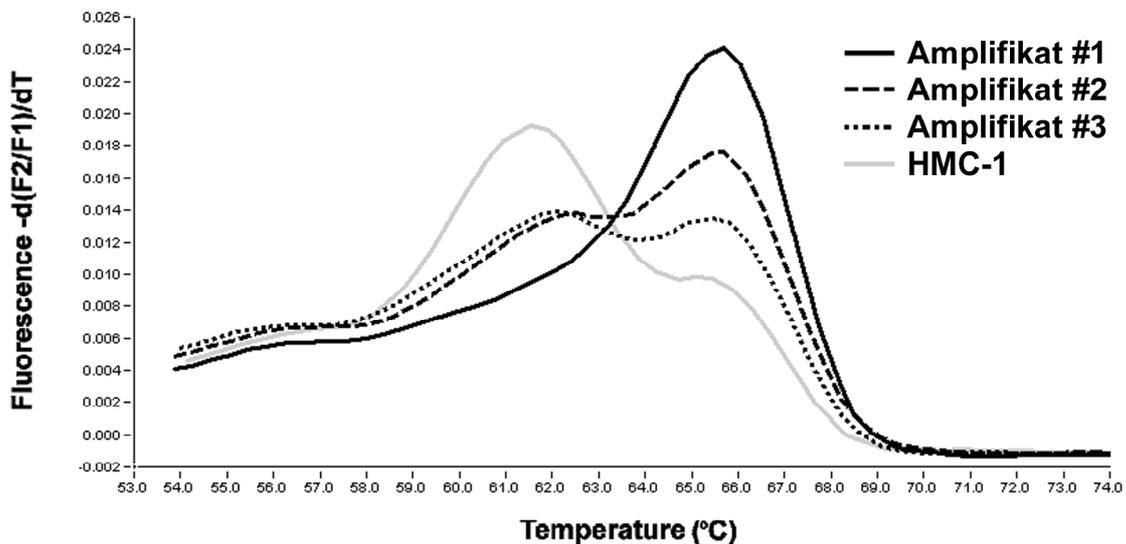


Abb. 19: Die Abbildung zeigt die Schmelzpunktkurven von drei verschiedenen Amplifikaten und der HMC-1 DNA. Amplifikat 1 zeigt eine homozygote Wildtypsequenz. Die Amplifikate 2 und 3 zeigen doppelgipfelige Kurven der heterozygoten Sequenz.

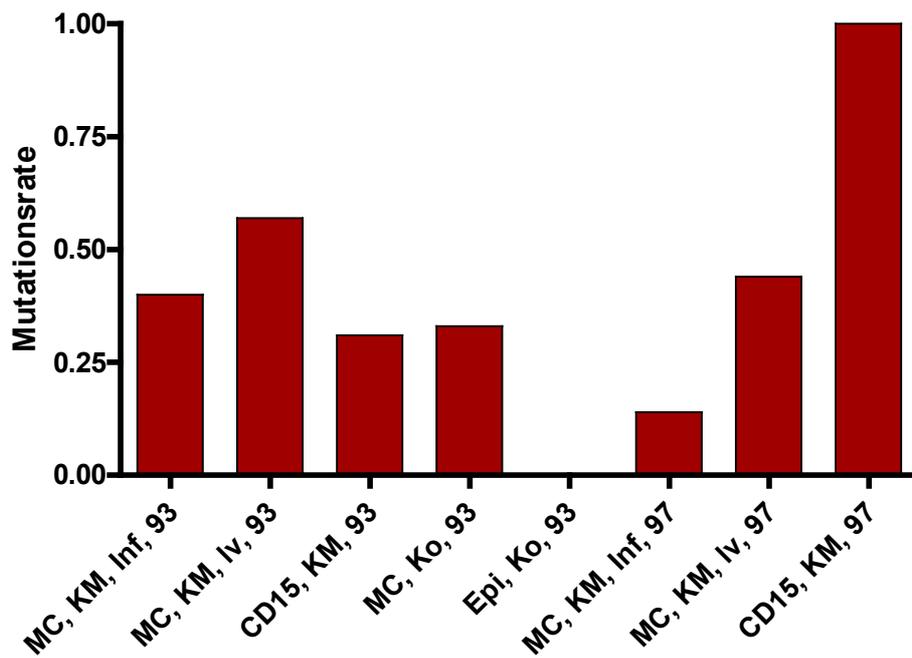


Abb. 20: Die Abbildung zeigt den relativen Anteil der Mutationen an den erhaltenen Amplifikaten.
 (MC = Mastzelle, CD15 = CD15 positive Zellen, Epi = Epithelien, KM = Knochenmark, Ko = Kolon, Iv = locker verstreute Zellen, Inf = Infiltrate. 93/97 = 1993/1997)

3.5 Direkte Sequenzierung der Light Cycler nested-PCR-Produkte

Die Ergebnisse der Light Cycler Schmelzpunktanalyse wurden durch 16 zufällig gewählte Proben der Light Cycler Produkte in direkter Sequenzierung überprüft. In jedem sequenzierten Fall wurde eine Übereinstimmung der Ergebnisse zwischen Schmelzpunktanalyse und Sequenzierung nachgewiesen.

Die Punktmutation, entsprechend einem Basenaustausch von Adenin zu Thyminid an **nt 7176**, wird durch die unterschiedlichen Primärsequenzen nachgewiesen. Die in Abbildung 21 dargestellten Sequenzierungen zeigen die differierten Sequenzen. Die linke Abbildung stellt den Wildtyp mit Adenin an **nt 7176** dar. Die rechte Abbildung zeigt die mutierte, heterozygote Sequenz mit einem Doppelpeak an **nt 7176**. Dieser Doppelpeak entspricht den beiden Basen Adenin und Thyminid.

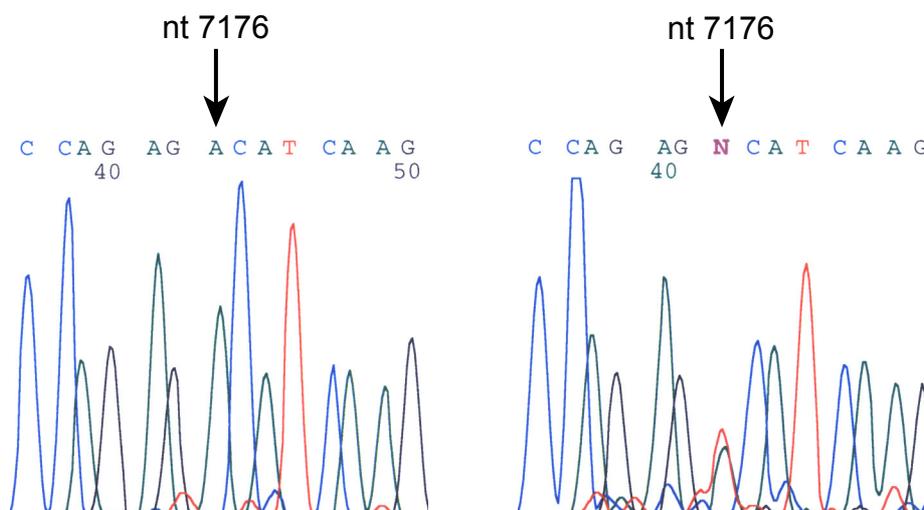


Abb. 21: Die Abbildungen zeigen die Sequenzierung der nested-PCR Produkte. Die linke Abbildung stellt die Wildtypsequenz mit der Folge Adenin an **nt 7176** dar. Die rechte Abbildung zeigt die heterozygote Mutationssequenz mit einem Doppelpeak an der Mutationsstelle, entsprechend den Basen Adenin und Thyminid.

4. Diskussion

4.1 Diskussion der Methoden

4.1.1 Dissektion der Zellen

Das „Laser pressure catapulting“ hat gegenüber der konventionellen Mikrodissektion diverse Vorteile. Die Gewinnung von 50 Zellen ließ sich sicherstellen, ohne dem PCR-Ansatz zusätzlich Kontaminationsmaterial beizumengen, da die Methode des „Laser pressure catapulting“ ohne ein Puffermedium auskommt. Eine etablierte Alternative zur Gewinnung von Zellen oder Gewebsverbänden aus histologischen Schnitten ist die Glaskapillarenmikrodissektion. Bei der Glaskapillarenmikrodissektion muß der histologische Schnitt mit Puffer überschichtet werden, um das Arbeiten mit den Glaskapillaren zu ermöglichen. Dieses Puffermedium stellt ein Kontaminationsrisiko dar, da frei flottierende Zellen unabsichtlich dem Reaktionsansatz zugemischt werden können. Eine andere Methode zur Selektion von verschiedenen Zelltypen ist die Durchflußzytometrie. Die Methode eignet sich zur Zellanalyse und Zellsortierung. Allerdings müssen die Zellen für die Messung in Suspension gebracht werden. Dies erlaubt aber keine Zuordnung der selektierten Zellen zu spezifischen Gewebsarealen.

Darüber hinaus ist das „Laser pressure catapulting“ eine sehr effektive Methode der Mikrodissektion. Da hier ein computergestütztes, exaktes Umschneiden der Zellen und ein einfaches Katapultieren möglich ist, lassen sich in einem Bruchteil der Zeit, verglichen mit der Glaskapillarenmikrodissektion, die benötigten Untersuchungsmaterialien sammeln.

Diese Voraussetzungen ermöglichten ein kontaminierungsfreies und zügiges Arbeiten und verhinderten die Kontamination der PCR-Ansätze durch eingeschleppte Fremd-DNA bei der Mikrodissektion.

4.1.2 *Amplifikation der DNA*

Die Methoden dieser Arbeit wurden so angelegt, daß die Amplifikation von DNA der fixierten Zellen möglichst sensitiv durchgeführt werden konnte.

Auf eine für die Fragestellung dieser Arbeit wünschenswerte Einzelzell-PCR wurde bewußt verzichtet. Bekanntlich führt die an dem hier ja retrospektiv untersuchten Biopsiematerial routinemäßig durchgeführte Vorbehandlung, bestehend aus Formalinfixierung, EDTA-Entkalkung und Paraffineinbettung, zu einer deutlichen Degradation der in dem Gewebe enthaltenen Nukleinsäuren, wodurch die Sensitivität einer an diesem Material durchgeführten PCR erheblich leidet.

Aus diesem Grunde wurden die spezifisch mittels Immunhistologie markierten Zellen zwar einzeln aus dem Gewebeverband disseziiert bzw. katapultiert, anschließend aber zu einer Gesamtzahl von 50 Zellen pro Reaktionsgefäß gepoolt.

Die Amplifikationsausbeute der Proben von 1997 war durchschnittlich ca. 50% höher als die der Proben von 1993, was vermutlich auf das geringere Alter zurückzuführen ist (Roehrl et al., 1997). Ein weiterer Grund für diesen Sensitivitätsunterschied ist, daß Proben von 1993 nicht mit pH-gepuffertem Formalin fixiert wurden. Dies führt zu einer zusätzlichen Denaturierung von Zell-DNA und somit auch zu weniger amplifizierbarem Ausgangsmaterial für die PCR.

Aus den oben genannten Gründen mußten extrem sensitive Methoden zur Amplifikation eingesetzt werden. Es wurde deshalb nicht nur eine konventionelle PCR, sondern zusätzlich eine nested-PCR durchgeführt. Für die eingesetzten Primer ließ sich dadurch experimentell eine Steigerung der Sensitivität um den Faktor 10^2 bis 10^3 erzielen. Dies wurde in Vorversuchen an einer Verdünnungsreihe mit verschiedenen DNA-Konzentrationen ausgetestet.

Die Light Cycler PCR hat einen weiteren Vorteil. Sie vereint die DNA-Amplifikation mit der Mutationsanalyse mittels Schmelzpunktkurve in einem Arbeitsschritt. In einem PCR- bzw. Analysenansatz werden diese Arbeitsschritte ohne zusätzliche Manipulation bzw. Reagenzienzugabe nacheinander prozessiert. Bisher wurde der Nachweis der c-kit Mutation Asp816→Val durch drei Ar-

beitsschritte erreicht. Zuerst wurden die Proben mittels PCR und ggf. nested-PCR amplifiziert, dann mittels Restriktionsverdau an spezifischen Stellen in DNA-Fragmente geschnitten. Diese Fragmente ergaben im dritten Arbeitsschritt, einer Polyacrylamidgelelektrophorese, spezifische Bandenmuster unter UV-Beleuchtung, wodurch eine Aussage über das Vorhandensein der Mutation getroffen werden konnte. Alternativ können die Sequenzen der Amplifikate aus der nested-PCR auch über eine direkte Sequenzierung gewonnen werden. Diese Methoden zum Mutationsnachweis sind allerdings äußerst zeitaufwendig. Beim Mutationsnachweis mittels Light Cycler Hybridisierungssonde hingegen erfolgt die Bestimmung der Schmelzpunktkurven direkt im Anschluß an die nested-PCR und dauert nur ca. 15 Minuten. Des Weiteren können die einzelnen Zykluszeiten des PCR-Programms, im Gegensatz zu herkömmlichen Thermocyclern, um den Faktor 3 reduziert werden, jedoch lassen sich die Amplifikate eines Light Cyclers aufgrund der geringen Reaktionsvolumina und Reaktionssubstanzen schlechter weiterbearbeiten, weshalb die erste PCR auf einem gängigem Thermocycler prozessiert wurde.

Zusammenfassend ist zu sagen, daß die Analyse mittels Light Cycler PCR eines der sensitivsten, spezifischsten und schnellsten Verfahren zum Mutationsnachweis ist.

4.2 Diskussion der Ergebnisse

Die aktuelle Klassifikation der Mastozytosen, die auf der Working Conference 2000 in Wien erstellt wurde, enthält eine Kategorie der „Systemischen Mastozytose mit assoziierter hämatologischer Erkrankung“ (Valent et al., 2001). Bei diesem sehr interessanten Subtyp einer systemischen Mastozytose ist bisher nur sehr wenig über die molekularen und pathobiologischen Ursachen der assoziierten Entstehung der beiden hämatopoetischen Neoplasien bekannt. Zwei Studien beschäftigten sich mit der Frage, ob die c-kit Punktmutation Asp816→Val im Falle einer systemischen Mastozytose mit assoziierter hämatologischer Erkrankung in beiden hämatologischen Malignomen vorhanden ist (Nagata et al., 1995, Sperr et al., 1998). Die assoziierten hämatologischen Neoplasien (chronisch myeloische Monozytenleukämie und akute myeloische Leukämie) wurden untersucht und lieferten widersprüchliche Ergebnisse. Nagata et al. konnte die c-kit Mutation in peripheren mononukleären Blutzellen beider Neoplasien, der systemischen Mastozytose sowie der chronisch myeloischen Monozytenleukämie nachweisen (Nagata et al., 1995). Sperr et al. hingegen detektierte die Mutation ausschließlich in Mastzellen von Knochenmarksaspiraten und nicht in den leukämischen Blasten der assoziierten akuten myeloischen Leukämie (Sperr et al., 1998). Diese differenten Ergebnisse waren wahrscheinlich auf die unterschiedlichen Leukämieformen und die methodischen Unterschiede in beiden Arbeiten zurückzuführen.

Einige Vorläuferstudien ließen die Vermutung zu, daß zumindest einigen Untergruppen der Mastozytosen ein klonaler, neoplastischer Pathomechanismus zugrunde liegt (Galli, 1993, Longley et al., 1996, Kröber et al., 1997). In einer dieser vorausgehenden Studien wurden mikrodissezierte Infiltrate von Mastzellen und CD15 positiven Zellen im Knochenmark auf das Vorhandensein der c-kit-Mutation ASP816→Val untersucht (Sotlar et al., 2000). In dieser Studie wurden mittels Glaskapillaren ganze Infiltrate umschnitten und in ein PCR-Gefäß überführt. Hier zeigte sich, daß die c-kit-Mutation sowohl in den Mastzellinfiltraten als auch in den leukämischen Infiltraten vorhanden war. Da methodisch bedingt allerdings nur heterogene Zellareale und keine selektiven Zelltypen unter-

sucht wurden, konnte ein Vermischen von verschiedenen Zelltypen, vor allem in leukämischen Infiltraten, nicht ausgeschlossen werden.

Um nun die verschiedenen Zelltypen genauer auf das Vorhandensein der Mutation Asp816→Val untersuchen zu können, wurden in dieser Arbeit Einzelzellen aus Knochenmarksstanzen und Kolonmukosabiopsien der beschriebenen Kasuistik untersucht. Im speziellen wurden sowohl Infiltrate als auch locker verstreute Mastzellen, Leukämiezellen der chronisch myeloischen Monozytenleukämie im Knochenmark und darüber hinaus Kolonepithelien in Kolonbiopsaten als separate Populationen untersucht. Hierbei sollten auch die verschiedenen Mastzellpopulationen, d.h., die Mastzellen der kompakten Infiltrate, die locker verstreuten Mastzellen im Knochenmark und die Mastzellen im Kolon, bezüglich der Mutation differenziert werden. Um eine Aussage darüber treffen zu können, ob es sich bei der Mutation Asp816→Val in diesem Falle um eine somatische oder eine Keimzellmutation handelt, wurden die kolomukosalen Kryptenepithelien mit untersucht.

Die Ergebnisse zeigen nun eindeutig, daß die c-kit Punktmutation Asp816→Val nicht nur in Mastzellen der locker verstreuten Mastzellareale und den Mastzellinfiltraten nachzuweisen war, sondern auch in den Mastzellen der Kolonmukosa. Die Mutation Asp816→Val ist somit in allen untersuchten Mastzellpopulationen nachweisbar. Dieser Befund läßt darauf schließen, daß die erhöhte Zahl von Mastzellen in zwei verschiedenen Organen (medullär und extramedullär) des Patienten auf einer klonalen Proliferation aus einer gemeinsamen Vorläuferzelle basiert. In Anbetracht dessen ist zu erwähnen, daß die kompakten Mastzellinfiltrate, die ein Diagnosekriterium der systemischen Mastozytose darstellen (Valent et al., 2001), ausschließlich im Knochenmark und nicht in der Kolonmukosa nachgewiesen werden konnten, jedoch alle pathologisch vermehrten Mastzellpopulationen klonalen und nicht reaktiven Ursprungs sind.

Zusätzlich wurde die c-kit Punktmutation Asp816→Val in den CD15 positiven leukämischen Zellen der Knochenmarksbiopsien von 1993 und 1997 detektiert. CD15 wird ausschließlich auf myelomonozytären Zellen exprimiert und wurde noch nie auf Mastzellen nachgewiesen, so daß von einer immunhistochemischen Spezifität ausgegangen werden kann (Baghestanian et al., 1996).

Die Mutation konnte sowohl in heterozygoter als auch in homozygoter Form nachgewiesen werden. Prinzipiell kann man eine heterozygote Allelfrequenz voraussetzen, da eine homozygote Punktmutation am selben DNA-Abschnitt äußerst unwahrscheinlich ist (Nagata et al., 1995). Das Vorliegen einer Homozygotie bezüglich der Punktmutation Asp816→Val kann auf diverse Ursachen zurückzuführen sein.

Ein Grund könnte ein Artefakt bei der PCR-Amplifikation sein. Wird zu Beginn verhältnismäßig viel DNA der Mutationssequenz amplifiziert, führt dies zu einer exponentiell vermehrten DNA-Amplifikation der Mutationssequenz (Worobec et al., 1998). Eine weitere Möglichkeit ist der Verlust der Heterozygotie (LOH = „Loss of heterocycosity“) bezüglich der Punktmutation Asp816→Val. Hier „verlieren“ die Zellen das Allel mit der Wildtypsequenz, so daß nur noch das mutierte Allel im Genom verbleibt. Diese Art von Genomveränderung wird z.B. bei Malignomen gefunden, deren Entstehung auf einem Verlust eines Tumorsuppressorgens beruht.

Die Präsenz der c-kit Punktmutation Asp816→Val in den mikrodissezierten Mastzellen und den leukämischen Zellen, wie im vorliegenden Fall, legt einen ursprünglich monoklonalen Prozeß und eine Koevolution der systemischen Mastozytose und der chronisch myeloischen Monozytenleukämie aus einer gemeinsamen Progenitorzelle nahe. Diese Ergebnisse sind mit den Veröffentlichungen über den Nachweis der Punktmutation in Blut- und Knochenmark-leukozyten (inklusive myeloischer Zellen, B-Zellen und T-Zellen) bei Patienten mit systemischer Mastozytose konkordant (Alfonja et al., 1998, Akin et al., 2000).

Auch in dieser Studie konnte die c-kit Punktmutation Asp-816→Val nicht in Epithelzellen, d.h., in Zellen außerhalb des hämatopoetischen Systems, nachgewiesen werden. Somit konnte weder in diesem noch im Fall einer aggressiven systemischen Mastozytose die Punktmutation außerhalb der hämatopoetischen Systeme detektiert werden (Longley et al., 1996).

Zusammenfassend belegen die im Rahmen dieser Studie erhobenen Befunde noch einmal, daß es sich bei der c-kit Mutation Asp816→Val um eine somatische Mutation und keine Keimbahnmutation handelt und daß zumindest im vor-

liegenden Fall einer systemischen Mastozytose mit assoziierter hämatologischer Erkrankung beide Neoplasien einen gemeinsamen Progenitor besitzen. Ob dies ein generelles Phänomen bei den systemischen Mastozytosen mit assoziierter hämatologischer Erkrankung ist und ob sich dieser gemeinsame Progenitor, etwa auf Ebene der CD34 positiven hämatopoetischen Vorläuferzelle, identifizieren läßt, wird zur Zeit in weiteren Studien untersucht.

5. Zusammenfassung

Mastozytosen sind eine heterogene Gruppe von Erkrankungen, die sich als benigne Hauterkrankungen bis hin zu höchst aggressiven malignen Neoplasien manifestieren können. Ein wichtiger Regulator der Zellproliferation und möglicherweise auch mitbestimmend in der Pathogenese der Mastozytosen ist der Tyrosinkinase-Rezeptor KIT. In seiner kodierenden Sequenz sind bestimmte Mutationen beschrieben, die zu einer ligandenunabhängigen Steigerung der Aktivität der Tyrosinkinase KIT führen können, darunter insbesondere die Punktmutation c-kit Asp816→Val. Eine Untergruppe der Mastozytosen stellen die systemischen Mastozytosen mit assoziierter hämatologischer Erkrankung dar. Die c-kit Mutation Asp816→Val wurde bisher in neoplastischen Mastzellen bei Patienten mit systemischer Mastozytose gefunden.

Um zu überprüfen, ob diese Mutation auch in der assoziierten hämatologischen Erkrankung zu detektieren ist, wurden in dieser Arbeit mikrodissizierte Einzelzellen verschiedener Zelltypen eines Patienten mit systemischer Mastozytose und begleitender chronischer myelomonozytärer Leukämie auf das Vorhandensein der Mutation Asp816→Val im c-kit Gen untersucht. Hierfür wurden die Zellen mittels Laserpressurecatapulting mikrodissiziert und die DNA mit einer Thermocycler-PCR und einer Light Cycler nested-PCR amplifiziert und anschließend eine Mutationsanalyse mittels Light Cycler Schmelzpunktanalyse durchgeführt.

Die Mutation war sowohl in den Mastzellinfiltraten, den locker verstreuten Mastzellen des Knochenmarks, den locker verstreuten Mastzellen des Kolons sowie in den CD15 positiven leukämischen Zellen der assoziierten Leukämie nachweisbar, jedoch nicht in den mukosalen Kolonepithelien.

Diese Ergebnisse lassen im vorliegenden Fall auf einen monoklonalen Ursprung der systemischen Mastzytose und der chronischen myelomonozytären Leukämie schließen.

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Abbildung verändert nach Scheijen und Griffin (2002)	S. 10
Abb. 2:	Schematischer Aufbau des PALM "Robot Micro Beam" Systems nach PALM	S. 18
Abb. 3:	Prinzip der nested-PCR	S. 21
Abb. 4:	PCR-Programm des Thermocyclers	S. 22
Abb. 5:	Nested-PCR-Programm des Light Cyclers	S. 23
Abb. 6:	Prinzip der Mutationsanalyse mittels Schmelzpunktkurven und Hybridisierungssonden	S. 25
Abb. 7:	Knochenmark, Übersichtsvergrößerung, Tryptase	S. 27
Abb. 8:	Knochenmark, 400fach, Tryptase, kompaktes Infiltrat von Mastzellen	S. 28
Abb. 9:	Knochenmark, 400fach, Tryptase, locker verstreute Mastzellen	S. 28
Abb. 10:	Knochenmark, 400fach, CD15 positiv	S. 28
Abb. 11:	Kolon, Übersichtsvergrößerung, Tryptase, locker verstreute Mastzellen	S. 29
Abb. 12:	Kolon, 400fach, Tryptase, locker verstreute Mastzellen	S. 29
Abb. 13a:	Knochenmark, 400fach, Tryptase, vor Mikrodissektion	S. 31
Abb. 13b:	Knochenmark, 400fach, Tryptase, nach Mikrodissektion	S. 31
Abb. 14a:	Knochenmark, 630fach, CD15, vor Mikrodissektion	S. 31
Abb. 14b:	Knochenmark, 630fach, CD15, nach Mikrodissektion	S. 31
Abb. 15a:	Kolon, 400fach, Tryptase, vor Mikrodissektion	S. 31
Abb. 15b:	Kolon, 400fach, Tryptase, nach Mikrodissektion	S. 31
Abb. 16:	Amplifikationsrate der mikrodissezierten Zellen	S. 34
Abb. 17:	Die Abbildung zeigt die auf ein Agarosegel aufgetragenen nested-PCR Produkte.	S. 34
Abb. 18:	Die Abbildung zeigt die zwei Schmelzpunktkurven der Plazenta DNA und der HMC-1 DNA.	S. 36
Abb. 19:	Die Abbildung zeigt die Schmelzpunktkurven von drei verschiedenen Amplifikaten und der HMC-1 DNA.	S. 38
Abb. 20:	Mutationsrate der nested-PCR Produkte	S. 39
Abb. 21:	Sequenzierung der nested-PCR Produkte	S. 40

Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Oberflächenantigene von Mastzellen und Basophilen	S. 3
Tab. 2:	Klassifikation der Mastozytosen nach der "Year 2000 Working Conference on Mastocytosis"	S. 6
Tab. 3:	Mikrodissezierte Zellen	S. 30
Tab. 4:	Produkte nach PCR und nested-PCR	S. 33
Tab. 5:	Mikrodissezierte Zellen und Amplifikationsergebnisse	S. 38

Literaturverzeichnis

Akin, C., Kirshenbaum, AS., Semere, T., Worobec, AS., Scott, LM., Metcalfe, DD. (2000) Analysis of the surface expression of c-kit and occurrence of the c-kit Asp816Val activating mutation in T cells, B cells und myelomonocytic cells in patients with mastocytosis. *Exp. Hematol.* 28 140-147

Alfonja, O., Amrososi, E., Ashman, L., Takeshita, K. (1998) Multilineage involvement and erythropoietin-“independent” erythroid progenitor cells in a patient with systemic mastocytosis. *Ann. Hematol.* 77(4) 183-186

Ashman, LK., Camcareiri, AC., To, LB., Levinsky, RJ., Juttner, CA. (1991) Expression of the YB5.B8 antigen (c-kit protooncogen product) in normal human bone marrow. *Blood* 78(1) 30-37

Baghestanian, M., Blankl, H., Sillaber, C., Beil, WJ., Radaszkiewicz, T., Funder, W., Preiser, J., Vesly, M., Schernthaner, G., Lechner, K., Valent, P. (1996) A case of malignant mastocytosis with circulation mast cell precursors: biologic and phenotypic characterization of the malignant clone. *Leukemia* 19(1) 159-166

Beghini, A., Peterlongo, P., Ripamonti, CB., Larizza, L., Cairoli, R., Morra, E., Mecucci, C. (2000) C-kit mutations in core binding factor leukemias. *Blood* 95 726-727

Brunning, RD., McKenna, RW., Rosai, J., Parkin, JL., Risdall, R. (1983) Systemic mastocytosis. Extracutaneous manifestations. *Am. J. Surg. Pathol.* 7(5) 425-438

Caplan, R.M. (1963) The natural course of urticaria pigmentosa: analysis and follow up of 112 cases. *Arch. Dermatol.* 87 146-157

Ehrlich, P. (1879) Beiträge zur Kenntnis der granulierten Bindegewebszellen und der eosinophilen Leukozyten. *Arch. Anat. Physiol.* 3 166-169

Ellis, J.M. (1949) Urticaria pigmentosa: A report of a case with autopsy. *AMA Arch. Pathol.* 49 426-429

Fleischman, RA., Saltman, DL., Stastny, V., Zneimer, S. (1991) Deletion of the c-kit protooncogene in the human developmental defect piebald trait. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88(23) 10885-10889

Furitsu, T., Tsujimura, T., Tono, T., Ikeda, H., Kitayama, H., Koshimizu, U., Sugahara, H., Butterfield, JH., Ashman, LK., Kanayama, Y. et al. (1993) Identification of mutations in coding sequence of the proto-oncogen c-kit in a human mast cell leukemia cell line causing ligand independent activation of c-kit product. *J. Clin. Invest.* 92(4) 1736-1744

Galli, S.J. (1993) New concepts about the mast cell. *N. Engl. J. Med.* 328(4) 257-265

Giebel, LB., Spritz, RA. (1991) Mutation of the KIT (mast/stem cell growth factor receptor) protooncogene in human piebaldism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88(19) 8696-8699

Horan, RF. (1991) Systemic mastocytosis: retrospective review of a decade's clinical experience at the Birham and Women's Hospital. *J. Invest. Dermatol.* 96 5-13

Horny, HP., Parwaresch, MR., Lennert, K. (1985) Bone marrow findings in systemic mastocytosis. *Hum. Pathol.* 16 808-814;

Horny, HP., Ruck, M., Wehrmann, M., Kaiserling, E. (1990) Blood findings in generalized mastocytosis: evidence of frequent simultaneous occurrence of myeloproliferative disorders. *Br. J. Haematol.* 76 186-193

Horny, HP., Sillaber, C., Menke, D., Kaiserling, E., Wehrmann, M., Stehberger, B., Chott, A., Lechner, K., Lennert, K., Valent, P. (1998) Diagnostic value of immunostaining for tryptase in patients with mastocytosis. *Am. J. Surg. Pathol.* 22(9) 1132-1140.

Horny, HP., Valent, P. (2001) Diagnosis of mastocytosis: general histopathological aspects, morphological criteria and immunohistochemical findings. *Leuk. Res.* 25 543-551

Irani, AM., Nilsson, G., Miettinen, U., Craig, SS., Ashman, LK., Ishizaka, T., Zsebo, KM., Schwartz, LB. (1992) Recombinant human stem cell factor stimulates differentiation of human mast cells from dispersed fetal liver call. *Blood* 80 3006-3016

Ishizaka, K., Ishizaka, T. (1969) The immun mechanisms of reversed type reagenic hypersensitivity. *J. Immunol. USA* 103(3) 588-593

Jorpes, JE. (1939). Heparin: Its chemistry, physiology and application in medicine. London, Oxford university press H. Milford

Kitamura, Y., Go, S., Hatanaka, S. (1978) Decrease of mast cells in W / Wv mice and their increase by bone marrow transplantation. *Blood* 52 447-452

Kitayama, H., Kanakura, Y., Furitsu, T., Tsujimura, T., Oritani, K., Ikeda, H., Sugahara, H., Mitsui, H., Kanayama, Y., Kitamura, Y., et al. (1995) Constitutively activating mutations of c-kit receptor tyrosine kinase confer factor-independent growth and tumorigenicity of factor-dependent hematopoietic cell lines. *Blood* 85(3) 790-798

Kröber, SM., Horny, HP., Ruck, P., Kämmerer, U., Geiselhart, A., Handgrettinger, R., Griesser, H., Menke, DM., Kaiserling, E. (1997) Mastocytosis reactive or neoplastic? *J. Clin. Pathol.* 50(6) 525-527

Lawrence, JB., Friedman, BS., Travis, WD., Chinchilli, VM., Metcalfe, DD., Gralnick, HR. (1991) Hematologic manifestation of systemic mast cell disease: a prospective study of laboratory and morphologic features and their relation to prognosis. *Am. J. Med.* 91 612-624

Lennert, K., Parwaresch, MR. (1979) Mast cell and mast cell neoplasia: a review. *Histopathology* 3 349-356;

Longley, BJ., Metcalfe, DD., Tharp, M., Wang, X., Tyrell, L., Lu, SZ., Heitjan, D., Ma, Y. (1999) Activating and dominant inactivating c-KIT catalytic domain mutations in distinct clinical forms of human mastocytosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96(4) 1609-1614

Longley, BJ., Tyrrell, L., Lu, SZ., Ma, YS., Langley, K., Ding, TG., Duffy, T., Jacobs, P., Tang, LH., Modlin, I. (1996) Somatic c-kit activating mutation in urticaria pigmentosa and aggressive mastocytosis: establishment of clonality in human mast cell neoplasm. *Nat. Genet.* 12 312-314

Manova, K., Nocka, K., Besmer, P., Bachvarova, RF. (1990) Gonadal expression of c-kit encoded at the W locus of the mouse. *Development* 110(4) 1057-1069

May, Y., Cunningham, ME., Wang, X., Ghosh, I., Regan, L., Longley, NJ. (1999) Inhibition of spontaneous receptor phosphorylation by residues in a putative alpha-helix in the KIT intracellular juxtamembrane region. *J. Biol. Chem.* 274(19) 13399 - 13402

Mitsui, H., Furitsu, T., Dvorak, AM., Irani, AM., Schwartz, LB., Inagaki, N., Takei, M., Ishizaka, K., Zsebo, KM., Gillis, S., Ishizaka, T. (1993) Development of human mast cells from umbilical cord blood cells by recombinant human and murine c-kit ligand. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90(2) 735-739

Nagata, H., Worobec, AS., Oh, CK., Chowdhury, BA., Tannenbaum, S., Suzuki, Y., Metcalfe, DD. (1995) Identification of a point mutation in the catalytic domain of the protooncogene c-kit in peripheral blood mononuclear cells of patients who have mastocytosis with an associated hematological disorder. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92 10560-10564

Nakata, Y., Akiro, K., Katosh, O., Kawaishi, K., Hyodo, H., Abe, K., Kuramoto, A., Satow, Y. (1995) C-kit point mutation of extracellular domain in patients with myeloproliferative disorders. *Br. J. Haematol.* 91 661-663

Nettleship, E., Tay, WM. (1869) Rare forms of Urticaria. *Br. Med. J.* 2 323-330

Ning, ZQ., Li, J., Arceci, RJ. (2001) Signal transducer and activator of transcription 3 activation is required for Asp(816) mutant c-kit-mediated cytokine-independent survival and proliferation in human leukemia cells. *Blood* 97(11) 3559-3567.

Ogawa, M., Matsuzaki, Y., Nishikawa, S., Hayashi, S., Kunisada, T., Sudo, T., Kina, T., Nakauchi, H., Nishikawa, S. (1991) Expression and function of c-kit in hemopoietic progenitor cells. *J. Exp. Med.* 174(1) 63-71

Orr-Urtreger, UA., Avivi, A., Zimmer, Y., Givol, D., Yarden, Y., Lonai, P. (1990) Developmental expression of c-kit, a proto-oncogene encoded by the W locus. *Development* 109(4) 911-923

Papayannopoulou, T., Brice, M., Broudy, VC., Zsebo, KM. (1991) Isolation of c-kit receptor-expressing cells from bone marrow, peripheral blood and fetal liver: functional properties and composite antigenic profile. *Blood* 78(6) 1403-1412

Parwaresch, MR., Horny, HP. (1985) Tissue mast cells in health and disease. *Path. Res. Pract.* 179 439-461

Pawson, T. (1995) Protein-tyrosine kinases. Getting down to specifics. *Nature* 373(6514) 477-478

Qui, F., Ray, P., Brown, K., Barker, PE., Jhanwar, S., Ruddle, FH., 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; *EMBO J.* 7 1003-1011

Reisbach, G., Bartke, I., Kempkes, B., Kostka, G., Ellwart, J., Birner, A., Thalmeier, K., Mailhammer, R., Bornkamm, GW., Ullrich, A. (1993) Characterization of hematopoietic cell populations from human cord blood expressing c-kit. *Exp. Hematol.* 21(1) 74-79

Riley, JF. (1953) The relationship of the tissue mast cells to the blood vessels in the rat. *J. Pathol. Bacteriol.* 65 461-469

Roehrl, MH., Becker, KF., Becker, I., Höfler, H. (1997) Efficiency of single-cell polymerase chain reaction from stained histologic slides and integrity of DNA in archival tissue. *Diagn. Mol. Pathol.* 6(5) 292-297

Scheijen, B., Griffin JD. (2002) Tyrosine kinase oncogenes in normal hematopoiesis and hematological disease, *Oncogene* 21 3313-3333

Schütze, K., Lahr G. (1999) Use of laser technology for microdissection and isolation; *Am. Biotechol. Lab.* 3 98-104

Schütze, K., Lahr, G. (1998) Identification of expressed genes by laser-mediated manipulation of single cells. *Nat. Biotechnol.* 16(8) 737-742

Sillaber, C., Strobl, H., Bevec, D., Ashman, LK., Butterfield, JH., Lechner, K., Maurer, D., Bettelheim, P., Valent, P. (1991) IL-4 regulates c-kit proto-oncogen product expression in human mast and myeloid progenitor cells. *J. Immunol.* 147(12) 4224-4228

Sotlar K, Marafioti, T, Griesser, H., Theil, J., Aepinus, C., Jaussi, R., Stein, H., Valent, P., Horny, HP. (2000) Detection of c-kit mutation Asp 816 to Val in microdissected bone marrow infiltrates in a case of systemic mastocytosis associated with chronic myelomonocytic leukemia. *Mol. Pathol.* 53(4) 188-193

Sperr, WR., Walchshofer, S., Horny, HP., Födinger, M., Simonitsch, I., Fritsche, PR., Schwarzingler, I., Tschachler, E., Sillaber, C., Hagen, W., Geissler, K., Chott, A., Lechner, K., Valent, P. (1998) Systemic mastocytosis associated with acute myeloid leukemia: report of two cases and detection of the c-kit mutation Asp-816 to Val. *Br. J. Haemtol.* 103(3) 740-749

Stein, DH. (1986) Mastocytosis: a review. *Pediatr. Dermatol.* 3 365-375

Travis, WD., Li, CY., Yam, LT., Bergstrahl, EJ., Swee, RG. (1988) Significance of systemic mast cell disease with associated hematologic disorders. *Cancer* 62 965-972

Travis, WD., Li, CY., Hogaland, HC., Travis, LB., Banks, PM. (1986) Mast cell leukemia: Report of a case review of literature. *Mayo. Clin. Proc.* 61 957-966

Valent, P., Horny, HP., Escribano, L., Longley, BJ., Li, CY., Schwartz, LB., Marone, G., Nuñez, R., Akin, C., Sotlar, K., Sperr, WR., Wolff, K., Brunning, RD., Parwaresch, RM., Austen, KF., Lennert, K., Metcalfe, DD., Vardiman, JW., Bennet, JM. (2001) Diagnostic criteria and classification of mastocytosis: a consensus proposal. *Leuk. Res.* 25 603-625

Valent, P., Spanblochl, E., Sperr, WR., Sillaber, C., Zsebo, KM., Agis, H., Strobl, H., Geissler, K., Bettelheim, P., Lechner, K. (1992) Induction of differentiation of human mast cells from bone marrow and peripheral blood mononuclear cells by recombinant human stem cell factor/c-kit ligand in long term culture. *Blood* 80(9) 2237-2245

Worobec, AS., Semere, T., Nagata, H., Metcalfe, DD. (1998) Clinical correlates of the presence of the Asp816→Val c-kit mutation in the peripheral blood mononuclear cells of patients with mastocytosis. *Cancer* 83(10) 2120-2129

Yarden, Y., Kuang, WJ., Yang-Feng, T., Coussens, L., Munemitsu, S., Dull, TJ., Chen, E., Schlessinger, J., Francke, U., Ulrich, A. (1987) Human proto-oncogen c-kit: a new cell surface tyrosine kinase for an unidentified ligand. *EMBO J.* 6(11) 3341-3351

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Claudius Hubert Fridrich
Geburtsdatum: 18.03.1977
Geburtsort: Stuttgart - Bad Cannstatt
Eltern: Dr. med. Archibald Fridrich
Dipl. - Übers. Margot Fridrich geb. Grimminger

Schulbildung:

1983 -1987 Berthold-Auerbach-Grundschule Horb-Nordstetten
1987 -1996 Martin-Gerbert-Gymnasium Horb a. N.
25.06.1996 Abschluß mit allgemeiner Hochschulreife

Zivildienst:

01.07.1996-30.07.1997 Zivildienst im Robert-Bosch-Krankenhaus Stuttgart

Hochschulbildung:

15.10. 1997 Immatrikulation zum Wintersemester 1997/1998 für Humanmedizin
02.09.1999 Ärztliche Vorprüfung
14.12.1999 Annahme zur Promotion
22.03.2001 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
04.04.2003 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
28.04.2003-28.03.2004 Praktisches Jahr im Robert-Bosch-Krankenhaus Stuttgart
04.05.2004 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung