

Untersuchungen zur Pathogenese des systemischen Mastzellüberaktivitätssyndroms  
und dessen Auswirkungen auf die Herzfunktion

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Hohen Medizinischen Fakultät  
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität  
Bonn

Ulrich Walter Kolck  
aus Meppen/Ems

2009

Angefertigt mit Genehmigung der  
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Apl. Prof. Dr. med. G. J. Molderings
2. Gutachter: Prof. Dr. med. J. Oldenburg

Tag der Mündlichen Prüfung: 21.08.2009

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie  
des Universitätsklinikums Bonn  
Direktor: Prof. Dr. med. A. Pfeifer

Meinen Töchtern Friederike und Charlotte, meiner Frau Ute und meinen Eltern in Dankbarkeit  
gewidmet



## Inhaltsverzeichnis

	Seite
Abkürzungsverzeichnis	6
1. Einleitung	7
1.1. Hintergrund der vorliegenden Untersuchung	7
1.2. Zielsetzung	10
2. Material und Methoden	13
2.1. Mutationsanalyse	13
2.1.1 Auswahlkriterien für den Einschluss von Patienten und gesunden Probanden in die Untersuchung	13
2.1.2. Isolierung von Mastzellprogenitorzellen aus dem peripheren venösen Blut	14
2.1.3. mRNA Extraktion und Detektion von Alterationen in c-kit Transskripten	16
2.1.4. Kardiale Untersuchungstechniken	16
2.1.5. Statistische Analyse	17
3. Ergebnisse	20
3.1. Analyse der c-kit Transskripte in humanen Mastzellprogenitorzellen aus dem peripheren venösen Blut	20
3.1.1. Charakteristika der Probandengruppen	20
3.1.2. Ergebnisse der Mastzellisolierung	23
3.1.3. Ergebnisse der Mutationsanalyse	23
3.2. Kardiale Befunde bei Patienten mit systemischem Mastzellüberaktivitätssyndrom	30
4. Diskussion	36
4.1. Analyse der c-kit Transskripte in humanen Mastzellprogenitorzellen aus dem peripheren venösen Blut	36
4.2. Kardiale Befunde bei Patienten mit systemischem Mastzellüberaktivitätssyndrom	42
4.3. Bedeutung der Untersuchungsergebnisse für die klinische Praxis	45
5. Zusammenfassung	47
6. Anhang	48
7. Literaturverzeichnis	58
8. Danksagung	70
9. Lebenslauf	71
10. Publikationen, die aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit hervorgegangen sind	74

## Abkürzungsverzeichnis

ACE	Angiotensin converting enzyme
AT1	Angiotensin 1
BSA	Bovine serum albumine
cDNA	Copy-Desoxyribonukleinsäure
CD117	Tyrosinkinase Kit Antigen
EDTA	Ethylendinitrolontetraessigsäure
EKG	Elektrokardiographie
GIST	Gastro-intestinale Stromatumore
GNNK	Aminosäuresequenz (Glycin-Asparagin-Asparagin-Lysin)
HMC1	Human mast cell leukemia cell line 1
JAK2	Januskinase 2
mAb	Mouse antibody
MACS	Magnetic activated cell sorting
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
PBS	Physiological buffer solution
PCR	Polymerase chain reaction
PDGFR $\alpha$	Platelet-derived growth factor receptor $\alpha$
PW-Doppler	Pulse-wave doppler
RASGRP4	RAS ( <u>r</u> at <u>s</u> arcoma) Guanyl-Releasing Protein 4
RNA	Ribonukleinsäure
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
SCF	Stem cell factor
Src-Kinasen	Src ( <u>s</u> arcoma) Kinasen
TDI	Tissue doppler imaging

## **Einleitung**

### **1.1. Hintergrund der vorliegenden Untersuchung**

Mastzellen wurden erstmals von Ehrlich als granuläre Zellen beschrieben, die mit einem basischen Farbstoff metachromatisch angefärbt werden können (Ehrlich 1879). Aus der Vorstellung heraus, dass die Granula von den Zellen phagozytiert worden wären, benannte Ehrlich die Zellen mit dem Begriff *Mastzellen*. Später wurde klar, dass die Granula Mediatoren enthalten, die in der Mastzelle selbst gebildet und nach Aktivierung der Zelle freigesetzt werden können.

Mastzellen entwickeln sich im Knochenmark aus pluripotenten Stammzellen und gelangen als unreife Vorstufen in die Gewebe und Organe des Organismus. Dort reifen sie in Abhängigkeit von gewebespezifischen Faktoren aus. Entgegen der ursprünglichen Ansicht sind Mastzellen nicht ausschließlich für die Vermittlung allergischer Reaktionen verantwortlich, sondern sie stellen zentrale Schaltstellen des Immunsystems dar (Theoharides 1996, Henz et al. 2001, Crivellato et al. 2004). Entsprechend lang ist inzwischen die Liste der Erkrankungen, für die eine Beteiligung von Mastzellen in der Pathogenese gesichert ist (z.B. atopische Dermatitis und Asthma bronchiale) oder vermutet wird (z.B. Fibromyalgie und rheumatoide Arthritis; Übersicht in Tabelle 1, Seite 11). Die bevorzugte Lokalisation von Mastzellen in der unmittelbaren Nähe von Gefäßen und Nerven (McKay und Bienenstock 1994, Theoharides 1996, Park et al. 2003, Barbara et al. 2004, Crivellato et al. 2004, Silver et al. 2004) befähigt sie besonders zur Kommunikation mit dem peripheren und enterischen Nervensystem. Alle Gewebe, besonders jene, über die der Organismus direkt mit der Außenwelt in Kontakt steht (Haut, Lungenepithel, Magen- und Darmschleimhaut), sind mit Mastzellen durchsetzt. Auch den Mastzellen im Herzen wird in den letzten Jahren vermehrt Beachtung geschenkt, scheinen sie doch ursächlich an so häufig auftretenden kardialen Funktionsstörungen wie Tachykardie und Herzinsuffizienz mitbeteiligt zu sein (Hara et al. 2002, Palladini et al. 2003, Shiota et al. 2003, Kim et al. 2006, Batlle et al. 2006, Jahanyar et al. 2007, Mackins et al. 2006).

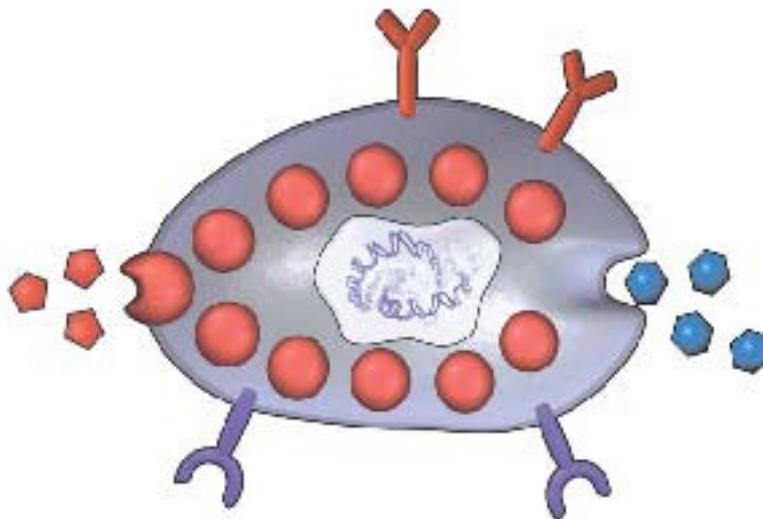
#### ***Klinische Definition der systemischen Mastozytosen***

Im Unterschied zur Mastzellhyperplasie, also der Anreicherung von gesunden Mastzellen im Gewebe als Antwort auf chemotaktische Signale des ortsständigen oder systemischen Immunsystems, handelt es sich bei den systemischen Mastozytosen um eine heterogene Krankheitsgruppe, die durch ein abnormales Wachstumsverhalten und eine Anreicherung von krankhaft

veränderten Gewebsmastzellen in Organen sowie einer erleichterten Mediatorfreisetzung aus ihnen gekennzeichnet ist. Die vielfältigen klinischen Symptome wie Übelkeit, Durchfall, Darmkrämpfe, Ulcus ventriculi, Flush, Pruritus, Kopfschmerzen, Knochenschmerzen oder Hepatosplenomegalie, die jeweils für sich alleine genommen ohne große diagnostische Aussagekraft sind, ergeben in der Zusammenschau eine diagnoseweisende Befundkonstellation, das so genannte Mastzellmediatorsyndrom (Roberts und Oates 1991; Molderings et al. 2006). Nach Ausschluß von Erkrankungen, die von einer Mastzellhyperplasie und damit von Mastzellmediatorbeschwerden begleitet werden können (Tabelle 2, Seite 12), ist nach derzeitigem Verständnis der Mastzell(patho)physiologie das Mastzellmediatorsyndrom Ausdruck einer pathologisch gestörten Überfunktion der betroffenen einzelnen Mastzellen im Rahmen einer systemischen Mastozytose. Die Symptome des Mastzellmediatorsyndroms resultieren aus der Freisetzung der über 40 biologisch aktiven Mediatoren (Abbildung 1; Übersicht in Crivellato et al. 2004, Alfter et al. 2007), die in den Mastzellen gespeichert sind bzw. auf Reiz hin de-novo gebildet werden können sowie aus einer pathologischen Infiltration der verschiedenen Organe.

### Gespeicherte Mediatoren

Histamin  
 Proteasen  
 Peroxidase  
 Serotonin  
 Heparin  
 GM-CSF  
 IL-4, TNF $\alpha$



### Neu gebildete Mediatoren

IL-2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10  
 12, 13, 15, 18, 21, 23  
 Prostaglandine  
 Leukotriene  
 VEGF, NGF, FGF  
 Inteferon  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$   
 PAF, TGF- $\beta$   
 CCL3, CCL2  
 CRCH, TSLP  
 CXCL10

Abbildung 1

Übersicht zu Mediatoren, die in den Granula der Mastzellen gespeichert sind oder auf Reiz hin von Mastzellen neu gebildet werden. Modifiziert nach Sayed et al. 2008.

Die Konsensus-Klassifikation der systemischen Mastozytosen unterscheidet als Hauptformen die indolente systemische Mastozytose, die systemische Mastozytose mit einer klonalen, nicht von Mastzellen abgeleiteten hämatopoetischen Begleiterkrankung, die aggressive systemische Mastozytose und die Mastzellleukämie. Diese Hauptformen können unter Berücksichtigung histologischer und molekulargenetischer Kriterien noch weiter differenziert werden (Übersicht in Valent et al. 2007).

### ***Physiologische und pathophysiologische Bedeutung der Rezeptortyrosinkinase Kit***

Die normale Entwicklung der Mastzellen erfordert die Wechselwirkung zwischen dem Mastzellenwachstumsfaktor (auch *stem cell factor*, SCF, genannt), einem Zytokin, und einer transmembranären Rezeptortyrosinkinase, dem Kit-Rezeptor, die von den Mastzellen während ihrer Entwicklung exprimiert wird. Untersuchungen der letzten Jahre haben als eine Voraussetzung für die Entstehung einer systemischen Mastozytose Veränderungen der Aminosäuresequenz der Rezeptorkinase Kit durch Mutation in dem Gen *c-kit*, das für diese Tyrosinkinase kodiert, aufgezeigt (Übersicht in Valent et al. 2003). Durch funktionell relevante, auch als „aktivierende“ Mutationen bezeichnete, Mutationen kommt es zu einer SCF-unabhängigen Daueraktivierung der Kinase mit der Konsequenz einer gesteigerten Proliferationsfähigkeit dieser Mastzellen, einer Anreicherung von klonalen, mutierten Gewebsmastzellen in Organen und einer erleichterten Mediatorfreisetzung aus ihnen. Durch Analyse einiger weniger, ausgewählter Bereiche des *c-Kit* Gens nicht nur in Mastzellen, sondern auch in anderen, Kit-exprimierenden Tumorzellen sind verschiedene funktionell relevante Mutationen in der Kit-Tyrosinkinase nachgewiesen worden. Einige der Mutationen scheinen für bestimmte neoplastische Erkrankungen typisch zu sein. So fanden sich Mutationen in den Exonen 9, 11 und 13 des *c-kit*-Gens regelmäßig bei Patienten mit gastrointestinalen Stromatumoren (GIST; Hirota et al. 1998). Für die akute myeloische Leukämie, das sinonasale T-Zelllymphom, das kleinzellige Bronchialkarzinom, Melanome sowie verschiedene Sarkome sind ebenfalls aktivierende *c-kit* Mutationen beschrieben worden (Gari et al. 1999; Hongyo et al. 2000). Mutationen in Codon 816 in Exon 17 finden sich bei der Mehrzahl der Patienten mit so genannter indolenter systemischer Mastozytose und mit Mastzellleukämie (Valent et al. 2004, 2007; Akin 2005). Der Nachweis von funktionell relevanten Mutationen in der Kit-Tyrosinkinase von Mastzellen hat dazu beigetragen, die systemische Mastozytose als Tumorentität neu zu definieren und zu charakterisieren.

## 1.2. Zielsetzung

Erstes Ziel der vorliegenden Arbeit war es, systematisch zu untersuchen, inwieweit eine systemische Mastzellüberaktivitätsstörung als Folge von pathologischen Veränderungen auf genetischer Ebene von Mastzellen erklärt werden kann. Bisher haben sich derartige Untersuchungen im wesentlichen auf wenige der 21 Exone der Tyrosinkinase Kit, sowie der Tyrosinkinase PDGFR $\alpha$  beschränkt. Da eine solche Beschränkung historisch, aber nicht sachlich begründet ist, sind wir von der Arbeitshypothese ausgegangen, dass auch andere Domänen der Tyrosinkinase Kit für eine pathologische Aktivität der betroffenen Mastzelle und damit für die Auslösung einer pathologischen Mastzellmediatorfreisetzung von Bedeutung sein können. Um dies zu untersuchen, haben wir die gesamte für Kit kodierende Gensequenz auf mRNA-Ebene für alle eingeschlossenen Probanden sowie für Zellen der humanen Mastzelleukämiezelllinie HMC1 sequenziert und mit der Referenzsequenz verglichen. Zweitens sollte der Frage nachgegangen werden, welche dauerhaften strukturellen Veränderungen des Herzmuskelgewebes durch eine erhöhte Mastzellmediatorkonzentration bei Patienten mit systemischer Mastozytose ausgelöst werden können.

**Tabelle 1**

*Erkrankungen, für die pathogenetisch eine gesteigerte Mastzellaktivität bekannt ist oder vermutet wird (modifiziert nach Theoharides et al. 2007).*

<b>Erkrankung</b>	<b>pathophysiologische Konsequenzen einer gesteigerten Mastzellaktivität</b>
Asthma bronchiale	Bronchokonstriktion, Entzündungserscheinungen
Atopische Dermatitis	Dilatation der Hautgefäße, T-Zell-Rekrutierung, Entzündung, Juckreiz
Chronisches Müdigkeitssyndrom	Erschöpfung, Entzündungszeichen im Hirngewebe
Chronische Prostatitis	Entzündung der Prostata, Schmerzen
Entzündliche Darmerkrankungen	Gastrointestinale Entzündung, Schmerzen
Fibromyalgie	Muskelentzündung, Schmerzen
Interstitielle Cystitis	Schädigung der Harnblasenmucosa, Entzündung, Schmerzen
Koronare Herzerkrankung	Koronargefäßentzündung, myokardiale Ischämie
Migräne	Meningeale Vasodilatation, Entzündung, Schmerzen
Multiple Sklerose	gesteigerte Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke, Entzündungszeichen im Hirngewebe, Demyelinisierung, T-Zell-Aktivierung
Neurofibromatose	Wachstum von Hautnerven, Fibrose
Osteoarthritis	Gelenkerosionen, Entzündung, Schmerzen
Psoriasis	Hautentzündung, T-Zell-Rekrutierung
Rheumatoide Arthritis	Gelenkentzündung, Knorpelerosion
Rhinosinusitis	Entzündung der Schleimhaut in Nase und Nebenhöhlen

**Tabelle 2**

*Relevante Differenzialdiagnosen, die für die Einordnung eines systemischen Mastzellmediatorsyndroms als Manifestation einer systemischen Mastozytose berücksichtigt werden müssen.*

**Endokrine Erkrankungen**

Diabetes mellitus  
Porphyrie  
Hereditäre Hyperbilirubinämien  
Schilddrüsenerkrankungen  
Hereditäres Angioödem

**Gastrointestinale Erkrankungen**

Helicobacter pylori-positive Gastritis  
Infektiöse Enteritis  
Parasitosen  
Chronisch entzündliche Darmerkrankungen  
Zöliakie  
Laktose-/Fruktoseintoleranz  
Mikroskopische Colitiden  
Amyloidose  
Mechanische Darmirritationen (Briden, Volvulus u. ä.)  
Hepatitis  
Cholecystolithiasis

**Immunologische/neoplastische Erkrankungen**

Sarkoidose  
Hypereosinophiles Syndrom  
Vaskulitis  
Maligne Lymphome  
Endokrine Tumore

## **2. Material und Methoden**

### **2.1. Mutationsanalyse**

#### **2.1.1. Auswahlkriterien für den Einschluss von Patienten und gesunden Probanden in die Untersuchung**

Neununddreißig Patienten (27 Frauen und 12 Männer) mit den klinischen Zeichen eines Mastzellmediatorsyndroms als Ausdruck eines systemischen Mastzellüberaktivitätssyndroms wurden zwischen Mai 2005 und April 2008 an den Universitätskliniken Bonn für die vorliegende Querschnittstudie rekrutiert. Die Diagnose *systemisches Mastzellüberaktivitätssyndrom* mit Mastzellmediatorsyndrom wurde auf der Grundlage des Bestehens von episodischen oder chronischen systemischen mastzellmediatorbedingten Symptomen während der vorangegangenen 2 Jahre gestellt. Eine ausführliche Krankengeschichte, die den zeitlichen Beginn und Verlauf der Beschwerden sowie das Beschwerdebild umfasst, wurde in standardisierter Form mit Hilfe eines validierten Fragebogens (Molderings et al. 2006; Hermine et al. 2008) erhoben. Andere Erkrankungen (Tabelle 2, vorherige Seite), die ebenfalls mit einem oder mehreren der beobachteten Symptomen einhergehen können, wurden durch die Bestimmung von für diese Erkrankungen pathognomonischen Laborparametern und/oder bildgebenden Verfahren ausgeschlossen.

Als gesunde Vergleichspersonen dienten 5 gesunde freiwillige Probanden, die keine chronischen oder episodischen abdominellen Beschwerden oder Erkrankungen in der Vorgeschichte hatten, Nicht-Raucher waren, und bei denen sich kein Anhalt auf das Vorliegen einer malignen Erkrankung ergab. Alle Patienten und gesunde Probanden willigten freiwillig in die Untersuchungen ein, die von der Ethikkommission der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn als berufsethisch unbedenklich genehmigt worden waren. Zur Verifizierung des Untersuchungsverfahrens wurde die humane Mastzelleukämie Zelllinie HMC1 eingesetzt, ein Subklon der von Butterfield etablierten HMC1-Zelllinie (Butterfield et al. 1988).

### 2.1.2. Isolierung von Mastzellprogenitorzellen aus dem peripheren venösen Blut

Peripheres, venöses Blut wurde durch Punktion der Kubitalvene der Probanden mittels einer Kanüle gewonnen, an die eine Spritze angesetzt war, die EDTA als Antikoagulant enthielt. Die Mastzellprogenitorzellen wurden nach der im Folgenden beschriebenen, etablierten, in Einzelschritten leicht modifizierten Methode (Kirshenbaum und Metcalfe 2005; Li et al. 1998; Sugo et al. 2006; Wang et al. 2006) unmittelbar nach der Blutentnahme isoliert.

#### Leukozytenisolierung aus frischem Vollblut

Für die Isolierung mononukleärer Zellen wurde ein Verfahren verwandt, dessen Prinzip auf der Auftrennung des Vollblutes über einer geschichteten Flüssigkeitssäule aus Komponenten unterschiedlicher Dichte beruht. Da Antikörper der Hersteller Miltenyi Biotech GmbH (Hilden) verwendet wurden, wurde ebenfalls die von diesem Hersteller empfohlene Methode zur Zellisolierung verwendet.

Die Isolierung wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt:

- Vollblut verdünnen mit *PBS (physiological buffer solution)*, die 2 mM *EDTA* + 0,5% *BSA (bovine serum albumine)* enthält (pH 7,2; 4-8°C): 10-15 ml Vollblut mit *PBS* auf 50 ml auffüllen
- eine Schicht von 35 ml verdünntem Blut über 15 ml *Ficoll Paque* (Dichte 1,077 g/ml) in ein 50 ml *Falcon Tube* geben. Bei 400 x g 40 Minuten lang bei 20°C in einem *Swing Rotor* ohne Bremse zentrifugieren
- die oberste Schicht vorsichtig abpipettieren
- die Zellen in der Interphase (Leukozyten) abpipettieren und in ein neues 50 ml *Falcon Tube* überführen
- das *Falcon Tube* auf 20 ml mit *PBS (+ BSA + EDTA)* auffüllen, vorsichtig mischen und bei 400 x g 10 Minuten lang bei 20°C zentrifugieren; den gesamten Überstand entfernen
- das Zellpellet in 20 ml *PBS (+BSA + EDTA)* resuspendieren und bei 200 x g 15 Minuten lang bei 20°C zentrifugieren; den Überstand verwerfen (= 1. Waschschrift)
- das Zellpellet erneut in 20 ml *PBS (+BSA + EDTA)* resuspendieren und bei 200 x g 20 Minuten lang bei 20°C zentrifugieren; den Überstand verwerfen (= 2. Waschschrift)

**Mastzellisolierung aus der Leukozytenfraktion mit Hilfe der CD117-Microbeads (Milteny, Hilden)**

Das *Magnetic Activated Cell Sorting* (MACS; Miltenyi Biotech GmbH, Hilden) arbeitet mit submikroskopisch kleinen, super-paramagnetischen, antikörpergekoppelten Kügelchen, die keinen Einfluss auf die Funktionalität der Zellen haben (Schumm et al. 1999). Das Zelleluat wird über eine Säule geleitet, die in einem Magneten eingespannt ist. Zellen, die mit dem Antikörper markiert wurden, werden von dem Magneten in der Säule zurückgehalten, die anderen Zellen fließen durch die Säule durch. Nach dieser Selektion wird die Säule aus dem Magnetfeld entfernt und die markierten Zellen mit einem Stempel und Pufferlösung aus der Säule gedrückt. In dem nachstehend beschriebenen Isolierungsschema erfolgte die Selektion mit dem Antikörper für CD117 positive Zellen.

- das Zellpellet in 275 µl *PBS* resuspendieren
- 100 µl "FcR Blocking buffer" (Milteny, Hilden) dazugeben
- 125 µl CD117 (= Tyrosinkinase Kit-Antigen) MicroBeads (Milteny, Hilden) zugeben
- gut mischen und für 15 Minuten bei 4 - 8°C inkubieren
- Zugabe von 2 ml *PBS* und Suspension mit 300 x g 10 Minuten lang zentrifugieren; den Überstand abpipettieren
- Zellen in 500 µl *PBS* resuspendieren
- die *MACS-Säule* in einer Halterung in ein definiertes magnetische Feld einbringen
- Säule vorbereiten, indem man 500µl *PBS* einfüllt und ganz durchlaufen lässt
- Zellsuspension auf die Säule auftragen
- die CD 117-negativen Zellen passieren die Säule und werden in einem 15 ml Falcon Tube aufgefangen
- 3 x 500 µl *PBS* zum Auswaschen CD-117-negativer Zellen aufgeben (jeweils ganz durchlaufen lassen)
- die Säule aus dem Magnetfeld entfernen und auf ein passendes Gefäß (15 ml Tube) aufsetzen
- 1 ml *PBS* auf die Säule geben und mit dem dem Kit beiliegenden Kolben die Pufferlösung durchpumpen

Dieses Eluat enthält selektiv die CD-117-positiven Mastzellen (Abbildung 2, Seite 23).

### 2.1.3. mRNA Extraktion und Detektion von Alterationen in den c-Kit Transskripten

Die RNA in den Zellen wurde mittels der *RNeasy Mini* and *QIA shredder Kits* nach den Angaben des Herstellers extrahiert (Qiagen, Hilden, Deutschland). Die RNA wurde mit Hilfe des *Revert Aid First Strand cDNA Synthesis kit* (Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) in cDNA umgeschrieben. Es wurden spezifische PCR-Primer-Paare zusammengestellt, die zur Amplifikation von sich überlappenden Fragmenten der die Tyrosinkinase Kit kodierenden cDNA mit 400-820 Basenpaaren führten. Die Primer-Sequenzen (Tabelle 3, nächste Seite) wurden anhand der humanen c-kit Referenzsequenz (Accessionnummer NM000222) ausgewählt. In der PCR wurden ca. 20 ng cDNA, Failsafe PCR buffer G (Epicentre, Madison, WI, USA) und 1 U Taq DNA Polymerase (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) in einem Gesamtvolumen von 50 µl eingesetzt. Die PCR-Bedingungen waren: 40 Zyklen mit 1 Minute Denaturierung bei 94°C, 1 Minute bei der Anheftungstemperatur des jeweiligen Primerpaares (Tabelle 3, Seite 18) und anschließend 1 Minute Verlängerung bei 72°C. Die letzte Verlängerungsperiode dauerte 5 Minuten bei 72°C. Die PCR-Produkte wurden mittels Gel-Elektrophorese auf einem 1,8%-igem Agarose Gel aufgetrennt und visualisiert. Die interessierenden Banden wurden aus dem Gel ausgeschnitten und die cDNA mittels des *MinElute Gel Extraction Kit* (Qiagen, Hilden, Deutschland) aus den Gelstücken extrahiert. Die PCR-Produkte wurden anschließend bei Qiagen (Hilden, Deutschland) direktsequenziert.

### 2.1.4. Kardiale Untersuchungstechniken

Um mehr über die möglichen anatomischen, funktionellen und strukturellen Auswirkungen einer pathologischen myokardialen Mastzellaktivierung zu erfahren, wurde als kardiologische Basisuntersuchung bei 18 Patienten ein 12-Kanal-Elektrokardiogramm (Ruhe-EKG) angefertigt (Geräte-Hersteller: GE Medical Systems, Modell: MAC® 1200 ST). Zusätzlich wurde ein Langzeit-EKG über 24 Stunden (Holter-EKG) inklusive RR-Varianzbestimmung (Gerätehersteller: GE Medical Systems, Langzeit-EKG-Digitalrekorder: CardioMem® CM 3000, Getemed; Langzeit-EKG-Analysesoftware: CardioDay®, Getemed) bei diesen Patienten digital aufgezeichnet und ausgewertet. Die zentrale kardiologische Untersuchung bei diesen Patienten wurde dann mittels einer transthorakalen Doppler-Echokardiographie (2D-Mode) inklusive PW-, CW-, Farb-Doppler, sowie dem Gewebe-Doppler (Tissue Doppler Imaging (TDI) zur Visualisierung und Detektion der strukturellen und funktionellen Organverhältnisse durchgeführt (Gerätehersteller: Philips, Modell: iE 33® Echocardiography System).

### **2.1.5. Statistische Analyse**

Die Unterschiede zwischen den Mittelwerten der Verhältnisse der Expressionsstärken der Spleissvarianten wurde mit dem t-Test nach Student auf statistische Signifikanz untersucht.

**Tabelle 3**

Sequenzen der Vorwärts- und Rückwärts-Primer, die zur PCR-Amplifikation eingesetzt wurden

Primersequenz	Lage in der kodierenden Sequenz von c-kit	Anheftungs-temperatur
Vorwärtsprimer: 5'-CGAGAGCTGGAACGTGGACC -3'	5'-UTR -49 - -30	57°C
Rückwärtsprimer: 5'-CACGTTGAGTACACAGAACTAG -3'	716 - 737	
Rückwärtsprimer: 5'-ATTAGGTGACACTATAGACTCCTGTAGTTTAGTCTGCTG -3'	754 - 771	
Rückwärtsprimer: 5'-CATTAGGTGACACTATAGACTCCTGTAGTTTAGTCTGAC -3'	752 - 771	
Vorwärtsprimer: 5'-GGCTCTGTCTGCATTGTTCTG -3'	542 - 562	54°C
Vorwärtsprimer: 5'-TAATACGACTCACTATAGGGGAAAAGAGAAAACAGTCAGCAG -3'	738 - 756	
Vorwärtsprimer: 5'-TAATACGACTCACTATAGGGGAAAAGAGAAAACAGTCAGAC -3'	738 - 758	
Rückwärtsprimer: 5'-CTCGTTAGATGAAGTTCACCTTAC -3'	1120 - 1142	
Vorwärtsprimer: 5'-GCAGTGGATCTATATGAACAG -3'	1038 - 1058	54°C
Rückwärtsprimer: 5'-GGATTTGCTCTTTGTTGTTAC -3'	1529 - 1550	
Rückwärtsprimer: 5'-GATGGATTTGCTCTTTAAATGC -3'	1519 - 1552	
Rückwärtsprimer: 5'-CATTAGGTGACACTATAGAGGATTTGCTCTTTGTTGTTAC -3'	1529 - 1550	
Rückwärtsprimer: 5'-CATTAGGTGACACTATAGAGATGGATTTGCTCTTTAAATGC -3'	1519 - 1552	
Vorwärtsprimer: 5'-TAATACGACTCACTATAGGGGTAACAACAAAGAGCAAATCC -3'	1529 - 1549	54°C
Vorwärtsprimer: 5'-TAATACGACTCACTATAGGGCATTAAAGAGCAAATCCATC -3'	1520 - 1552	
Rückwärtsprimer: 5'-CATTAGGTGACACTATAGACTCATTAGTACTATCGCTGCAG -3'	2139 - 2160	
Rückwärtsprimer: 5'-CATTAGGTGACACTATAGAGTACTCATTAGTACTATCGCAG -3'	2139 - 2163	

Vorwärtsprimer: 5'- <i>TAATACGACTCACTATAGGGCAAAGGAGTCTTCCTGCAGC</i> -3	2126 – 2145	54°C
Vorwärtsprimer: 5'- <i>TAATACGACTCACTATAGGGCAAAGGAGTCTTCCTGCGATAG</i> -3	2126 – 2150	
Rückwärtsprimer: 5'- <i>CTGCTTCCTAAAGAGAACAG</i> -3'	2584 - 2603	
Vorwärtsprimer: 5'- <i>GACTACCTGTGAAGTGGATG</i> -3'	2489 – 2508	57°C
Rückwärtsprimer: 5'- <i>CAGAAAGACAGGATTGCAGTG</i> -3'	3'-UTR +112 - +132	

Kursive Buchstaben: Sequenzen der universellen Primer T7 und SP6.

Zu beachten: Den Konstrukten, die ausgewählt wurden, um die Minus-Spleissvarianten zu erkennen, fehlt die entsprechende Sequenz der Referenzsequenz.

### **3. Ergebnisse**

#### **3.1. Analyse der c-kit Transskripte in humanen Mastzellprogenitorzellen aus dem peripheren venösen Blut**

##### **3.1.1. Charakteristika der Probandengruppen**

Das Alter der 39 in die Studie eingeschlossenen Patienten lag zwischen 17 und 80 Jahren mit einem Median von 50 Jahren. Das Verhältnis von Männern zu Frauen lag bei 1:2,25. Die Dauer der Erkrankung seit der „Erstmanifestation“ des Mastzellmediatorsyndroms bis zum Rekrutierungsende unserer Untersuchung schwankte zwischen ¼ und 56 Jahren mit einem Median von 9 Jahren. Das Alter der zufällig ausgewählten (nicht alters- und geschlechtsangepassten) gesunden fünf Vergleichspersonen betrug zwischen 25 und 66 Jahre mit einem Median von 31 Jahren. Das Geschlechterverhältnis (Männer zu Frauen) lag hier bei 1:1,5.

Alle Patienten wiesen Mastzellmediator-induzierte Symptome in unterschiedlicher Ausprägung auf, die nach Ausschluss der relevanten Differenzialdiagnosen als Manifestation eines systemischen Mastzellüberaktivitätssyndroms eingeordnet werden konnten. Fast alle Patienten klagten über rezidivierende und/oder länger anhaltende Symptome wie Fatigue, Nausea, körperliche Erschöpfung, abdominelle Schmerzen und Stuhlgangsanomalien in Form von Diarrhoe und/oder Obstipation (Tabelle 4, Seite 21). Kardiovaskuläre Symptome, eine Hypercholesterinämie sowie Beschwerden von Seiten des zentralen und peripheren Nervensystems fanden sich bei ¾ der Patienten. Flushsymptomatik, sowie Zeichen einer Cholestase, Gewichtsverlust, pulmonale Beschwerden und/oder eine Osteoporose mit oder ohne Knochenschmerzen fanden sich bei der Hälfte der dahingehend untersuchten Patienten (Tabelle 4, Seite 21). In der Hälfte aller Patienten fanden wir Zeichen einer Leberbeteiligung, eine Splenomegalie, sowie Zeichen einer Blutungsneigung (Tabelle 4, Seite 21). Es war auffällig, dass nur 55% der Patienten einen erhöhten Tryptasespiegel im peripheren Venenblut und/oder eine erhöhte Ausscheidung von N-Methylhistamin im Urin aufwiesen. Eine Eosinophilie im Blut als Folge einer Mastzellüberfunktion war bei 13% der Patienten nachzuweisen.

**Tabelle 4**

*Häufigkeiten von klinischen Beschwerden, und Befunden, die in der vorliegenden Untersuchung auf die unkontrollierte Freisetzung von Mastzellmediatoren in 39 Patienten mit einem systemischen Mastzellüberaktivitätssyndrom zurückzuführen sind und wesentlich das so genannte Mastzellmediatorsyndrom ausmachen.*

**Allgemeine und konstitutionelle Symptome**

Fatigue 95%  
 Körperliche Erschöpfung 97%  
 Gewichtsverlust 64%

**Gastrointestinale Symptome**

Übelkeit 92%  
 Abdominelle Schmerzen 100%  
 Stuhlgangsanomalien: Diarrhoe 85%; Obstipation 15%  
 Nicht-kardiale Brustschmerzen 65%

**Symptome einer Leberbeteiligung**

Erhöhung der Lebertransaminasen (bis zum Zweifachen des Normalwertes) 50%  
 γGT 27%  
 GPT 32%  
 GOT 19%  
 Erhöhte Bilirubinkonzentration im Blut (bis zu 2.5 mg/dL) 31%  
 Morphologische Veränderungen in der Leber und Milz im Ultraschallbild  
 Fettleber 10%  
 Hepatomegalie 14%  
 Splenomegalie 25%

**Kardiovaskuläre Symptome**

Tachykardie 74%  
 Blutdruckunregelmäßigkeiten: Hypotension 69%; Hypertension 26%

**Symptome des Knochengerüsts**

Osteoporose / Osteopenie 56%

**Neuropsychiatrische Symptome**

Kopfschmerzen 76%

Periphere Neuropathie 81%

Verminderte Aufmerksamkeitsvermögen, Konzentrationsschwierigkeiten,  
Vergesslichkeit, Angst, Schlaflosigkeit, Tinnitus 75%

**Pulmonale Symptome**

Husten, Asthma-artige Beschwerden, Dyspnoe 57%

**Augensymptome, Rhinorrhoe 37%****Hautzeichen und -symptome**

Flush 61%

Pruritus 42%

Effloreszenzen/Telangiektasien 60%

**Zeichen einer Blutgerinnungsstörung 58%****Pathologisch veränderte Laborwerte**

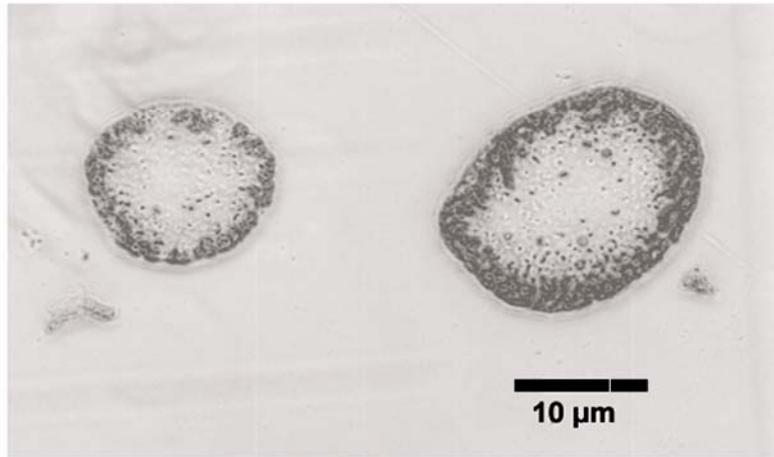
Erhöhte Tryptase und/oder Histamin im Blut und/oder Methylhistamin  
im Urin 55%

Hypercholesterinämie (Gesamtcholesterin  $\geq 200$  mg/dL) 79%

Eosinophilie im Blut 13%

### 3.1.2 . Ergebnisse der Mastzellisolierung

Mit dem von uns eingesetzten Zellisolierungsverfahren aus Dichtegradientenzentrifugation und nachgeschaltetem *magnetic activated cell sorting* mit CD117 (=Tyrosinkinase Kit-Antigen) Micro Beads konnte eine homogene, Tyrosinkinase Kit exprimierende Population von Zellen aus dem Vollblut isoliert werden. Anhand ihrer morphologischen Eigenschaften konnten diese Zellen als Mastzellvorläuferzellen identifiziert werden (Abbildung 2). Aus 36 ml Vollblut konnten ca. 50000 Mastzellvorläuferzellen isoliert werden.



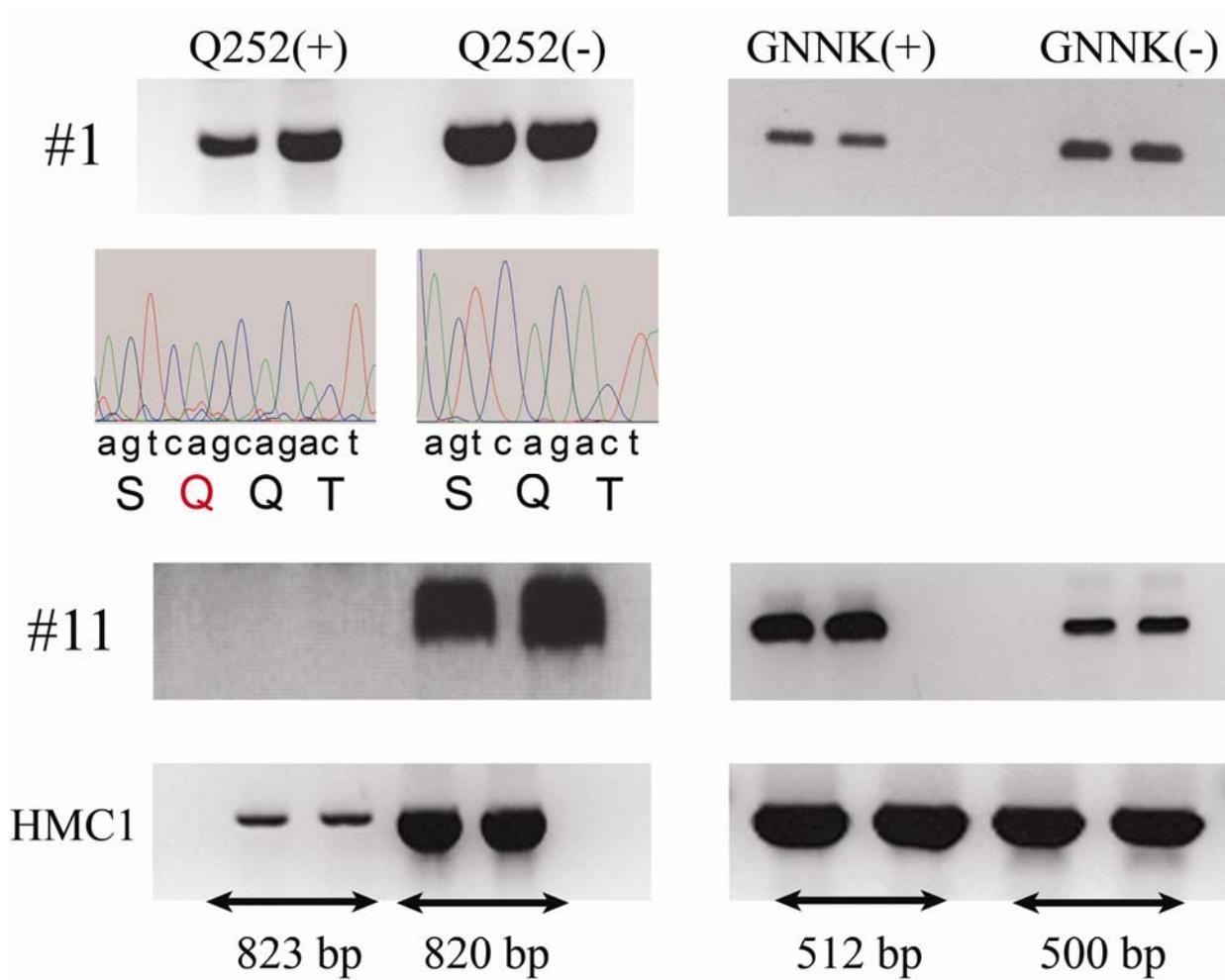
#### **Abbildung 2**

*Phasen-Kontrast-Foto, das die morphologischen Charakteristika der Mastzellprogenitorzellen zeigt, die mittels CD117-positivem magnetic cell sorting aus humanem peripheren Blut (hier von Patient #0) isoliert wurden. Maßstabsbalken, 10 µm.*

### 3.1.3. Ergebnisse der Mutationsanalyse

In den Untersuchungen an mRNA aus Zellen der humanen Mastzelleukämiezelllinie HMC1 ließ sich mit unserem Untersuchungsverfahren die für diese Zellen bekannte Deletion von S715, die GNNK510-513-Spleissvarianten und die Punktmutationen V560G und D816V nachweisen (Abbildung 3, nächste Seite). Zusätzlich fand sich eine Einfügung von Glutamin in Position 252 der Aminosäurenkette (Abbildung 3).

Bei allen untersuchten Personen (also 39 Patienten und 5 gesunden Vergleichspersonen) war an Position 252 der Aminosäurenkette die Aminosäure Glutamin in unterschiedlichem Ausmaß zusätzlich eingefügt (Abbildung 3; Tabelle I, Seite 48ff). Im extrazellulären Teil von Kit, nahe der



### Abbildung 3

RT-PCR-Ergebnisse, die die *c-kit* Spleissvarianten *insQ252* und *GNNK(-)* in Proben von Patient #1, Vergleichsperson #11 und HMC1-Zellen zeigen. Die Länge der Amplifikate ist unter den Pfeilen angegeben. Für Patient #1 sind Sequenzelektropherogramme abgebildet, in denen die Insertion (roter Buchstabe) der Aminosäure Glutamin (Q) an Position 252 der Aminosäurekette oder die Wildtypsequenz an dieser Position gezeigt ist. Bei Vergleichsperson #11 waren die Banden für die Spleissvariante *insQ252* so schwach, dass sie in der obigen Abbildung kaum zur Darstellung kommen.

juxtamembranären Region findet sich die Aminosäure-Sequenz GNNK (Glycin – Asparagin – Asparagin – Lysin; Aminosäuren 510-513). Als Folge einer alternativen Spleissstelle gibt es eine Spleissvariante, in der diese 4 Aminosäuren fehlen (GNNK[-]). Bei nahezu allen Patienten (Ausnahmen: Pat. #10, #15 und #16) fehlte die Aminosäure Serin an Position 715 der Aminosäurenkette (Tabelle I, Seite 48ff). Diese Deletion fand sich auch bei den Probanden #7, #8 und #71 der gesunden Vergleichsgruppe. Die Verhältnisse der Expressionsstärken der korrespondierenden Spleissvarianten zueinander, also die Quotienten aus den Expressionsstärken von der Spleissvariante mit der Insertion 252Q und der ohne diese Insertion (252Q $\oplus$ /(-)), von der Spleissvariante ohne die vier Aminosäuren GNNK an den Aminosäurepositionen 510-513 und der Wildtypvariante (GNNK(-)/ $\oplus$ ) sowie von der Spleissvariante ohne die Aminosäure Serin an der Aminosäureposition 715 und der Wildtypvariante (715S(-)/ $\oplus$ ) waren zwischen unserem Patientenkollektiv und einem Vergleichskollektiv aus gesunden Probanden im Mittel nicht signifikant voneinander verschieden (Tabelle 5). Die Verteilung der Einzelwerte der Expressionsstärken der jeweiligen Verhältnisse der Spleissvarianten wies zwischen dem Patientenkollektiv und dem Vergleichskollektiv aus Gesunden keine signifikante Unterschiede auf (Abbildung 4, Seite 27).

**Tabelle 5** (Fortsetzung auf der nächsten Seite)

*Statistische Analyse der Quotienten aus den Expressionsstärken von der Kit-Spleissvariante mit der Insertion 252Q und der ohne diese Insertion (252Q $\oplus$ /(-)), von der Spleissvariante ohne die vier Aminosäuren GNNK an den Aminosäurepositionen 510-513 und der Wildtypvariante (GNNK(-)/ $\oplus$ ) sowie von der Spleissvariante ohne die Aminosäure Serin an der Aminosäureposition 715 und der Wildtypvariante (715S(-)/ $\oplus$ ). Vergleich zwischen unserem Patientenkollektiv und einem Vergleichskollektiv aus gesunden Probanden. (Zusätzlich zu den Daten der 5 speziell für diese Studie rekrutierten gesunden Probanden wurden von Dr. Molderings Untersuchungsdaten zu 12 weiteren gesunden Probanden aus einer noch unveröffentlichten Studie zur Verfügung gestellt, um einen für eine statistische Analyse ausreichenden Stichprobenumfang der Vergleichsgruppe der gesunden Probanden zu gewährleisten. Diese zusätzlichen Probanden waren im gleichen Labor mit denselben Methoden untersucht worden.) SEM -Fehler des Mittelwertes. Die unterschiedlichen Stichprobenumfänge resultieren aus dem Umstand, dass aus technischen Gründen nicht für alle Untersuchungspersonen die Expressionsstärken aller Spleissvarianten bestimmt werden konnten.*

	252Q $\oplus$ /(-)		Signifikanzniveau
	Patienten	Gesunde	
Mittelwert $\pm$ SEM	0,25 $\pm$ 0,04	0,24 $\pm$ 0,03	P>0,05
Median	0,28	0,21	
Maximum	0,73	0,48	
Minimum	0	0	
Stichprobenumfang	24	17	

	GNNK(-)/⊕		
	Patienten	Gesunde	Signifikanzniveau
Mittelwert ± SEM	0,62 ± 0,04	0,48 ± 0,06	P>0,05
Median	0,63	0,47	
Maximum	1,00	1,00	
Minimum	0	0	
Stichprobenumfang	39	14	

	715S(-)/⊕		
	Patienten	Gesunde	Signifikanzniveau
Mittelwert ± SEM	0,53 ± 0,02	0,53 ± 0,04	P>0,05
Median	0,53	0,50	
Maximum	0,93	0,82	
Minimum	0,33	0,39	
Stichprobenumfang	23	11	

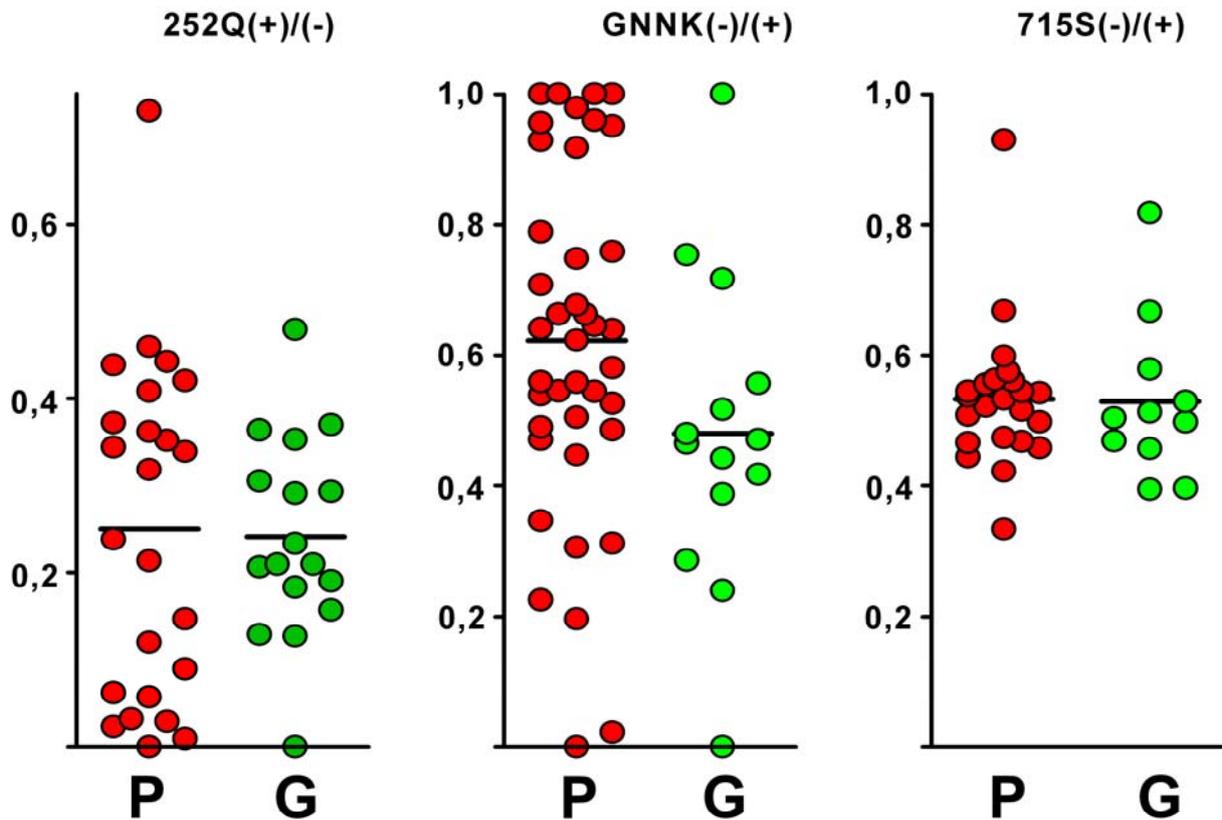


Abbildung 4:

Verteilung der Quotienten aus den Expressionsstärken von der Kit-Spleissvariante mit der Insertion 252Q und der ohne diese Insertion ( $252Q\oplus/(-)$ ), von der Spleissvariante ohne die vier Aminosäuren GNNK an den Aminosäurepositionen 510-513 und der Wildtypvariante ( $GNNK(-)/\oplus$ ) sowie von der Spleissvariante ohne die Aminosäure Serin an der Aminosäureposition 715 und der Wildtypvariante ( $715S(-)/\oplus$ ). Vergleich zwischen unserem Patientenkollektiv (P; rote Symbole) und einem Vergleichskollektiv aus gesunden Probanden (G; grüne Symbole). Ordinate: Quotienten aus den Expressionsstärken. Die schwarzen Querbalken repräsentieren den jeweiligen Mittelwert.

Zusätzlich zu diesen Spleissvarianten wurden zahlreiche Abweichungen in der Aminosäuresequenz der Tyrosinkinase Kit, die aus den Transkripten abgeleitet wurden, gefunden (Tabelle I, Seite 48ff). Zusammengefaßt ergibt sich folgende Zuordnung zu den Regionen der Tyrosinkinase Kit (in **rot**: Austausch von Aminosäuren, die zwischen den Spezies hochkonserviert sind):

### ***Extrazelluläre Region***

***Ligand (SCF)-bindungsdomäne*** (Immunoglobulin-ähnliche Motive 1-3; Aminosäuren 1-308)

**W8R**

**C12S**

**L18P**

Codon 18: Deletion nt a53 mit Leserasterverschiebung und Stoppcodon an Aminosäureposition 42

**P31T**

E53K (in 9 Patienten)

ET73-74RR

**ITE83-85DHG**

**AEA87-89GRS**

K116N

**V214L**

Insertion **Q252** (in allen Probanden)

K259E

**H265Q**

E270K

**L276S**

**G286R**

Exon 3: Deletion unbekannter Größe

Exon 3: Deletion/Insertion von  $\leq 8$  bp

Exon 5: Insertion von 96 bp aus Chromosom 2

***Dimerisationsdomäne*** (Immunoglobulin-ähnliches Motiv 4; Aminosäuren 309-410)

**D327N** (in 2 Patienten)

**E338K**

**Q346L**

**M351I**

F355L

**E359V**

359 Stoppcodon

**S396F**

Exon 6: komplexe Deletion/Insertion

Exon 7: Deletion/Insertion  $< 10$  bp

**Proteolytische Teilungsdomäne** (Immunoglobulin-ähnliches Motiv 5;  
Aminosäuren 411-513)

**D419G**

**D419H**

420 Insertion mit Leserasterverschiebung

**S464L**

475 Stoppcodon (in 3 Patienten)

**K484R**

Exon 8: Deletion am Ende von Exon 8

Deletion 510-513 (GNNK; in allen Probanden)

### **Membranübergreifende Region**

(Aminosäuren 514-543)

**M541L** (in 3 Patienten)

Exon 10: Insertion von  $\geq 133$  bp aus Chromosom 5 zu  
Beginn von Exon 10

Exon 10: Insertion aus Chromosom 2

### **Intrazelluläre Region**

**Juxtamembranäre Domäne** (Aminosäuren 544-577)

**E554K** (in 2 Patienten)

**V560G** (in 3 Patienten)

**Kinase-Insert-Sequenz** (Aminosäuren 686-762)

**S709A**

Deletion S715 (in allen Patienten; in 3 der 5 gesunden  
Vergleichspersonen)

**E720K**

**M724I**

**A736V**

**D751Y**

**D760V**

**E761K**

Insertion einer Sequenz aus Est AF95853

**Kinasedomäne Teil 1** (ATP-Bindungsstelle, Aminosäuren 578-685)

**G658E**

**Y672S**

Insertion R683

**S688L**

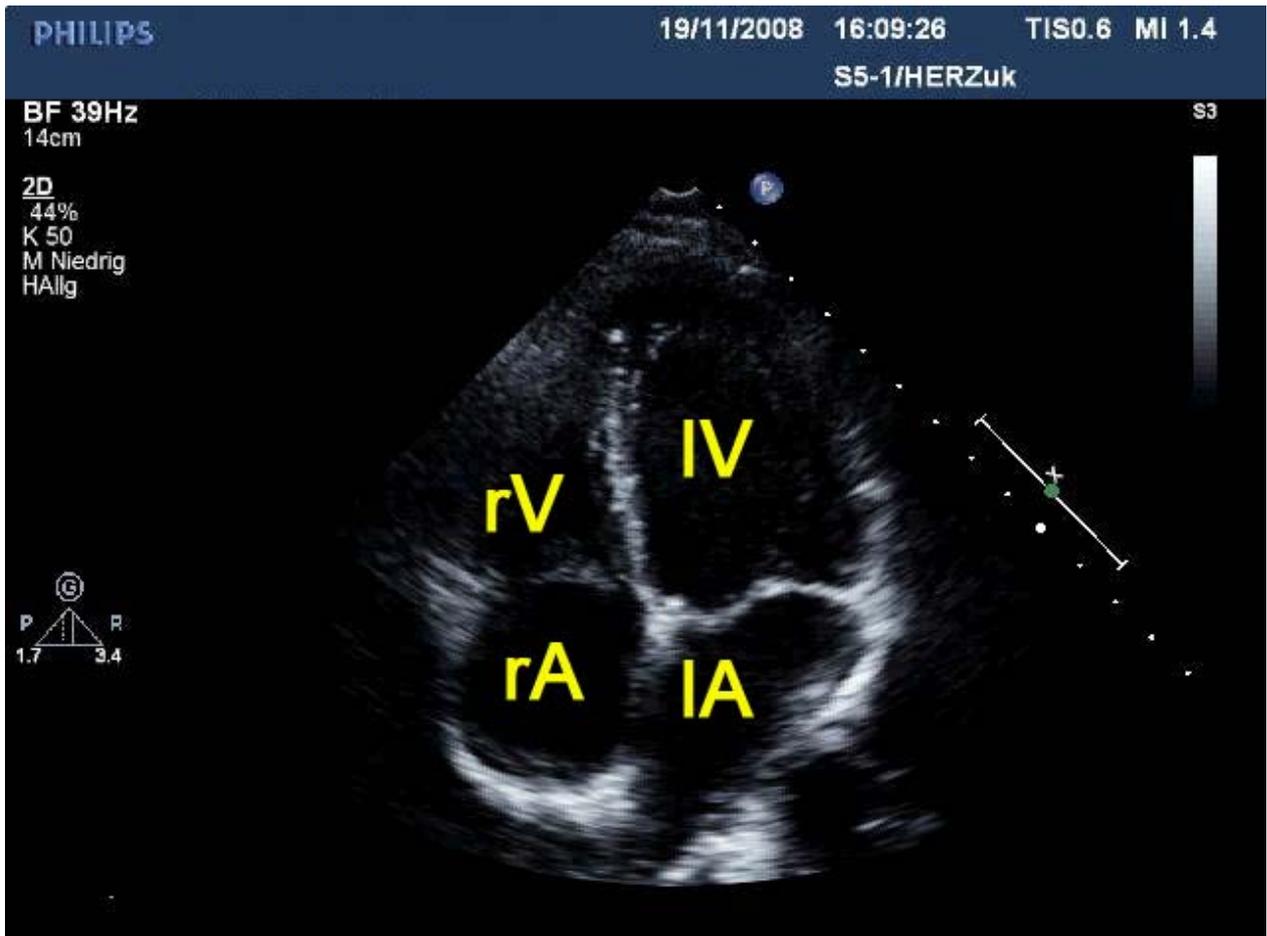
***Kinasedomäne Teil 2*** (Phosphotransferaseaktivität;  
 Aminosäuren 763-925)  
 764 Stoppcodon  
 F782S  
 N787D  
 H790R  
 H802Y  
 814 Stoppcodon  
 D816V  
 S821F (in 2 Patienten)  
 A829T  
 830 Stoppcodon (in 3 Patienten)  
 A837V  
 L862V  
 Spleissstörung der Introns 18, 19 and 20  
 Insertion einer Sequenz aus Est AF95853

Es wurden stets mindestens zwei Veränderungen der mRNA bei jedem Patienten gefunden. Die Probanden der Vergleichsgruppe, die ebenfalls Veränderungen der Kit-mRNA aufwiesen, zeigten keine klinischen Zeichen einer Mastzellaktivitätsstörung.

### **3.2 Kardiale Befunde bei Patienten mit systemischem Mastzellüberaktivitätssyndrom**

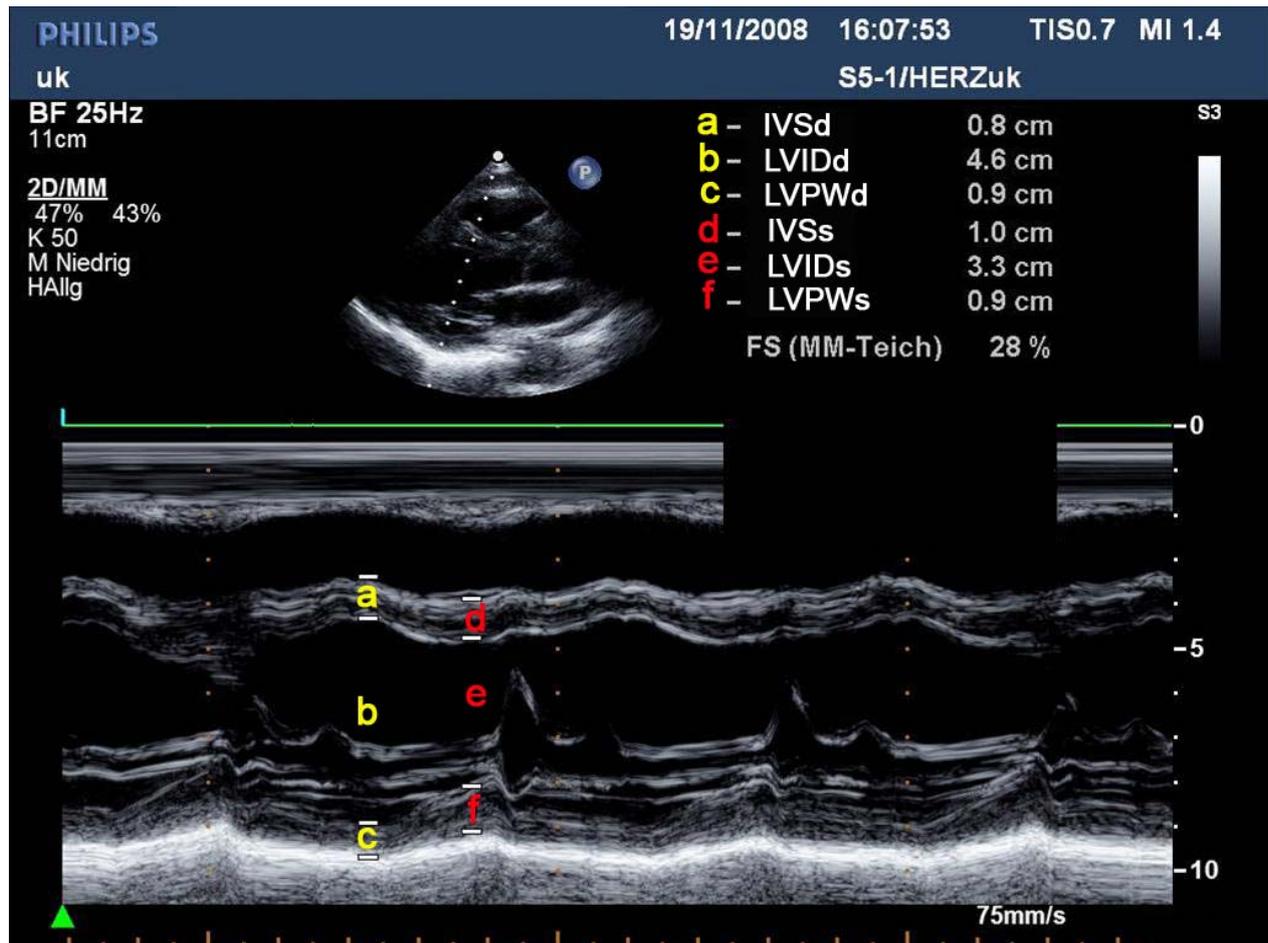
Um mehr über die möglichen anatomischen, funktionellen und strukturellen Auswirkungen einer pathologischen myokardialen Mastzellaktivierung zu erfahren, wurden bei 18 Patienten ein Ruhe-EKG angefertigt, ein Langzeit-EKG über 24 Stunden inklusive RR-Varianzbestimmung aufgenommen sowie eine transthorakale farbcodierte Doppler-Echokardiographie inklusive Tissue Doppler Imaging (Gewebedoppler) durchgeführt. Bei einer mittleren Krankheitsdauer von 14 Jahren konnten echokardiographisch keine pathologischen Veränderungen der systolischen linksventrikulären Funktion, der systolischen und diastolischen linksventrikulären Diameter und der Verkürzungsfraction dokumentiert werden (Abbildungen 5 A und B, Seiten 31 und 32; Tabelle 6, Seite 35). Bei 12 von 18 Patienten fand sich aber eine diastolische linksventrikuläre Dysfunktion im gepulsten (PW-) Doppler (Abbildung 5C, Seite 33) und/oder Tissue Doppler Imaging (Gewebedoppler; Abbildung 5D, Seite 34). Der Gewebedoppler ist die empfindlichste echokardiografische Nachweismethode für eine myokardiale Texturveränderung, die eine Vorstufe

zur chronischen Herzinsuffizienz repräsentieren kann (Tabelle 6, Seite 35). Bei 5 dieser 12 Patienten wurde eine linksventrikuläre Hypertrophie beobachtet (Tabelle 6, Seite 35). Bei 6 von diesen 12 Patienten fand sich eine reduzierte RR-Variation im Langzeit-EKG als Ausdruck einer Störung des myokardialen Reizleitungssystems.



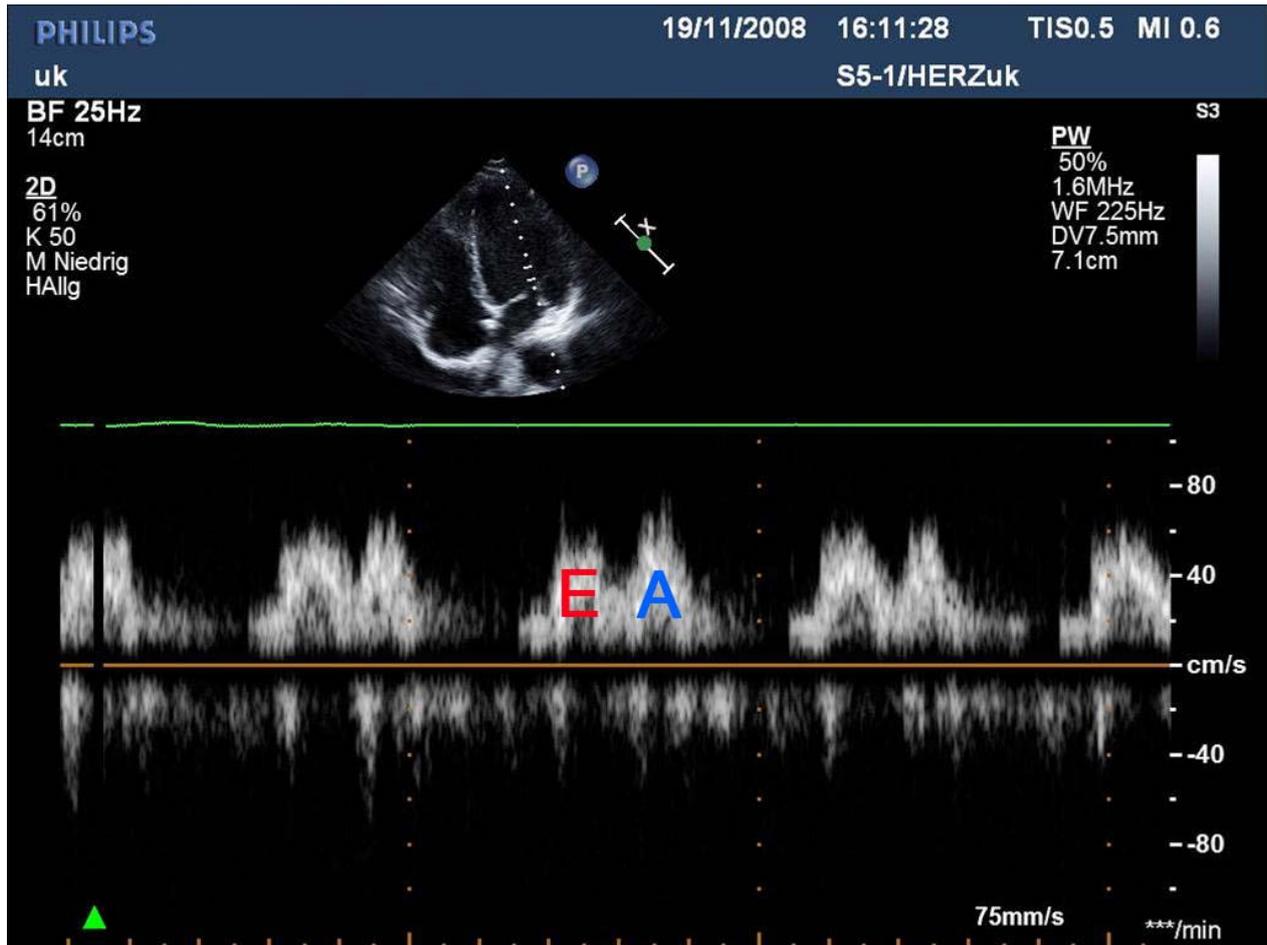
**Abbildung 5A**

*Elektrokardiografische Befunde bei der Patientin # 27. Der transthorakale apikale Vierkammerblick ins Herz zeigt einen Normalbefund. rV-rechter Ventrikel; IV-linker Ventrikel; rA-rechter Vorhof; IA-linker Vorhof.*



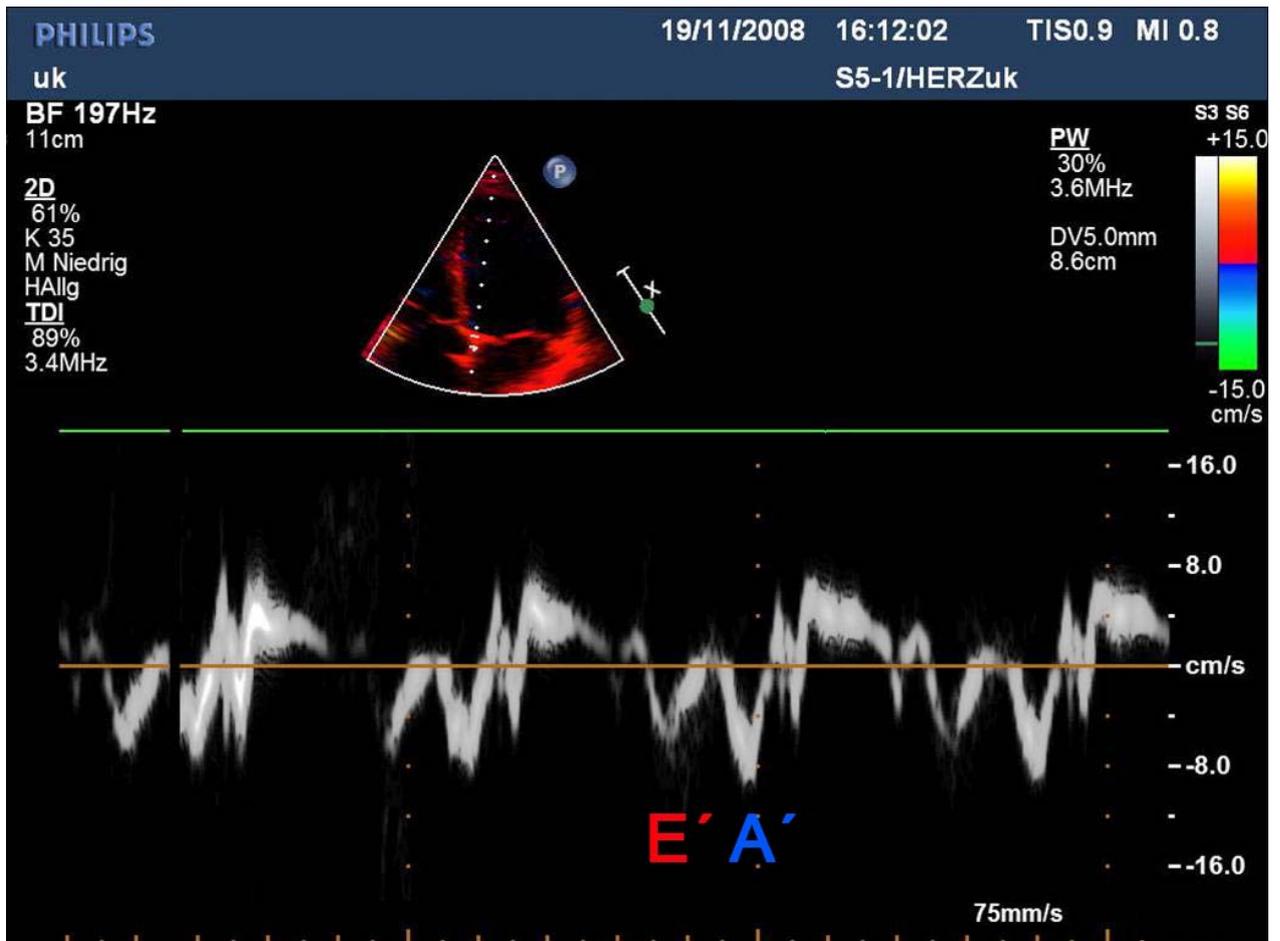
### Abbildung 5B

Elektrokardiografische Befunde bei der Patientin # 27. Der parasternale transthorakale Längsachsenschnitt durch das Herz im M-Mode zeigt einen Normalbefund des linken Ventrikels (Einzelwerte siehe Inset). a: Interventrikuläres Septum diastolisch (IVSd); b: Interventrikulärer diastolischer Diameter des linken Ventrikels (LVIDd); c: Posteriorer Wanddiameter des linken Ventrikels diastolisch (LVPWd); d: Interventrikuläres Septum systolisch (IVSs); e: Interventrikulärer systolischer Diameter des linken Ventrikels (LVIDs); f: Posteriorer Wanddiameter des linken Ventrikels systolisch (LVPWs).



### Abbildung 5C

*Pulse-wave (PW)-Doppler des diastolischen Mitralflussprofils in den linken Ventrikel im transthorakalen apikalen Vierkammerblick (oberer Teil der Abbildung). Im unteren Teil der Abbildung ist zu erkennen, dass die E-Welle (E) kleiner als die A-Welle (A) ist, was auf eine diastolische Dysfunktion des linken Ventrikels im Sinne einer Relaxationsstörung hindeutet. Im Normalfall ist die E-Welle größer als die A-Welle.*



### Abbildung 5D

Tissue-Doppler-Imaging (TDI, Gewebedoppler) des medialen Mitralanulus im transthorakalen apikalen Vierkammerblick (oberer Teil der Abbildung). Im unteren Teil der Abbildung ist zu erkennen, dass die E'-Welle deutlich kleiner als die A'-Welle ist, was beweisend für eine diastolische Dysfunktion des linken Ventrikels ist. Im Normalfall ist die E'-Welle größer als die A'-Welle.

**Tabelle 6**

Echokardiografische Meßparameter für Patienten mit Mastzellmediatorsymptomatik aufgrund einer systemischen Mastozytose (Angaben in *rot* weichen von den Normwerten [Voelker et al. 2004] ab)

Alter	m/w	LVEDd (mm)	LVEDs (mm)	FS (%)	EF (%)	diastol. LV - Dysfunktion		LV - Hypertrophie	
						PW-Doppler	TDI	IVSDd (mm)	PWDd (mm)
38	m	52	33	37	70	+	+	12	10
39	w	48	29	40	51	-	+	11	8
59	w	47	32	32	58	-	+	9	7
41	w	46	34	26	62	-	+	11	9
51	w	47	34	28	54	+	+	8	7
37	w	42	27	36	56	-	+	9	7
47	w	48	29	40	55	-	-	11	8
32	w	47	31	34	65	-	-	9	6
44	m	49	26	47	65	-	+	12	12
23	w	47	29	38	55	-	-	11	9
24	w	46	30	35	57	-	-	10	9
30	w	46	30	35	55	-	-	9	7
76	m	47	25	47	60	+	+	13	12
30	m	54	34	37	60	-	-	11	10
67	w	47	30	36	52	-	+	10	10
46	w	42	26	38	55	+	+	8	7
74	w	45	30	33	50	+	-	17	14
48	m	47	26	45	65	+	+	13	12
Normwerte		< 56	variabel	25 - 35	> 50			5 - 12	5 - 12

- LVEDd** Enddiastolischer linksventrikulärer Durchmesser
- LVEDs** Endsystolischer linksventrikulärer Durchmesser
- FS** Fractional shortening, Verkürzungsfraction (LVEDd - LVEDs) / LVEDd \* 100
- EF** Ejection fraction, Auswurfraction
- LV** linker Ventrikel
- PW-Doppler** gepulster Doppler
- TDI** Tissue doppler imaging, Gewebedoppler
- IVSDd** Enddiastolischer Durchmesser des interventrikulären Septums
- PWDd** Enddiastolischer Durchmesser der linksventrikulären Hinterwand
- +** positiver Befund (Zeichen einer diastolischen linksventrikulären Dysfunktion)
- negativer Befund (kein Anhalt für eine diastolische linksventrikuläre Dysfunktion)

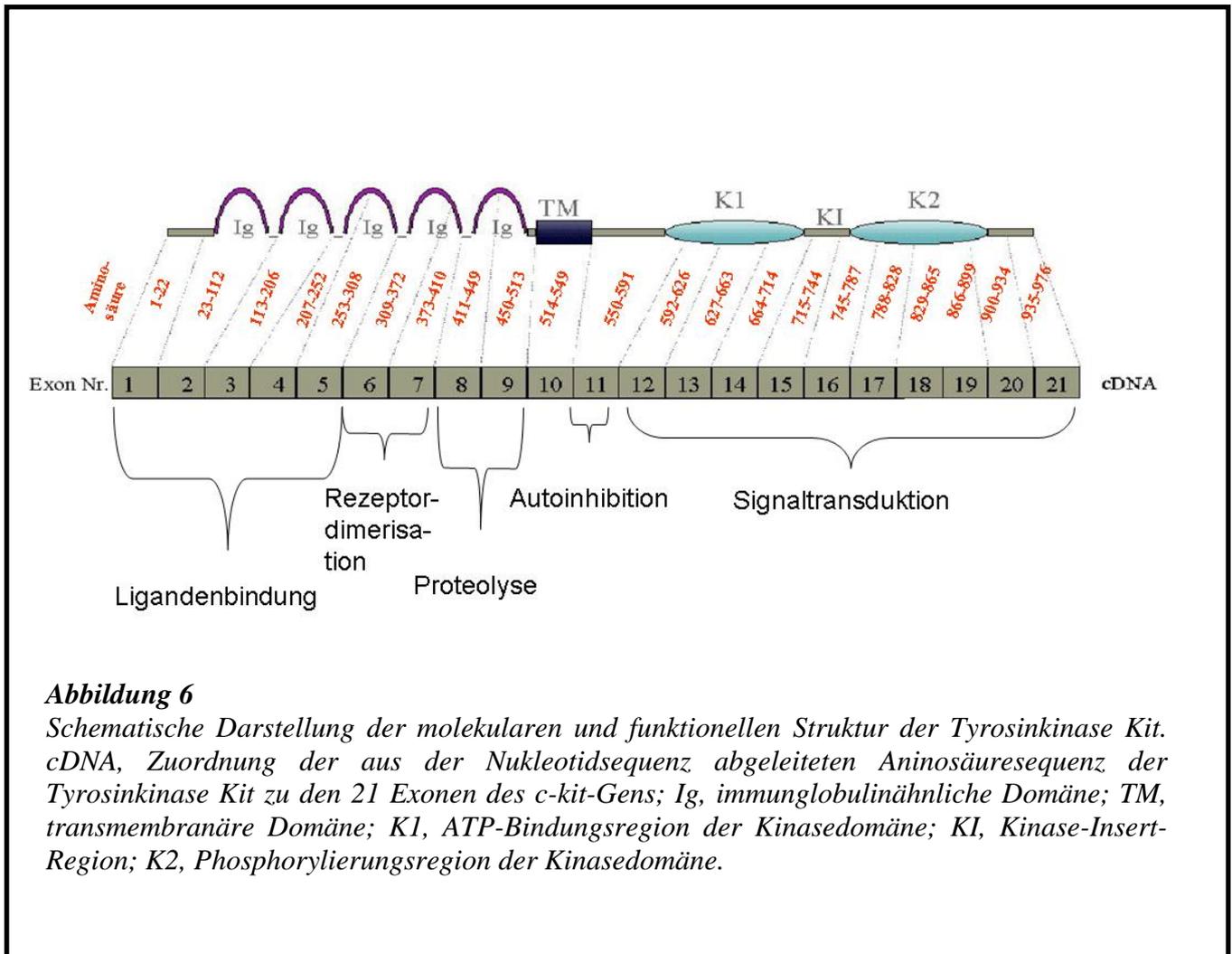
## 4. Diskussion

### 4.1. Analyse der c-kit Transskripte in humanen Mastzellprogenitorzellen aus dem peripheren venösen Blut

Die vorliegende Arbeit beinhaltet die erste vollständige Analyse der kodierenden Sequenz der Tyrosinkinase Kit bei Patienten mit einer systemischen Mastozytose. Untersuchungen der letzten Jahre haben als eine Voraussetzung für die Entstehung einer systemischen Mastozytose Veränderungen der Aminosäuresequenz der Rezeptorkinase Kit durch Mutation in dem Gen c-kit, das für diese Tyrosinkinase kodiert, aufgezeigt (Übersicht in Valent et al. 2003). Bislang haben sich genetische Untersuchungen der Tyrosinkinase Kit im wesentlichen auf nur wenige der 21 Exone dieses Enzyms beschränkt. Da eine solche Beschränkung historisch, aber nicht sachlich begründet ist, sind wir von der Arbeitshypothese ausgegangen, dass auch andere Domänen der Tyrosinkinase Kit für eine pathologische Aktivität der betroffenen Mastzelle und damit für die Auslösung einer pathologischen Mastzellmediatorfreisetzung von Bedeutung sein können. Um dies zu untersuchen, haben wir die gesamte für Kit kodierende Gensequenz auf mRNA-Ebene für alle eingeschlossenen Probanden sowie für Zellen der humanen Mastzelleukämiezelllinie HMC1 sequenziert und die gefundenen Sequenzen mit der Referenzsequenz verglichen. In der Analyse der mRNA aus Zellen der humanen Mastzelleukämiezelllinie HMC1 ließen sich mit unserem Untersuchungsverfahren die für diese Zellen bekannten genetischen Abweichungen, nämlich die Deletion von S715, die GNNK510-513-Spleissvarianten und die Punktmutationen V560G und D816V nachweisen. Dies belegt, dass unser mutationsanalytisches Verfahren dazu geeignet war, Abweichungen in der Sequenz der Tyrosinkinase Kit auf mRNA-Ebene zu detektieren.

Das Kit-Molekül besteht aus einem extrazellulären, einem transmembranären und einem intrazellulären Anteil (Übersicht in Roskoski 2005, Lennartsson et al. 2005). Der extrazelluläre Anteil des Moleküls besitzt fünf Immunglobulin-ähnliche Motive. Die ersten drei Motive sind an der Bindung von Kit und seinem Liganden stem cell factor (SCF) beteiligt (Abbildung 6, nächste Seite; Blechman et al. 1993, Broudy et al. 1998, Lemmon et al. 1997, Taylor und Metcalfe 2000). Das vierte Motiv ist für die Dimerisierung von zwei Kit-Molekülen wichtig, wohingegen die fünfte Immunglobulin-ähnliche Domäne für die proteolytische Spaltung der dimerisierten Kinase von Bedeutung ist (Abbildung 6, nächste Seite). Der intrazelluläre Teil setzt sich aus der Kinasedomäne, die durch eine Kinase-Insert-Sequenz in zwei Abschnitte geteilt wird, und dem C-terminalen Endteil zusammen. Der erste Teil der Kinasedomäne beherbergt die ATP-

Bindungsstelle. Im zweiten Teil der Kinasedomäne ist die Phosphotransferaseaktivität implementiert (Abbildung 6).



In der vorliegenden Untersuchung wurden neben Punktmutationen sechs Isoformen von c-kit entdeckt, die Folge von alternativem Spleissen der prä-mRNA von c-kit sind. Die Insertion der Aminosäure Glutamin an der Aminosäureposition 252, die hier erstmalig bei Patienten mit systemischer Mastozytose beschrieben wurde, ist Folge einer alternativen Spleiss-Konsensussequenz am 3'-Ende (-5 Nukleotide) von Intron 4, die die Hinzufügung der Nukleotidsequenz *cag* am Beginn der kodierenden Sequenz von Exon 5 zur Folge hat. Die Aminosäure Glutamin 252 befindet sich in der dritten immunoglobulinähnlichen Domäne des Kit-Moleküls, die an der Bindung zwischen Kit und dessen endogenem Liganden, dem Stammzellfaktor, beteiligt ist (Abbildung 6, Seite 37). Die Aminosäuren 249-255 sind zwischen den Spezies Mensch und

Schwein konserviert. Bei den Spezies Hund, Katze, Rind und Maus findet sich an dieser Stelle der Aminosäurenkette eine Insertion von einer oder zwei Aminosäuren (Tabelle II, Seite 54ff). Auf der Grundlage der vorliegenden Daten ist nicht zu entscheiden, ob und inwieweit diese Spleissvariante an einer pathologischen Steigerung der Aktivität der betroffenen Mastzellen beteiligt ist.

Zwei Isoformen, die Folge der alternativen Benutzung einer 5`Spleiss-Donor-Stelle sind (Hayashi et al. 1991), sind durch das Vorliegen oder Fehlen der Tetrapeptid-Sequenz GNNK (Glycin – Asparagin – Asparagin – Lysin; Aminosäuren 510-513) im extrazellulären Teil der juxtamembranären Region gekennzeichnet. Eine präferenzielle Expression der GNNK(-)-Isoform wurde in humanen, akuten myeloischen Leukämiezellen (Piao et al. 1994) und in testikulären Keimzell-tumorzellen (Sakuma et al. 2003) beobachtet. Hingegen war bei Patienten mit gastrointestinalen Stromazelltumoren wie in der vorliegenden Untersuchung das Verhältnis von GNNK(-) zu GNNK(+) zwischen pathologischen und normalen Zellen nicht verändert (Theou et al. 2004). Beide Isoformen unterschieden sich in in-vitro-Untersuchungen erheblich in ihren funktionellen Auswirkungen. So besaß die GNNK(-)-Isoform im Gegensatz zur GNNK(+)-Isoform eine tumorgene Potenz (Caruana et al. 1999; Voytyuk et al. 2003). Daher könnte ein Überwiegen der GNNK(-)-Isoform zu einer pathologisch gesteigerten Aktivierung von betroffenen Mastzellen beitragen.

Eine dritte alternative Spleissstelle führt zur Deletion der Aminosäure Serin an Position 715 in der Kinase-Insert-Region der humanen c-kit-Sequenz (Crosier et al. 1993). Die Expression beider Isoformen wurde in neoplastischen und nicht-neoplastisch veränderten Geweben beschrieben (Crosier et al. 1993; Andersson et al. 2002; Fletcher et al. 2002; Lasota et al. 2002). Auch wenn Serin715 in der Aminosäurenkette der Tyrosinkinase Kit innerhalb der Säugetiere nur wenig konserviert ist (Tabelle II, Seite 54ff), ist es dennoch möglich, dass eine bevorzugte Expression der kurzen Isoform als alternativer Mechanismus zur Steigerung der Kit-Signalübertragung führt. S715 befindet sich in der Nähe der mutmaßlichen Tyrosinautophosphorylierungsstellen von Kit an den Aminosäurepositionen 703, 721, 730 und 747 (Tabelle II, Seite 54ff). Es gibt Hinweise darauf, dass die die Phosphorylierungsstellen flankierenden Sequenzen in die Wechselwirkung zwischen Kit und der PI3-Kinase und deren Assoziation mit den Effektorproteinen einbezogen sind (Lev et al. 1992; Reber et al. 2006). Es ist zukünftigen Untersuchungen vorbehalten zu klären, ob die Deletion S715 in Kombination mit anderen genetischen Veränderungen einen Einfluss auf die Mastzellhomöostase nehmen kann.

Im Hinblick auf die möglichen Auswirkungen des alternativen Spleissens ist die Beobachtung bedeutsam, dass für die Expressionsstärke der korrespondierenden Spleissvarianten kein signifikanter Unterschied zwischen dem Patientenkollektiv und dem gesunden Vergleichskollektiv bestand. Dieser Befund legt den Schluß nahe, dass die von der Wildtypsequenz abweichenden Spleissvarianten zumindest für sich alleine keine entscheidende Zunahme des Aktivitätszustands der betroffenen Mastzellen bewirken können. In diesem Zusammenhang ist die Beobachtung von Interesse, dass die Änderung der Kit-Sequenz durch Deletion von GNNK510-513 und S715 nicht mit einer Veränderung der Funktion der Phosphorylierungsdomäne assoziiert war: In Wachstumsassays unterschieden sich Zellen, die selektiv die Isoformen GNNK510-513(-), GNNK510-513(+) und Serin715(-) bzw. Serin715(+) exprimierten, nicht in ihrer Empfindlichkeit gegenüber dem hemmenden Einfluß des Tyrosinkinasehemmstoffs Imatinib (Frost et al. 2002). Diese Beobachtung könnte für die Entscheidung der Frage wichtig sein, ob bei einem individuellen Patienten eine Therapie mit Imatinib die Mastzellerkrankung günstig beeinflussen könnte.

Zusätzlich zu diesen Spleissvarianten fanden wir bei nahezu allen Patienten eine oder mehrere Punktmutationen. Die meisten dieser Punktmutationen wurden hier erstmalig beschrieben. Ihre funktionellen Auswirkungen müssen in zukünftigen Untersuchungen noch im Detail untersucht werden. Eine erste Abschätzung der möglichen biologischen Bedeutung dieser Punktmutationen wurde in der vorliegenden Arbeit über drei Wege versucht:

- (1) Mutationen, die auch bei den gesunden Probanden zu finden sind, sollten für die Auslösung einer pathologischen Überaktivität der betroffenen Mastzellen von untergeordneter Bedeutung sein. Sie werden daher im Folgenden nicht eingehender diskutiert.
- (2) Der Vergleich einer in Frage stehenden, bislang unbekanntes Mutation mit einer bekannten, benachbart liegenden Mutation mit bekannter funktioneller Bedeutung kann einen ersten Anhaltspunkt für die mögliche funktionelle Bedeutung der neuen Mutation liefern. Zu den Punktmutationen, die bislang noch nicht im Zusammenhang mit anderen Erkrankungen in der Kit-Tyrosinkinase beobachtet und hinsichtlich ihrer Auswirkungen auf die Zellaktivität untersucht wurden, kann auf der Grundlage der vorliegenden Daten keine über eine grobe Abschätzung hinausgehende Aussage zur funktionellen Bedeutung gemacht werden.
- (3) Auch die Kenntnis, ob von den Mutationen Aminosäuren betroffen sind, die zwischen den Spezies konserviert sind, liefert einen Anhaltspunkt für deren mögliche physiologische Bedeutung. Zwar ist der Einfluss einer einzelnen Aminosäure auf die Tertiärstruktur des Kit-Proteins und als deren Folge der Einfluss auf die Funktion des Enzyms sehr komplex (Mol et al.

2004). Dennoch gilt ganz allgemein, dass Veränderungen in Bereichen mit hoch konservierten Aminosäuren zu einer Funktionsänderung der Zelle mit einer Abnahme der Autoinhibition oder Zunahme der Autophosphorylierung führen können. In der vorliegenden Arbeit betreffen die meisten Austausche solche Aminosäuren, die zwischen den Spezies hoch konserviert sind (rot markiert in Tabelle II, Seite 54ff). Nur wenige der Punktmutationen, die in Tabelle II aufgelistet sind, befinden sich in relativ variablen Regionen der Aminosäurenkette von Kit und sind von daher möglicherweise nur von geringer funktioneller Bedeutung.

Aktivierende Mutationen im extrazellulären Teil von Kit sind für myeloproliferative Erkrankungen, die akute myeloische Leukämie und gastrointestinale Stromazelltumoren beschrieben worden. Die Punktmutation D52N in Codon 52 (immunglobulinähnliche Domäne 1; das heißt in unmittelbarer Nachbarschaft zu E53K, die in der vorliegenden Untersuchung bei 9 Patienten ausgetauscht war; Tabelle II, Seite 54ff) wurde bei einem Patienten mit chronisch myeloischer Leukämie und bei zwei Patienten mit primärer Fibrose des Knochenmarks gefunden (Nakata et al. 1995). Da dieser Austausch zu einer höheren Empfindlichkeit der Erythrozytenvorläuferzellen gegenüber SCF führte, postulierten die Untersucher, dass diese Mutation die Aktivität der Rezeptorkinase erhöhen könne. Diese Annahme könnte auch für den Austausch E53K gelten, der in der vorliegenden Untersuchung gefunden wurde.

Exon 8-Mutationen in Form der Deletion oder des Austauschs der Aminosäure in Codon 419 in der immunglobulinähnlichen Domäne 5 (Abbildung 6, Seite 37) sind in ca. 20% der Fälle mit akuter myeloischer Leukämie, die mit chromosomalen Auffälligkeiten assoziiert waren, beschrieben worden (Gari et al. 1999; Wang et al. 2005). Diese Mutationen verursachten eine Überaktivität der Rezeptorkinase nach Stimulation mit SCF (Kohl et al. 2005, Nanri et al. 2005).

Aktivierende Mutationen in der transmembranären Domäne (Codon 522 und 530; Abbildung 6, Seite 37) sind für die systemische Mastzytose (Akin et al. 2004) und für die akute myeloische Leukämie (Gari et al. 1999) beschrieben worden. Der Austausch der konservierten Aminosäure M541L, der bei drei Patienten gefunden wurde, könnte einen Polymorphismus darstellen, da er in einer früheren Untersuchung (Fritsche-Polanz et al. 2001) ebenso wie in der vorliegenden Studie auch bei gesunden Personen gefunden wurde. Ob es sich hierbei tatsächlich um einen Polymorphismus handelt, muss jedoch erst in entsprechend konzipierten zukünftigen Untersuchungen geklärt werden.

Die juxtamembranäre Domäne von Kit (Abbildung 6, Seite 37) ist an der negativen Regulierung der Tyrosinkinase-Aktivität des Moleküls entscheidend beteiligt (Übersicht in Roskoski 2005; Tarn et al. 2005). Der Austausch V560G, der bei drei Patienten und in den HMC1-Zellen gefunden wurde, ist früher bereits für HMC1-Zellen und gastrointestinale Stromatumorzellen beschrieben worden (Antonescu et al. 2003; Rubin et al. 2001; Sundstrom et al. 2003; Penzel et al. 2005). Dieser Austausch bedingte eine konstitutive Aktivierung der Rezeptorkinase (Kitayama et al. 1995) und Unterschiede in der Signaltransduktion nach Aktivierung durch SCF verglichen mit dem Wildtyp von Kit (Frost et al. 2002).

Aktivierende Mutationen in der Kinase-Domäne wurden häufig bei systemischer Mastozytose, Core-Factor-Binding-Leukämien, sinunasalen Lymphomen und Seminomen gefunden (Übersicht in Akin und Metcalfe 2004). Insbesondere Austausche der Aminosäure in Position 816 führen zu einer konstitutiven Aktivierung betroffener Mastzellen (Übersicht in Akin 2005). Interessanterweise sind bis zu 30% der Mastozytosepatienten, deren Mastzellen eine Mutation in Codon 816 aufweisen, von einer zusätzlichen hämatologischen Erkrankung betroffen (Valent et al. 2007). Diese Beobachtung legt die Vermutung nahe, dass die entsprechenden Stammzellen der betroffenen Zellreihen ebenfalls eine Mutation in der Kit Tyrosinkinase in Codon 816 besitzen (Akin und Metcalfe 2004). In Anbetracht dieser Befunde könnten die übrigen Austausche in dieser durchweg hoch konservierten Region auch aktivierende Mutationen darstellen.

In zehn Patienten wurde ein vorzeitiges Stop-Codon als Folge der Deletion eines Nukleotids mit Leserasterverschiebung (Patienten #0, #2, #107), oder von Punktmutationen (Patienten #14, #15, #16, #22, #27, #102, #117) entdeckt. Bei den Patienten #22, #27, #102, #107 und #117 lag das Stop-Codon bei den Aminosäure-Positionen 42, 359 bzw. 475 in der extrazellulären Region. Da Fragmente der immunglobulinähnlichen Domänen in der Lage sind, mit vollständigen Kit-Molekülen zu dimerisieren (Blechman et al. 1993, Lev et al. 1992), ist es vorstellbar, dass solche Heterodimere ohne autoinhibitorische Potenz sind, wie dies für die Tyrosinkinase beobachtet wurde, die durch das Fusionsgen BCR-Abl codiert wird (Chu et al. 2006). Bei den anderen Patienten lagen die Stop-Codons in der zweiten Kinase-Domäne (bei den Patienten #14, #15 und #16 bei Aminosäureposition 830; bei den Patienten #0 und #2 bei Aminosäurepositionen 814 bzw. 764). Es scheint möglich, daß diese trunkierten Formen von Kit die strukturelle Fähigkeit besitzen, die Kinasen der Signaltransduktionskette Fyn und Src zu aktivieren, wie dies für so genannte trunkierte Kit-Varianten gezeigt worden ist (Paronetto et al. 2004, weitere Literatur ebenda). Eine alternative Hypothese ist die, dass die Dimerisierung eines trunkierten Kit-

Moleküls mit einem vollständigen Kit-Homomer zu einem Heterodimer mit konstitutiver Aktivierung der Kinaseregion des vollständigen Dimerisationspartners führt.

#### **4.2. Kardiale Befunde bei Patienten mit systemischem Mastzellüberaktivitätssyndrom**

Kardiovaskuläre Beschwerden als Folge der Freisetzung von Mastzellmediatoren sind vielfach beschrieben worden: Angina pectoris durch Auslösung einer akuten myokardialen Ischämie (Dote et al. 1991, Kounis 2006); myokardiale Texturveränderungen (Reid et al. 2007); supra-ventrikuläre Tachykardien und Arrhythmien (Ricciardi et al. 2005, Shibao et al. 2005); Kreislaufkollaps mit und ohne Schocksymptomatik (Vaughan & Jones 1998; Valabhij et al. 2000); Dyspnoe, Synkope und Herz-Kreislaufstillstand (Suchard 1997, Rohr et al. 2005). Allerdings ist es noch weitgehend unklar, welche Mastzellmediatoren im Einzelnen für die Entstehung der verschiedenen Beschwerden verantwortlich sind. Insbesondere der Beteiligung von Mastzellen in der Pathogenese der chronischen Herzinsuffizienz wird in den letzten Jahren vermehrt Aufmerksamkeit geschenkt. So belegen tierexperimentelle Untersuchungen an Nagetieren, dass Mastzellen eine entscheidende Rolle in der Entstehung und der Progression einer Herzinsuffizienz zukommt (Hara et al. 2002; Shiota et al. 2003). Allerdings wurde für den Menschen eine solche Beteiligung von Mastzellen an der Entstehung einer Herzinsuffizienz noch nicht gezeigt.

In einer retrospektiv und prospektiv angelegten randomisierten Studie an 159 Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz führte die Einnahme des H<sub>2</sub>-Histaminrezeptorantagonisten Famotidin (20-40 mg täglich) zu einer Verbesserung der kardialen Beschwerden und des ventrikulären Remodelings (Kim et al. 2006). Diese Beobachtung wurde von den Autoren als Nachweis einer Beteiligung von Histamin und dessen Rezeptoren in der Genese der Herzinsuffizienz gedeutet. Da Mastzellen die wichtigste Quelle für Histamin im Herz darstellen, sind wir in der vorliegenden Untersuchung an 18 Patienten mit systemischer Mastozytose der Frage nachgegangen, welchen Beitrag Mastzellen, und damit indirekt auch Histamin, zur Entstehung einer Herzinsuffizienz leisten. Patienten mit einer systemischen Mastozytose sind für die Untersuchung dieser Fragestellung besonders geeignet, weil bei ihnen die Dichte der Mastzellen im Herz verglichen mit Gesunden erhöht ist und folglich auch eine erhöhte myokardiale Histaminkonzentration zu erwarten ist. Die Infiltration des Herzens mit pathologisch überaktiven Mastzellen zeigte sich bei unseren Patienten im rezidivierenden Auftreten von supra-ventrikulären Tachykardien. Zwar werden diese Tachykardien weniger durch Histamin, sondern vermutlich über eine komplexe Wirkungskette anderer Mastzellmediatoren verursacht (siehe unten); dennoch ist davon auszu-

gehen, dass die aktivierten Mastzellen gleichzeitig mit diesen Mediatoren auch Histamin freisetzen. Es wäre demnach zu erwarten, dass wegen der langen Erkrankungsdauer dieser Patienten (im Median immerhin 14 Jahre) mit dauerhaft erhöhter Histaminkonzentration im Herzen sich eindeutige Zeichen für eine Beteiligung von Histamin an der Störung der Herzmuskelfunktion finden lassen sollten. Jedoch waren in unseren Patienten echokardiografisch der linksventrikuläre diastolische und systolische Durchmesser, die Verkürzungsfraction und die Auswurfraction nicht pathologisch verändert. Folglich war die Prävalenz einer linksventrikulären Dysfunktion für Patienten mit systemischer Mastozytose nicht als höher als für die deutsche Allgemeinbevölkerung (Fischer et al. 2003). Demnach bestätigen unsere Ergebnisse nicht die Schlußfolgerung von Kim et al. (2006), dass eine über längere Zeit hinweg erhöhte myokardiale Histaminkonzentration über einen direkten Effekt an den Histaminrezeptoren auf den Herzmuskelzellen zu einer Herzinsuffizienz führt (Kolck et al. 2007).

Allerdings fand sich in 12 der 18 Patienten eine diastolische linksventrikuläre Dysfunktion, die gemeinhin als erstes Zeichen einer myokardialen Gewebestörung angesehen wird. In 5 dieser 12 Patienten war eine linksventrikuläre Hypertrophie zu verzeichnen. Da andere auslösende Faktoren bei den Patienten fehlten, sind die Veränderungen wahrscheinlich Ausdruck eines remodelierenden Effekts prohypertropher Cytokine und Proteasen und profibrotischer Wachstumsfaktoren, die von Mastzellen gebildet und freigesetzt wurden. Beiden Vorgängen scheint eine Schlüsselstellung in der Entstehung einer Herzinsuffizienz zuzukommen (Shiota et al. 2003). Im Tiermodell konnte an Ratten die zentrale Bedeutung von myokardialen Mastzellen in der Entstehung einer Fibrosierung des Myokards nach einer abgelaufenen Myokarditis aufgezeigt werden. Im weiteren Verlauf entwickelte sich bei den Tieren eine dilatative Kardiomyopathie (Palaniyandi et al. 2005).

In diesem Zusammenhang könnte der von Kim et al. (2006) beobachtete günstige Einfluß des H<sub>2</sub>-Histaminrezeptorantagonisten Famotidin auf eine indirekte Rolle von Histamin in der Pathogenese und Progression einer Herzinsuffizienz hinweisen. Es ist bekannt, dass H<sub>2</sub>-Histaminrezeptorblocker die Aktivität von Mastzellen durch Blockade von H<sub>2</sub>-Histaminrezeptoren auf Mastzellen reduzieren können. Auf diese Weise würde die Freisetzung von solchen Mastzellbotenstoffen reduziert, die entsprechend den tierexperimentellen Befunden und den in dieser Arbeit vorgestellten Befunden am Menschen einen Umbau des Herzmuskelgewebes mit begleitender Funktionsstörung des Herzmuskels bewirken können.

Eine wesentliche Rolle in der Auslösung von Herzrhythmusstörungen bei systemischer Mastzellüberaktivität scheint einer mastzellmediatorbedingten Aktivierung des lokalen Renin-Angiotensin-Systems im Herzen zuzukommen. Die häufig bei der Erkrankung auftretenden Tachykardien und Tachyarrhythmien werden vermutlich nicht durch Histamin induziert, da H<sub>1</sub>- und H<sub>2</sub>-Histaminrezeptorantagonisten diese Rhythmusstörungen therapeutisch nur wenig beeinflussen konnten (Doenicke et al. 1997; Valent et al. 2007). Wahrscheinlich kommt es über die Freisetzung der Mastzellserinproteasen Tryptase und Chymase zu einer ACE-unabhängigen Bildung von Angiotensin II (Silver et al. 2004; Batlle et al. 2006; Mackins et al. 2006; Miyazaki et al. 2006), das dann präsynaptische AT<sub>1</sub>-Rezeptoren erregt (Molderings et al. 1988). In der Folge wird aus den terminalen sympathischen Nervenfasern Noradrenalin freigesetzt, das postsynaptische β<sub>2</sub>-Adrenozeptoren auf den Herzmuskelzellen aktiviert und so eine positiv chronotrope, inotrope und dromotrope Wirkung erzeugt. Vor dem Hintergrund dieser Wirkungskette zeichnet sich ein mögliches neues Indikationsgebiet für AT<sub>1</sub>-Rezeptorantagonisten ab. Durch Blockade der präsynaptischen AT<sub>1</sub>-Rezeptoren wird die Angiotensin II-induzierte Freisetzung von Noradrenalin aus präsynaptischen noradrenergen Nervenendigungen unterbunden und so die Wirkungskette zwischen Mastzellmediatorfreisetzung und Tachykardie unterbrochen. In diesem Zusammenhang sei darauf hingewiesen, dass auf die Gabe von β-Adrenorezeptorenblockern, die bei supraventrikulären Tachyarrhythmien Medikamente der ersten Wahl sind, bei Patienten mit einer systemischen Mastzellüberaktivitätsstörung nach Möglichkeit verzichtet werden sollte. Denn auch so genannte „kardioselektive“ β-Adrenorezeptorenblocker blockieren nicht nur kardiale β-Adrenorezeptoren, sondern auch die β-Adrenorezeptoren auf den Mastzellen. Deren endogene Aktivierung ist jedoch bei Mastzellerkrankungen einer der wenigen Mechanismen, die der unkontrollierten Mediatorfreisetzung entgegenwirken (Gebhardt et al. 2005; Wang und Lau 2006; Peachell 2006) und damit die Intensität der Erkrankung begrenzen können. So berichteten Patienten nach Einnahme eines β-Adrenorezeptorenblockers wiederholt über die Auslösung einer ausgeprägten akuten Mediatorsymptomatik (Shibao et al. 2005; eigene Beobachtungen). Daher sollten bei Patienten mit systemischer Mastozytose in der Therapie der supraventrikulären tachykarden Rhythmusstörung stattdessen Calciumantagonisten vom Verapamiltyp oder, wenn es die Blutsdrucksituation erlaubt, in Off-label-Anwendung eben niedrig dosierte AT<sub>1</sub>-Rezeptorenblocker zur Anwendung kommen. Erste eigene Anwendungen des AT<sub>1</sub>-Rezeptorenblockers Valsartan bei dieser Patientengruppe zeigten ermutigende Therapieerfolge.

### 4.3. Bedeutung der Untersuchungsergebnisse für die klinische Praxis

In der Diagnostik und auch für die Therapie der systemischen Mastozytosen wird die Kenntnis der individuellen Mutationen der Kit-Tyrosinkinase und ggf. anderer Kinasen der Patienten zukünftig aus zwei Gründen eine Schlüsselstellung einnehmen:

- (1) Der Nachweis einer funktionell aktivierenden Mutation in einer der relevanten Kinasen kann wegweisend für die Diagnosestellung sein, wenn neben den bisherigen Routinelaborparametern und bildgebenden Verfahren auch keine eindeutigen krankheitsspezifischen Befunde in der immunhistochemischen Untersuchung von Biopsien aus dem Knochenmark oder dem Gastrointestinaltrakt zu erheben sind. Denn aufgrund der ungleichmäßigen Verteilung der Mastzellen im Biopsiematerial aus Knochenmark und Darm kann eine pathologische Mastzellinfiltration dem histologischen Nachweis entgehen (Butterfield und Li 2004; Johnson et al. 2008).
- (2) Die Schwere der Erkrankung, ihre Empfindlichkeit gegenüber bestimmten therapeutischen Maßnahmen, sowie ihr Verlauf scheinen von der betroffenen Tyrosinkinase sowie von der Art und dem Ort der Veränderung der Aminosäuresequenz der betroffenen Tyrosinkinase abzuhängen. Durch das hier angewandte mutationsanalytische Verfahren ist nicht nur die Möglichkeit gegeben, betroffene Patienten durch Stellung der zutreffenden Diagnose einer adäquaten Therapie zuzuführen, sondern es ist auch möglich, Risikopatienten für eine etwaige Entwicklung bösartiger Zweiterkrankungen rechtzeitig erkennen und entsprechend beraten zu können.

Auch wenn die vollständige Analyse der kodierenden Sequenz des c-kit Gens derzeit nur im Rahmen von Forschungsprogrammen möglich ist, ist eine a-priori-Eingrenzung der Analyse auf das Vorliegen einer Mutation in Codon 816 der Tyrosinkinase Kit nur von begrenztem Wert, da Codon 816, wie vorstehend gezeigt wurde, nur einen von einer Vielzahl von möglichen Mutationsloci darstellt. Das Fehlen einer Mutation in Codon 816 bedeutet daher keineswegs, daß die Tyrosinkinase Kit nicht in einer oder mehreren anderen Regionen Mutationen aufweist, die ebenfalls zu einer pathologischen Aktivierung der betroffenen Mastzellen führen können. Die hier dokumentierten Ergebnisse erlauben nun die Entwicklung einer erweiterten, nicht nur auf Veränderungen in Codon 816 der Tyrosinkinase Kit beschränkten molekularen Diagnostik. Nicht abgeschätzt werden können heute die Auswirkungen von Mutationen in den nicht-kodierenden Intron-Bereichen des c-kit Gens. Aber der Umstand, dass ein alternatives Startcodon in Intron 17 zu einem verkürzten Kit-Molekül führt, das in verschiedenen Zellpopulation funktionell aktiv ist, lässt für die Zukunft zu dieser Fragestellung neue Erkenntnisse erwarten. Und schließlich muss,

wie einige Fallmitteilungen bereits gezeigt haben, zur Auslösung einer pathologischen Aktivität von betroffenen Mastzellen nicht unbedingt die Tyrosinkinase Kit genetisch verändert sein. Patienten ohne nachweisbare Mutation in der kodierenden Sequenz des c-kit-Gens können Träger von funktionell aktiven Mutationen in anderen Kinasen und Signaltransduktionsproteinen sein wie JAK2 (Galderisi et al. 2006), PDGFR $\alpha$  (Gotlib et al. 2006), RASGRP4 (Galli et al. 2005) und Src-Kinasen (Lennartsson et al. 2005).

Nach bisherigem Kenntnisstand scheint das Vorliegen von funktionell aktivierenden Mutationen in den Tyrosinkinasen eine notwendige Vorbedingung für die Ausbildung eines systemischen Mastzellüberaktivitätssyndroms zu sein. Die vielfältigen klinischen Verläufe der Erkrankung von einer Befindlichkeitsstörung bis hin zur invalidisierenden Ausprägung der Beschwerden legen allerdings nahe, dass sie allein nicht ausreichend ist, um eine klinisch ausgeprägte Manifestation der Erkrankung herbeizuführen. Vermutlich stellen die genetischen Veränderungen in den Tyrosinkinasen den „first hit“ in einem „zwei- oder mehr „hit“-Geschehen dar, das den klinischen Phänotyp der Erkrankung mitbestimmt. Da bei 25 unserer 39 untersuchten Patienten die klinische Manifestation der Erkrankung in deren Erinnerung mit einer Infektionserkrankung verbunden war, könnte ein möglicher „second hit“ in einer besonderen, bislang unbekannt Form der Aktivierung des Immunsystems bestehen. Aus den molekulargenetischen Erkenntnissen in der Zusammenschau mit Veränderungen im Immunsystem können möglicherweise neue therapeutische Strategien erwachsen, die eine Verbesserung der bisherigen beschränkten therapeutischen Möglichkeiten (Alfter et al. 2007) darstellen.

### 3. Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beinhaltet die erste vollständige Analyse der kodierenden Sequenz der Tyrosinkinase Kit bei Patienten mit einem systemischen Mastzellüberaktivitätssyndrom. Die Aktivität dieser Tyrosinkinase bestimmt in Mastzellen entscheidend deren Aktivitätszustand. Durch funktionell relevante Mutationen kommt es zu einer Daueraktivierung der Kinase, die unabhängig ist von der Bindung des endogenen Liganden *stem cell factor*, mit der Konsequenz einer gesteigerten Proliferationsfähigkeit der betroffenen Mastzellen, einer Anreicherung von klonalen, mutierten Gewebsmastzellen in Organen und einer erleichterten Mediatorfreisetzung aus ihnen.

**Erstes Ziel** der vorliegenden Arbeit war es, systematisch zu untersuchen, inwieweit ein systemisches Mastzellüberaktivitätssyndrom als Folge von pathologischen Veränderungen auf genetischer Ebene von Mastzellen erklärt werden kann. Die Analyse der mRNA aus Zellen der humanen Mastzelleukämiezelllinie HMC1, in der sich mit unserem Untersuchungsverfahren die für diese Zellen bekannten genetischen Abweichungen, nämlich die Deletion von S715, die GNNK510-513-Spleissvarianten und die Punktmutationen V560G und D816V nachweisen ließen, belegt, dass unser mutationsanalytische Verfahren dazu geeignet war, Abweichungen in der Sequenz der Tyrosinkinase Kit auf mRNA-Ebene zu detektieren.

In der vorliegenden Untersuchung wurden sechs Isoformen des Gens c-kit gefunden (das für die Tyrosinkinase Kit kodiert), die Folge von alternativem Spleissen der prä-mRNA von c-kit sind. Die Isoform insQ252 wird hier erstmalig beschrieben. Zusätzlich zu diesen Spleissvarianten wurden bei nahezu allen Patienten eine oder mehrere Punktmutationen gefunden, die aufgrund ihrer Lage in der Aminosäurekette der Tyrosinkinase geeignet sind, eine pathologische Aktivierung von Kit und damit der betroffenen Mastzellen zu verursachen. Hierdurch könnten sie zu der Intensität und dem Phänotyp der Mastzellerkrankung beitragen.

**Zweitens** sollte der Frage nachgegangen werden, welche dauerhaften strukturellen Veränderungen des Herzmuskelgewebes durch eine erhöhte Mastzellmediatorkonzentration ausgelöst werden können. Der Nachweis einer diastolischen linksventrikulären Dysfunktion im gepulsten Gewebedoppler belegt, dass es bei Patienten mit systemischer Mastozytose zu myokardialen funktionellen und auch strukturellen Veränderungen kommen kann, die in der Folge unter bestimmten Umständen das Entstehen einer chronischen Herzinsuffizienz begünstigen könnten.

## 6. Anhang

**Tabelle I**

*Ergebnisse der molekulargenetischen Analyse der c-kit-Transkripte in der Untersuchungspopulation, in HMC1-Zellen und in gesunden Probanden. "Patient #" und "Vergleichsperson #": laborinterne anonymisierte Bezeichnung der untersuchten Person. Est: expressed sequence tag.*

<b>Patient #</b>	<b>Abweichungen in der von der cDNA abgeleiteten Aminosäuresequenz der Tyrosinkinase Kit gegenüber der Referenzsequenz</b>
<b>0</b>	Ins Q252 Del GNNK510-513 Del S715 Del nt a2356 (Codon 778) ⇒ Leserasterverschiebung mit Stoppcodon an Aminosäureposition 814
<b>1</b>	Ins Q252 Del GNNK510-513 Del S715
<b>2</b>	Ins Q252 Del GNNK510-513 Del S715 Del nt c2311(Codon 764) ⇒ Leserasterverschiebung mit Stoppcodon an Aminosäureposition 764 Ins von 63 Nukleotiden von Est AF95853 an nt2104 Ins von 48 Nukleotiden von Est AF95853 an nt2673
<b>5</b>	Ins Q252 Del GNNK510-513 Del S715
<b>6</b>	L18P P31T V214L Ins Q252 D419G K484R Del GNNK510-513 Del S715 Ins Introns 18, 19, 20 (ex18-intr18-ex19-intr19-ex20-intr20-ex21)
<b>10</b>	Ins Q252 Del GNNK510-513 M541L Y672S E554K Del S715 nt c2608g (Codon 870) stumme Mutation
<b>12</b>	Ins Q252 Del GNNK510-513 Del S715

<b>13</b>	Ins Q252 E270K D327N E338K M351I Del GNNK510-513 Del S715 nt t2094c (Codon 691) stumme Mutation
<b>14</b>	E53K Ins Q252 Del GNNK510-513 Del S715 Stoppcodon an Aminosäureposition 830 nt c2547t (Codon 849) stumme Mutation
<b>15</b>	Ins Q252 Del GNNK510-513 E554K Del S715 E720K M724I E761K H802Y Stoppcodon an Aminosäureposition 830 nt t2205c (Codon 735) stumme Mutation nt c2547t (Codon 849) stumme Mutation
<b>16</b>	E53K K116N Ins Q252 G285R Del GNNK510-513 Del S715 Stoppcodon an Aminosäureposition 830 nt c621t (Codon 200) stumme Mutation nt c645t (Codon 208) stumme Mutation nt t2205c (Codon 728) stumme Mutation
<b>21</b>	E53K Ins Q252 Del GNNK510-513 V560G G658E Del S715
<b>22</b>	E53K Ins Q252 S464L Stoppcodon an Aminosäureposition 475 Del GNNK510-513 Del S715

<b>24</b>	E53K Ins Q252 Del GNNK510-513 V560G Ins R683 Del S715 nt g1404a (Codon 468) stumme Mutation nt t2415c (Codon 805) stumme Mutation
<b>25</b>	Ins Q252 Del GNNK510-513 Del S715 nt g1404a (Codon 468) stumme Mutation nt t2415c (Codon 805) stumme Mutation
<b>26</b>	Ins Q252 Del GNNK510-513 Del S715
<b>27</b>	Ins Q252 Stoppcodon an Aminosäureposition 475 Del GNNK510-513 Del S715
<b>100</b>	Ins Q252 Del GNNK510-513 Del S715
<b>101</b>	Ins Q252 Del GNNK510-513 Del S715
<b>102</b>	Ins Q252 K259E H265Q L276S F355L Stoppcodon an Aminosäureposition 359 Del GNNK510-513 S709A Del S715 A736V D751Y F782S N787D H790R A829T A837V
<b>103</b>	Ins Q252 Del 378-390 mit Leserasterverschiebung Del GNNK510-513 Del S715 in Exon 5 Insertion von 96 bp aus Chromosom 2

<b>104</b>	<p>Ins Q252          Ins nt1282g (Codon 420) mit Leserasterverschiebung          Del GNNK510-513          M541L          Del S715          nt g2607c (Codon 862) stumme Mutation</p>
<b>105</b>	<p>Ins Q252          Del GNNK510-513          Del S715</p>
<b>106</b>	<p>Ins Q252          Del GNNK510-513          Del S715          In Exon 10 Insertion aus Chromosom 2</p>
<b>107</b>	<p>Del nt a153 mit Leserasterverschiebung und Stoppcodon an          Aminosäureposition 42          Ins nt 248a (im Leseraster)          Ins Q252          Del GNNK510-513          Del S715          S821F</p>
<b>108</b>	<p>Ins Q252          Del GNNK510-513          Del S715          nt a768g (Codon 256) stumme Mutation</p>
<b>109</b>	<p>Ins Q252          Del GNNK510-513          Del S715          nt a1659g (Codon 553) stumme Mutation          nt c2415t (Codon 805) stumme Mutation</p>
<b>110</b>	<p>Ins Q252          Del GNNK510-513          Del S715</p>
<b>111</b>	<p>I83D          T84H          E85G          A87G          E88R          A89S          Ins Q252          S396F          Del GNNK510-513          Del S715</p>

<b>112</b>	Ins Q252 Del GNNK510-513 Del S715
<b>113</b>	Ins Q252 Del GNNK510-513 Del S715
<b>114</b>	Ins Q252 Del GNNK510-513 Del S715 nt c70t (Codon 24) stumme Mutation
<b>116</b>	Ins Q252 Del GNNK510-513 Del S715 Zu Beginn von Exon 10 Insertion von $\geq 133$ bp aus Chromosom 5
<b>117</b>	E53K Ins Q252 D419H 475 Stoppcodon Del GNNK510-513 Del S715 Del in Exon 3 Del am Ende von Exon 8
<b>118</b>	E53K Ins Q252 Del GNNK510-513 Del S715 Deletion in Exon 5
<b>119</b>	W8R C12S E53K Ins Q252 Q346L E359V Del GNNK510-513 Del S715 S821F In Exon 3 Ins/Del <8 bp In Exon 7 Ins/Del <10 bp

<b>121</b>	E53K Ins Q252 Del GNNK510-513 Del S715 Komplexe Mutation zwischen Aminosäuren 343-519 nt g243a (Codon 81) stumme Mutation
<b>122</b>	E53K E73R T74R Ins Q252 Del GNNK510-513 M541L Del S715 nt g2607c (Codon 869) stumme Mutation
<b>130</b>	Ins Q252 Del GNNK510-513 Del S715 D816V
<b>HMC1 cells</b>	Ins Q252 Del GNNK510-513 V560G Del S715 D816V
<b>Vergleichs- person #</b>	
<b>7</b>	Ins Q252 Del GNNK510-513 Del S715
<b>8</b>	Ins Q252 Del GNNK510-513 M541L Del S715 L862V nt g2547t (Codon 849) stumme Mutation
<b>9</b>	Ins Q252 Del GNNK510-513
<b>11</b>	Ins Q252 Del GNNK510-513
<b>71</b>	W8R Ins Q252 Del GNNK510-513 Del S715 nt t1116 (Codon 365) stumme Mutation



Mensch VSSSVYSTWKRENSQ--TKLQEKYNSWHHGDFNYERQATLTISSARVNDSGVFMCYANNT 295  
 Macaca VSSSVYSTWKRENSQ--TKLQEKYNSWHHGDFNYERQATLTISSARVNDSGVFMCYANNT 295  
 Schwein VSSSVDSMWIRENSQ--TKAQVKRNSWHQGDFNFLRQEKLTISSARVNDSGVFMCYANNT 294  
 Rind VSSSVDSMWIKENSQQQTKAQMKKNSWHQGDFSYLRQERLTISSARVNDSGVFMCYANNT 285  
 Hund VSSFVDSMWIKENSQQ-TNAQTQSNNSWHHGDFNFERQEKLTISSARVNDSGVFMCYANNT 298  
 Katze VSSSVDSMWIKENSPO-TNAQPQSNNSWHQGDFNFRQERLTISSARVNDSGVFMCYANNT 296  
 Ratte VSTSVDSMWIKLNPQPQSKAQVKRNSWHQGDFNYERQETLTISSARVNDSGVFMCYANNT 297  
 Maus VSTSVNSMWLKMNPQPHIAQVKHNSWHRGDFNYERQETLTISSARVDDSGVFMCYANNT 298

\*\* : \* \* \* : \* . \* : \*\*\*\*\*:\*\*\*: \*\* \* \*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*

Mensch FGSANVT'TTLEVVDKGFINIFPMINT'TVFNVDGENVDLIVEYEAFPKPEHQQWIYMNRTF 355  
 Macaca FGSANVT'TTLEVVDKGFINIFPMINT'TVFNVDGENVDLIVEYEAFPKPEHQQWIYMNRTF 355  
 Schwein FGSANVT'TTLEVVDKGFINIFPMNT'TVFNVDGEDVDLIVEYEAYPKPEHRQWIYMNRTA 354  
 Rind FGSANVT'TTLEVVDKGFINIFPMNT'TVFNVDGENVDLVVEYEAYPKPVHRQWIYMNRTS 345  
 Hund FGSANVT'TTLEVVDKGFINIFPMST'TIFVNDGQNVDLIVEYEAYPKPEHQQWIYMNRTF 358  
 Katze FGSANVT'TTLEVVAKGFINIFPMNT'TIFVNDGENVDLIVEYEAYPKPEHRWVYMNRTL 356  
 Ratte FGSANVT'TTLKVVEKGFINIFVKNT'TVFTDGENVDLVVEFEAYPKPEHQQWIYMNRT 357  
 Maus FGSANVT'TTLKVVEKGFINISPVKNT'TVFTDGENVDLVVEYEAYPKPEHQQWIYMNRTS 358

\*\*\*\*\*:\*\* \*\*\*\*\* \* : .\*\*:\* .\*\*:\*:\*\*\*:\*\*\*:\*\*\*:\*\*\* \* :\*:\*\*\*\*\*

Mensch TDKWEDYPKSENESENIRYVSELHLTRLKGTGGTYTFLVSNSDVNAAIAFNVYVNTKPEI 415  
 Macaca TDKWEDYPKSENESENIRYVSELHLTRLKGTGGTYTFLVSNSDVNASIAFNVYVNTKPEI 415  
 Schwein TDKWEDYPKSENESENIRYVSELHLTRLKGTGGTYTFLVSNADVNSSVTFNVYVNTKPEI 414  
 Rind TDKWDDYPKSENESENIRYVSELHLTRLKGTGGTYTFHVSNSDVNSSVTFNVYVNTKPEI 405  
 Hund TDKWEDYPKSDNESNIRYVSELHLTRLKGNEGGTYTFQVSNSDVNSSVTFNVYVNTKPEI 418  
 Katze TDKWEDYPKSDNESNIRYVSELHLTRLKGNEGGTYTFQVSNSDVNSSVTLNVYVNTKPEI 416  
 Ratte TNRGEDIYKSDNQSNIRYVSELRLTRLKGTGGTYTFLVSNSDVASAVTFDVYVNTKPEI 417  
 Maus ANKGDIYKSDNKSNIRYVNLRLTRLKGTGGTYTFLVSNSDASAVTFNVYVNTKPEI 418

::: .\*\* \*\*:\*:\*\*\*\*\* .\*:\*\*\*\*\* .\*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*:\* .:\*\*\*\*\*

Mensch LTYDRLVNGMLQCVAAGFPEPTIDWYFCPGTEQRCSASVLPVDVQTLNSGPPFGKLVVQ 475  
 Macaca LTYDRLVNGMLQCVAAGFPEPTIDWYFCPGTEQRCSASVLPVDVQTLNASGPPFGKLVVQ 475  
 Schwein LTHDRLMNGMLQCVAAGFPEPTIDWYFCPGTEQRCSVPVGPVDVQIQNSSVSPFGKLVH 474  
 Rind LTHDRLVNGMLQCVAAGFPEPTIDWYFCPGTEQRCSVPVGPVDVQIQNSSVSPFGKLVY 465  
 Hund LTHESLTVNGMLQCVVAGFPEPAVGWYFCPGAQRCVPIGPMQVQNSLSPSGKLVVQ 478  
 Katze LTHESLVSGILQCLVAGFPEPTVDWYFCPGAQRCVPIVGPVPLDVQVQNSVSPSGKLVVQ 476  
 Ratte LTYDRLMNGRLQCVAAGFPEPTIDWYFCTGAEQRCTVPVPPVDVQIQNASVSPFGKLVVQ 477  
 Maus LTYDRLINGMLQCVAGFPEPTIDWYFCTGAEQRCTTPVSPVDVQVQNSVSPFGKLVVQ 478

\*\*:: \* . \* \*\*\*\*\*: . \*\*\*\*\*: .\*\*\*\*\* .\*:\*\*\*\*\* . . . : \*:\*\*\* \* \* . \* \*\*\*\*\*:

Mensch SSIDSSAFKHNGTVECKAYNDVGKTSAYFNFAFKGNNKEQIHPHTLFTPLLIGFVIVAGM 535  
 Macaca SSIDSSAFKHNGTVECKAYNDVGKTSAYFNFAFKGNNKEQIHPHTLFTPLLIGFVIVAGM 535  
 Schwein SSIDYSAFKHNGTVECRAYNDVGKSSAFFNFAFK----EQIHAHTLFTPLLIGFVIAAGM 530  
 Rind STIDDSTFKHNGTVECRAYNDVGKSSAFFNFAFK----EQIHAHTLFTPLLIGFVIAAGL 521  
 Hund SSIDYSAFKHNGTVECRAYNNVGRSSAFFNFAFK----EQIHPHTLFTPLLIGFVIAAGM 534  
 Katze SSIDYSAFKHNGTVECRASNNVGKTSAFFNFAFKGNSKEQMHPHTLFTPLLIGFVIAAGM 536  
 Ratte SSIDSSVFRHNGTVECKASNAVGKSSAFFNFAFKGNSKEQIQPHTLFTPLLIGFVVTAGL 537  
 Maus SSIDSSVFRHNGTVECKASNDVGKSSAFFNFAFK----EQIQAHTLFTPLLIGFVVAAGA 534

\*:\* \* . \*:\*\*\*\*\*:\* \* \*\*:\*:\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*:\* .\*\*\*\*\*: .\*\*

Mensch MCIIVMILTYKYLQKPMYEVQWKVVEEINGNNYVYIDPTQLPYDHKWEFPRNRLSFGKTL 595  
 Macaca MCIIVMILTYKYLQKPMYEVQWKVVEEINGNNYVYIDPTQLPYDHKWEFPRNRLSFGKTL 595  
 Schwein MCIIVMILTYKYLQKPMYEVQWKVVEEINGNNYVYIDPTQLPYDHKWEFPRNRLSFGKTL 590  
 Rind MCIFVMILTYKYLQKPMYEVQWKVVEEINGNNYVYIDPTQLPYDHKWEFPRNRLSFGKTL 581  
 Hund MCIIVMILTYKYLQKPMYEVQWKVVEEINGNNYVYIDPTQLPYDHKWEFPRNRLSFGKTL 594  
 Katze MCIIVMILTYKYLQKPMYEVQWKVVEEINGNNYVYIDPTQLPYDHKWEFPRNRLSFGKTL 596  
 Ratte MGIIVMVLAYKYLQKPMYEVQWKVVEEINGNNYVYIDPTQLPYDHKWEFPRNRLSFGKTL 597  
 Maus MGIIVMVLTYKYLQKPMYEVQWKVVEEINGNNYVYIDPTQLPYDHKWEFPRNRLSFGKTL 594

\* \* :\*:\*:\*\*\*\*\*



Mensch	PAEMYDIMKTCWDADPLKRPTFKQIVQLIEKQISESTNHIYSNLANCSPNRQKP-VVDHS	954
Macaca	PAEMYDIMKTCWDADPLKRPTFKQIVQLIEKQISESTNHIYSNLANCSPNRQKP-VVDHS	954
Schwein	PAEMYDIMKTCWDADPLKRPTFKQIVQLIEKQISESTNHIYSNLANCSPHRENP-AVDHS	949
Rind	PAEMYDIMKTCWDADPLKRPTFKQIVQLIEKQISESTNHIYSNLANCSPHRENP-AVDHS	940
Hund	PAEMYDIMKTCWDADPLKRPTFKQIVQLIEKQISDSTNHIYSNLANCSPNPERP-VVDHS	953
Katze	PAEMYDIMKTCWDADPLKRPTFKQIVQLIEKQISDSTNHIYSNLANCSPNRERPTAVDHC	956
Ratte	PAAMYEVMTKTCWDADPLKRPTFKQVVQLIEKQISDSSKHIYSNLANCNPENPVVVDHS	956
Maus	PAEMYDVMKTCWDADPLKRPTFKQVVQLIEKQISDSTKHIYSNLANCNPENPVVVDHS	953

\*\* \*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*.\*: :.\* .\*\*\*.

Mensch	VRINSVGSTASSSQPLLHDDV	976
Macaca	VRINSVGSTASSSQPLLHDDV	976
Schwein	VRINSVGSSASSTQPLLHEDV	971
Rind	VRINSVGSSASSTQPLLHEDV	962
Hund	VRINSVGSSASSTQPLLHEDV	975
Katze	VRINSVGSSSSTQPLLHEDA	978
Ratte	VRVNSVGSSSSTQPLLHEDA	978
Maus	VRVNSVGSSASSTQPLLHEDA	975

\*\* :\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*. .

## 7. Literaturverzeichnis

Akin C, Metcalfe DD. The biology of Kit in disease and the application of pharmacogenetics. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 114: 13-19.

Akin C, Fumo G, Yavuz AS, Lipsky PE, Neckers L, Metcalfe DD. A novel form of mastocytosis associated with a transmembrane c-Kit mutation and response to imatinib. *Blood* 2004; 103: 3222-3225.

Akin C. Clonality and molecular pathogenesis of mastocytosis. *Acta haematol* 2005; 114: 61-69.

Alfter K, von Kügelgen I, Kolck UW, Noe G, Frieling T, Hertfelder HJ, Oldenburg J, Homann J, Molderings GJ. Zur Diagnose und Therapie der systemischen Mastozytose. *Med Welt* 2007; 58: 621-631.

Andersson J, Sjögren H, Meis-Kindblom JM, Stenman G, Aman P, Kindblom LG. The complexity of KIT gene mutations and chromosome rearrangements and their clinical correlation in gastrointestinal stromal (pacemaker cell) tumors. *Am J Pathol* 2002; 160: 15-22.

Antonescu CR, Sommer G, Sarran L, Tschernyavsky SJ, Riedel E, Woodruff JM, Robson M, Maki R, Brennan MF, Ladanyi M, DeMatteo RP, Besmer P. Association of *KIT* Exon 9 mutations with nongastric primary site and aggressive behaviour: *KIT* mutation analysis and clinical correlates of 120 gastrointestinal stromal tumors. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 3329-3337.

Barbara G, Stanghellini V, De Giorgio R, Cremon C, Cottrell GS, Santini D, Pasquinelli G, Morselli-Labate AM, Grady EF, Bunnett NW, Collins SM, Corinaldesi R. Activated mast cells in proximity to colonic nerves correlate with abdominal pain in irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 2004; 126: 693-702.

Battle M, Roig E, Perez-Villa F, Lario S, Cejudo-Martin P, Garcia-Pras E, Ortiz J, Roque M, Orus J, Rigol M, Heras M, Ramirez J, Jimenez W. Increased expression of the renin-angiotensin system and mast cell density but not of angiotensin-converting enzyme II in late stages of human heart failure. *J Heart Lung Transplant* 2006; 25: 1117-1125.

Blechman JM, Lev S, Brizzi MF, Leitner O, Pegoraro L, Givol D, Yarden Y. Soluble c-kit proteins and antireceptor monoclonal antibodies confine the binding site of the stem cell factor. *J Biol Chem* 1993; 268: 4399-4406.

Broudy VC, Lin NL, Buhning HJ, Komatsu N, Kavangh TJ. Analysis of c-kit receptor dimerization by fluorescence resonance energy transfer. *Blood* 1998; 91: 898-906.

Butterfield JH, Weiler D, Dewald G, Gleich GJ. Establishment of an immature mast cell line from a patient with mast cell leukemia. *Leuk Res* 1988; 12: 345-355.

Butterfield JH, Li CY. Bone marrow biopsies for the diagnosis of systemic mastocytosis - Is one biopsy sufficient? *Am J Clin Pathol* 2004; 121: 264-267.

Caruana G, Cambareri AC, Ashman LK. Isoforms of c-KIT differ in activation of signalling pathways and transformation of NIH3T3 fibroblasts. *Oncogene* 1999; 18: 5573-5581.

Chu SC, Tang JL, Li CC. Dasatinib in chronic myelogenous leukemia. *N Engl J Med* 2006; 355: 1062-1063.

Crivellato E, Beltrami CA, Mallardi F, Ribatti D. The mast cell: an active participant or an innocent bystander? *Histol Histopathol* 2004; 19: 259-270.

Crosier PS, Ricciardi ST, Hall LR, Vitas MR, Clark SC, Crosier KE. Expression of isoforms of the human receptor tyrosine kinase c – kit in leukemic cell lines and acute myeloid leukemia. *Blood* 1993; 82: 1151- 1158.

Doenicke A, Moss J, Toledano A, Hoernecke R, Lorenz W, Ostwald P. Administration of H<sub>1</sub> and H<sub>2</sub> antagonists for chemoprophylaxis: a double-blind, placebo-controlled study in healthy volunteers. *J Clin Pharmacol* 1997; 37: 140-146.

Dote K, Sato H, Tateishi H. Myocardial stunning due to simultaneous multivessel coronary spasms: a review of 5 cases. *J Cardiol* 1991; 21:203-214.

Ehrlich P. Beiträge zur Kenntnis der granulierten Bindegewebszellen und der eosinophilen Leukozyten. Arch Anat Phys 1879; 3: 166-169.

Fischer M, Baessler A, Holmer SR, Muscholl M, Bröckel U, Luchner A, Hense HW, Döring A, Riegger G, Schunkert H. Epidemiologie der linksventrikulären systolischen Dysfunktion in der Allgemeinbevölkerung Deutschlands. Ergebnisse echokardiografischer Untersuchungen einer großen Bevölkerungsstichprobe. Z Kardiol 2003; 92: 294-302.

Fletcher JA, Fletcher CDM, Rubin BP, Ashman LK, Corless CL, Heinrich MC. KIT gene mutations in gastrointestinal stromal tumors. Am J Pathol 2002; 161: 737-738.

Fritsche-Polanz R, Jordan JH, Feix A, Sperr WR. Mutation analysis of c-KIT in patients with myelodysplastic syndromes without mastocytosis and cases of systemic mastocytosis. Br J Haematol 2001; 113: 357-364.

Frost MJ, Ferrao PT, Hughes TP, Ashman LK. Juxtamembrane mutant V560Gkit is more sensitive to imatinib (STI571) compared with wild-type c-kit whereas the kinase domain mutant D816Vkit is resistant. Mol Cancer Ther 2002; 1: 1115-1124.

Galderisi CD, Corless CL, Wolford J, Harrell T, Heinrich MC, Press RD. Simultaneous JAK2 V617F and KIT D816V mutations in systemic mastocytosis. Modern Pathology 2006; 19: 225A-226A.

Galli SJ, Kalesnikoff J, Grimbaldston MA, Piliponsky AM, Williams CM, Tsai M. Mast cells as "tunable" effector and immunoregulatory cells: recent advances. Annu Rev Immunol 2005; 23:749-86.

Gari M, Goodeve A, Wilson G, Winship P, Langabeer S, Linch D, Winship P, Langabeer S, Linch D, Vandenberghe E, Peake I, Reilly J. c-Kit proto- oncogene exon 8 in-frame deletion plus insertion mutations in acute myeloid leukemia. Br J Haematol 1999; 105: 894-900.

Gebhardt T, Gerhard R, Bedoui S, Erpenbeck VJ, Hoffmann MW, Manns MP, Bischoff SC. Beta<sub>2</sub>- adrenoreceptor-mediated suppression of human intestinal mast cell function is caused by disruption of filamentous actin dynamics. Eur J Immunol 2005; 35: 1124- 34.

Gotlib J, Cross NCR, Gilliland DG. Eosinophilic disorders: Molecular pathogenesis, new classification, and modern therapy. *Best Practice Res Clin Haematol* 2006; 19: 535-569.

Hara M, Ono K, Hwang MW, Iwasaki A, Okada M, Nakatani K, Sasayama S, Matsumori A. Evidence for a role of mast cells in the evolution to congestive heart failure. *J Exp Med* 2002; 195: 375-381.

Hayashi S, Kunisada T, Ogawa M, Yamaguchi K, Nishikawa S. Exon skipping by mutation of an authentic splice site of c-kit gene in W/W mouse. *Nucleic Acids Res* 1991; 19: 1267-1271.

Henz BM, Maurer M, Lippert U, Worm M, Babina M. Mast cells as initiators of immunity and host defense. *Exp Dermatol* 2001; 10: 1-10.

Hirota S, Isozaki K, Moriyama Y, Hashimoto K, Nishida T, Ishiguro S, Kawano K, Hanada M, Kurata A, Takeda M, Muhammad Tunio G, Matsuzawa Y, Kanakura Y, Shinomura Y, Kitamura Y. Gain-of-function mutations of c-kit in human gastrointestinal stromal tumors. *Science* 1998; 279: 577-580.

Hermine O, Lortholary O, Leventhal PS, Catteau A, Soppelsa F, Baude C, Cohen-Akenine A, Palmérini F, Hanssens K, Yang Y, Sobol H, Fraytag S, Ghez D, Suarez F, Barete S, Casassus P, Sans B, Arock M, Kinet JP, Dubreuil P, Moussy A. Case-control cohort study of patients' perceptions of disability in mastocytosis. *PLoS ONE* 2008; 3: e2266.

Hongyo T, Li T, Syaifudin M, Baskar R, Ikeda H, Kanakura Y, Aozasa K, Nomura T. Specific c-kit mutations in sinonasal natural killer/T-cell lymphoma in China and Japan. *Cancer Res* 2000; 60: 2345-2347.

Jahanyar J, Youker KA, Loebe M, Assad-Kottner C, Koerner MM, Torre-Amione G, Noon GP. Mast cell-derived cathepsin g: a possible role in the adverse remodeling of the failing human heart. *J Surg Res* 2007;140:199-203.

Johnson MR, Verstovsek S, Jorgensen JL, Manshouri T, Luthra R, Jones DM, Bueso-Ramos CE, Medeiros LJ, Huh YO. Utility of the World Health Organization classification criteria for the

diagnosis of systemic mastocytosis in bone marrow. *Mod Pathol*; doi:10.1038/modpathol.2008.141

Kim J, Ogai A, Nakatani S, Hashimura K, Kanzaki H, Komamura K, Asakura M, Asanuma H, Kitamura S, Tomoike H, Kitakaze M. Impact of blockade of histamine H<sub>2</sub> receptors on chronic heart failure revealed by retrospective and prospective randomized studies. *J Am Coll Cardiol* 2006; 48: 1378-1384.

Kirshenbaum AS, Metcalfe DD. Growth of human mast cells from bone marrow and peripheral blood-derived CD34<sup>+</sup> pluripotent progenitor cells. *Methods Mol Biol* 2005; 315: 105- 111.

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

Kohl TM, Schnittger S, Ellwart JW, Hiddemann W, Spiekermann K. KIT exon 8 mutations associated with core-binding factor (CBF)- acute myeloid leukemia (AML) cause hyperactivation of the receptor in response to stem cell factor. *Blood* 2005; 105: 3319-3321.

Kolck UW, Alfter K, Homann J, von Kügelgen I, Molderings GJ. Cardiac mast cells: implications for heart failure. *J Am Coll Cardiol* 2007; 49: 1107-1108.

Kounis NG. Kounis syndrome (allergic angina and allergic myocardial infarction): a natural paradigm? *Int J Cardiol* 2006; 110: 7-14.

Lasota J, Kopczynski J, Majidi M, Miettinen M. Apparent KIT Ser 715 deletion in GIST mRNA is not detectable in genomic DNA and represents a previously known splice variant of KIT transcript. *Am J Pathol* 2002; 161: 739-741.

Lemmon MA, Pinchasi D, Zhou M, Lax I, Schlessinger J. Kit receptor dimerization is driven by bivalent binding of stem cell factor. *J Biol Chem* 1997; 272: 6311-6317.

Lennartsson J, Jelacic T, Linnekin D, Shivakrupa R. Normal and oncogenic forms of the receptor tyrosine kinase kit. *Stem cells* 2005; 23: 16-43.

Lev S, Yarden Y, Givol D. A recombinant ectodomain of the receptor for the stem cell factor (SCF) retains ligand-induced receptor dimerization and antagonizes SCF-stimulated cellular responses. *J Biol Chem* 1992; 267: 10866-10873.

Li L, Li Y, Reddel SW, Cherrian M, Friend DS, Stevens RL, Krilis SA. Identification of basophilic cells that express mast cell granule proteases in the peripheral blood of asthma, allergy, and drug-reactive patients. *J Immunol* 1998; 161: 5079-5086.

Mackins CJ, Kano S, Seyedi N, Schafer U, Reid AC, Machida T, Silver RB, Levi R. Cardiac mast cell-derived renin promotes local angiotensin formation, norepinephrine release, and arrhythmias in ischemia/reperfusion. *J Clin Invest* 2006; 116: 1063-1070.

McKay DM, Bienenstock J. The interaction between mast cells and nerves in the gastrointestinal tract. *Immunology today* 1994; 15: 533-538.

Miyazaki M, Takai S, Jin D, Muramatsu M. Pathological roles of angiotensin II produced by mast cell chymase and the effects of chymase inhibition in animal models. *Pharmacol Ther* 2006; 112: 668-676.

Mol CD, Dougan DR, Schneider TR, Skene RJ, Kraus ML, Scheibe DN, Snell GP, Zou H, Sang BC, Wilson KP. Structural basis for the autoinhibition and ST571 inhibition of c-kit tyrosine kinase. *J Biol Chem* 2004; 279: 31655-31663.

Molderings GJ, Likungu J, Hentrich F, Göthert M. Facilitatory presynaptic angiotensin receptors on the sympathetic nerves of the human saphenous vein and pulmonary artery. Potential involvement in beta-adrenoceptor-mediated facilitation of noradrenaline release. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 1988; 338: 228-233.

Molderings GJ, Kolck UW, Scheurlen C, Brüss M, Frieling T, Raithel M, Homann J. Die systemische Mastzellerkrankung mit gastrointestinaler betonter Symptomatik - eine Checkliste als Diagnoseinstrument. *Dtsch Med Wochenschr* 2006; 131: 2095-2100.

Molderings GJ, Kolck UW, Scheurlen C, Brüss M, Homann J, von Kügelgen I. Multiple novel alterations in Kit tyrosine kinase in patients with gastrointestinally pronounced systemic mast cell activation disorder. *Scand J Gastroenterol* 2007; 42: 1045-1053.

Nakata Y, Kimura A, Katoh O, Kawaishi K, Hyodo H, Abe K, Kuramoto A, Satow Y. c-Kit point mutation of extracellular domain in patients with myeloproliferative disorders. *Br J Haematol* 1995; 91: 661-663.

Nanri T, Matsuno N, Kawakita T, Mitsuya H, Asou N. Imatinib mesylate for refractory acute myeloblastic leukemia harboring inv(16) and a C-KIT exon 8 mutation. *Leukemia* 2005; 19: 1673-1675.

Palladini G, R Tozzi, S Perlini. Cardiac mast cells in the transition to heart failure: innocent bystanders or key actors? *J Hypertens* 2003; 21: 1823- 1825.

Palaniyandi SS, Watanabe K, Ma m, Tachikawa H, Kodama M, Aizawa Y. Involvement of mast cells in the development of fibrosis in rats with postmyocarditis dilated cardiomyopathy. *Biol Pharm Bull.* 2005; 28: 2128-2132.

Park CH, Joo YE, Choi SK, Rew JS, Kim SJ, Lee MC. Activated mast cells infiltrate in close proximity to enteric nerves in diarrhea-predominant irritable bowel syndrome. *J Korean Med Sci* 2003; 18: 204-210.

Paronetto MP, Farini D, Sammarco I, Maturo G, Vespasiani G, Geremia R, Rossi P, Sette C. Expression of a truncated form of the c-kit tyrosine kinase receptor and activation of Src kinase in human prostatic cancer. *Am J Pathol* 2004; 164: 1243-1251.

Peachell P. Regulation of mast cells by beta-agonists. *Clin Rev Allergy Immunol* 2006; 31: 131-141.

Penzel R, Aulmann S, Mook M, Schwarzbach M, Rieker RJ, Mechttersheimer G. The location of KIT and PDGFRA gene mutations in gastrointestinal stromal tumours is site and phenotype associated. *J Clin Pathol* 2005; 58: 634-639.

Piao X, Curtis JE, Minkin S, Minden MD, Bernstein A. Expression of the Kit and KitA receptor isoforms in human acute myelogenous leukemia. *Blood* 1994; 83: 476-481.

Ricciardi L, Saitta S, Isola S, Bonanno D, Quattocchi P, Giannetto L, Aglio M, Ferlazzo B. Systemic mastocytosis associated with recurrent paroxysmal atrial fibrillation. *Allergy* 2005; 60: 542-543.

Reber L, da Silva CA, Frossard N. Stem cell factor and its receptor c-Kit as targets for inflammatory diseases. *Eur J Pharmacol* 2006; 533: 327-340.

Reid AC, Silver RB, Levi R. Renin: at the heart of the mast cell. *Immunol Rev* 2007; 217: 123-140.

Roberts LJ, Oates JA. Biochemical diagnosis of systemic mast cell disorders. *J Invest Dermatol* 1991; 96: 19S-25S.

Rohr SM, Rich MW, Silver KH. Shortness of breath, syncope, and cardiac arrest caused by systemic mastocytosis. *Ann Emerg Med* 2005; 45: 592- 594

Roskoski R. Signaling by Kit protein-tyrosine kinase - The stem cell factor receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 337: 1-13.

Rubin BP, Singer S, Tsao C, Duensing A, Lux ML, Ruiz R, Hibbard MK, Chen CJ, Xiao S, Tuveson DA, Demetri GD, Fletcher CD, Fletcher JA. KIT activation is a ubiquitous feature of gastrointestinal stromal tumors. *Cancer Res* 2001; 61: 8118-8121.

Sakuma Y, Sakurai S, Oguni S, Hironaka M, Saito K. Alterations of the c-kit gene in testicular germ cell tumors. *Cancer Sci* 2003; 94: 486- 491.

Sayed BA, Christy A, Quirion MR, Brown MA. The master switch: the role of mast cells in autoimmunity and tolerance. *Annu Rev Immunol*. 2008; 26:705-739.

Schumm M, Lang P, Taylor G, Kuçi S, Klingebiel T, Bühring HJ, Geiselhart A, Niethammer D, Handgretinger R. Isolation of highly purified autologous and allogeneic peripheral CD34+ cells using the CliniMACS device. *J Hematother* 1999; 8: 209-218.

Shibao C, Arzubaiaga C, Roberts LJ, Raj S, Black B, Harris P, Biaggioni I. Hyperadrenergic postural tachycardia syndrome in mast cell activation disorders. *Hypertension* 2005; 45: 385- 390.

Shiota N, Rysa J, Kovanen PT, Ruskoaho H, Kokkonen J, Lindstedt K. A role for cardiac mast cells in the pathogenesis of hypertensive heart disease. *J Hypertens* 2003; 21: 1935-1944.

Silver RB, Reid AC, Mackins CJ, Askwith T, Schaefer U, Herzlinger D, Levi R. Mast cells: A unique source of renin. *Proc Natl Acad Sci* 2004; 101: 13607-13612.

Suchard JR. Recurrent near-synkope with flushing. *Acad Emerg Med* 1997; 4: 718-724.

Sugo T, Tachimoto H, Chikatsu T, Murakami Y, Kikukawa Y, Sato S, Kikuchi K, Nagi T, Harada M, Ogi K, Ebisawa M, Mori M. Identification of a lysophosphatidylserine receptor on mast cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 341: 1078-1087.

Sundstrom M, Vliagoftis H, Karlberg P, Butterfield JH, Nilsson K, Metcalfe DD, Nilsson G. Functional and phenotypic studies of two variants of a human mast cell line with a distinct set of mutations in the c-kit proto-oncogene. *Immunology* 2003; 108: 89-97.

Tarn C, Merkel E, Canutescu AA, Shen W, Skorobogatko Y, Heslin MJ, Eisenberg B, Birbe R, Patchefsky A, Dunbrack R, Arnoletti JP, von Mehren M, Godwin AK. Analysis of KIT mutations in sporadic and familial gastrointestinal stromal tumors: therapeutic implications through protein modeling. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 3668-3676.

Taylor ML, Metcalfe DD. Kit signal transduction. *Mast Cell Disorders* 2000; 14: 517-535.

Theoharides TC. The Mast Cell: A Neuroimmunoendocrine Master Player. *Int J Tiss Reac* 1996; XVIII: 1-21.

Theoharides TC, Kempuraj D, Iliopoulou BP. Mast cells, T cells, and inhibition by luteolin: implications for the pathogenesis and treatment of multiple sclerosis. *Adv Exp Med Biol.* 2007; 601: 423-430.

Theou N, Tabone S, Saffroy R, Le Cesne A, Julie C, Cortez A, Lavergne- Slove A, Debuire B, Lemoine A, Emile JF. High expression of both mutant and wild type alleles of c-kit in gastrointestinal stromal tumors. *Biochimica Biophysica Acta* 2004; 1688: 250- 256.

Valabhji J, Robinson S, Johnston D, Bellamy M, Davis W, Bain BJ. Unexplained loss of consciousness: systemic mastocytosis. *J R Soc Med* 2000; 93: 141-142.

Valent P, Akin C, Sperr WR, Horny HP, Arock M, Lechner K, Bennett JM, Metcalfe DD. Diagnosis and treatment of systemic mastocytosis: state of the art. *Br J Haematol* 2003; 122: 659-717.

Valent P, Ghannadan M, Akin C, Krauth MT, Selzer E, Mayerhofer M, Sperr WR, Arock M, Samorapoompichit P, Horny HP, Metcalfe DD. On the way to targeted therapy of mast cell neoplasms: identification of molecular targets in neoplastic mast cells and avaluation of arising treatment concepts. *Eur J Clin Invest* 2004; 34 (Suppl 2): 41-52.

Valent P, Akin C, Escribano L, Fodinger M, Hartmann K, Brockow K, Castells M, Sperr WR, Kluin-Nelemans HC, Hamdy NA, Lortholary O, Robyn J, van Doormaal J, Sotlar K, Hauswirth AW, Arock M, Hermine O, Hellmann A, Triggiani M, Niedoszytko M, Schwartz LB, Orfao A, Horny HP, Metcalfe DD. Standards and standardization in mastocytosis: consensus statements on diagnostics, treatment recommendations and response criteria. *Eur J Clin Invest* 2007; 37: 435-453.

Vaughan ST, Jones GN. Systemic mastocytosis presenting as profound cardiovascular collapse during anaesthesia. *Anaesthesia* 1998; 53: 804-807.

Voelker W, Koch D, Flachskampf FA, Nixdorff U, Buck TB, Hoffmann R, Heinemann S, Franke A, v. Bardeleben S, Hagendorff A, Hoffmeister HM, Funck RC, Angermann C, Engberding R, v. Bibra H, Erbel R, Fehske W. A structured report data set for documentation of echocardiographic studies - Update 2004. *Z Kardiol* 2004; 93: 987-1004.

Voytyuk O, Lennartsson J, Mogi A, Caruana G, Courtneidge S, Ashman LK, Rönstrand L. Src family kinases are involved in the differential signaling from two splice forms of c-kit. *J Biol Chem* 2003; 278: 9159-9166.

Wang YY, Zhou GB, Yin T, Chen B, Shi JY, Liang WX, Jin XL, You JH, Yang G, Shen ZX, Chen J, Xiong SM, Chen GQ, Xu F, Liu YW, Chen Z, Chen SJ. AML1-ETO and C-KIT mutation/overexpression in t(8;21) leukemia: implication in stepwise leukemogenesis and response to Gleevec. *Proc Natl Acad Sci* 2005; 102: 1104-1109.

Wang XS, Lau HY. Beta-adrenoceptor-mediated inhibition of mediator release from human peripheral blood-derived mast cells. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2006; 33: 746-750.

Wang X, Sam SW, Yip KH, Lau HYA. Functional characterization of human mast cells cultured from adult peripheral blood. *Inter Immunopharmacol* 2006; 6: 839-847.

## **8. Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich meinem Doktorvater, Herrn apl. Professor Dr. med. Gerhard J. Molderings für die Überlassung dieses hochaktuellen Themas und seine intensive Betreuung danken. Dank gebührt auch den technischen Mitarbeiterinnen des *Instituts für Pharmakologie und Toxikologie*, die mich in die molekularbiologischen Techniken eingearbeitet haben und mir jederzeit helfend zur Seite standen. Darüberhinaus möchte ich meinem Chef, Herrn Professor Dr. med. Jürgen Homann dafür danken, dass er mich während dieser Zeit wohlwollend unterstützte, immer verständnisvoll meine „Laborzeiten“ akzeptierte und mich darüber hinaus konstruktiv-kritisch bei diesem Projekt begleitete. Zu guter letzt bin ich meiner Familie zutiefst dankbar – und das nicht nur, weil sie mich ständig unterstützte und aufgebaut hat, wenn es besonders nötig war, sondern weil dies geschah, obwohl dadurch meine Zeit in der Familie deutlich reduziert war.

## 9. Lebenslauf

Ulrich Walter Kolck

### Persönliche Angaben:

### Schulische Ausbildung

### Medizinische Ausbildung

### Beruflicher Werdegang

#### Veröffentlichungen:

**Kolck UW**, Zaugg CE, Erne P. Pharmakologische Grundlagen der medikamentösen antihypertensiven Therapie (Pharmacological basis of antihypertensive drug therapy). Schweiz Rundsch Med Prax 2004; 93: 847–856.

Jeker U, **Kolck UW**, Erne P. Antihypertensiva Dosis erhöhen, wechseln oder kombinieren? Wie Sie Therapieversager doch noch ans Ziel bringen. CardioVasc (Schweizer Ausgabe) 2004; 6: 13-16.

Molderings GJ, **Kolck U**, Scheurlen C, Brüss M, Frieling T, Raithel M, Homann J. Die systemische Mastzellerkrankung mit gastrointestinal betonter Symptomatik - eine Checkliste als Diagnoseinstrument. Dtsch Med Wochenschr 2006; 131: 2095-2100.

Alfter K, von Kügelgen I, **Kolck UW**, Noe G, Frieling T, Hertfelder HJ, Oldenburg J., Homann J, Molderings GJ. Zur Diagnose und Therapie der systemischen Mastozytose. (Diagnostics and therapy of systemic mastocytosis.) Med Welt 2007; 58: 621-631.

**Kolck UW**, Alfter K, Homann J, von Kügelgen I, Molderings GJ. Cardiac

mast cells: implications for heart failure. *J Am Coll Cardiol* 2007; 49: 1107-1108.

**Kolck UW**, Wipperfurth R, Homann J, Erne P. Embolization of cement during vertebral column surgery (vertebroplasty). An echocardiographic study and case report. *Eur J Echocardiogr* 2007; 8, Suppl. 1; 964.

Molderings GJ, **Kolck UW**, Scheurlen C, Brüss M, Homann J, von Kügelgen I. Multiple novel alterations in Kit tyrosine kinase in patients with gastrointestinally pronounced systemic mast cell activation disorder. *Scand J Gastroenterol* 2007; 42: 1045-1053.

Alfter K, von Kügelgen I, Haenisch B, Frieling T, Hülsdonk A, Haars U, Rolfs A, Noe G, **Kolck UW**, Homann J, Molderings GJ. New aspects of liver abnormalities as part of the systemic mast cell activation syndrome. *Liver Int.* 2009; 29(2):181-186. Epub 2008 Jul 23.

Molderings GJ, Solleder G, **Kolck UW**, Homann J, Schröder D, von Kügelgen I, Vorreuther R. *Urol Res.* 2009 Aug;37(4):227-229. Epub 2009 Jun 10.



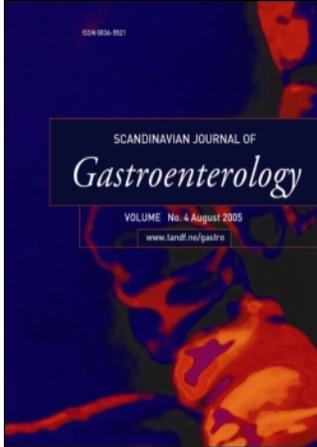
Bonn-Bad Godesberg, im August 2009

**10. Publikationen, die aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit hervorgegangen sind**

Molderings GJ, **Kolck UW**, Scheurlen C, Brüss M, Homann J, von Kügelgen I. Multiple novel alterations in Kit tyrosine kinase in patients with gastrointestinally pronounced systemic mast cell activation disorder. Scand J Gastroenterol 2007; 42: 1045-1053.

**Kolck UW**, Alfter K, Homann J, von Kügelgen I, Molderings GJ. Cardiac mast cells: implications for heart failure. J Am Coll Cardiol 2007; 49: 1107-1108.

This article was downloaded by:[ULB Bonn Abteilungsbibliothek]  
On: 21 August 2007  
Access Details: [subscription number 731637987]  
Publisher: Informa Healthcare  
Informa Ltd Registered in England and Wales Registered Number: 1072954  
Registered office: Mortimer House, 37-41 Mortimer Street, London W1T 3JH, UK



## Scandinavian Journal of Gastroenterology

Publication details, including instructions for authors and subscription information:  
<http://www.informaworld.com/smpp/title~content=t713690387>

### Multiple novel alterations in **Kit** tyrosine kinase in patients with gastrointestinally pronounced systemic mast cell activation disorder

Online Publication Date: 01 January 2007

To cite this Article: Molderings, Gerhard J., Kolck, Ulrich W., Scheurle, Christian, Brüss, Michael, Homann, Jürgen and Von Kügelgen, Ivar (2007) 'Multiple novel alterations in **Kit** tyrosine kinase in patients with gastrointestinally pronounced systemic mast cell activation disorder', *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 42:9, 1045 - 1053

To link to this article: DOI: 10.1080/00365520701245744

URL: <http://dx.doi.org/10.1080/00365520701245744>

PLEASE SCROLL DOWN FOR ARTICLE

Full terms and conditions of use: <http://www.informaworld.com/terms-and-conditions-of-access.pdf>

This article maybe used for research, teaching and private study purposes. Any substantial or systematic reproduction, re-distribution, re-selling, loan or sub-licensing, systematic supply or distribution in any form to anyone is expressly forbidden.

The publisher does not give any warranty express or implied or make any representation that the contents will be complete or accurate or up to date. The accuracy of any instructions, formulae and drug doses should be independently verified with primary sources. The publisher shall not be liable for any loss, actions, claims, proceedings, demand or costs or damages whatsoever or howsoever caused arising directly or indirectly in connection with or arising out of the use of this material.

© Taylor and Francis 2007

## **Cardiac Mast Cells: Implications for Heart Failure**

Ulrich W. Kolck, Kirsten Alfter, Jürgen Homann, Ivar von Kügelgen, and Gerhard J. Molderings

*J. Am. Coll. Cardiol.* 2007;49;1107; originally published online Feb 23, 2007;  
doi:10.1016/j.jacc.2006.12.018

**This information is current as of October 5, 2009**

The online version of this article, along with updated information and services, is located on the World Wide Web at:

<http://content.onlinejacc.org/cgi/content/full/49/10/1107>

**JACC**

*JOURNAL of the AMERICAN COLLEGE of CARDIOLOGY*

