

Fakultät für Medizin

## **Dermaohistopathologische Charakterisierung der Mastozytose**

**Julia Katharina Gebhard**

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin  
der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades einer  
**Doktorin der Medizin**  
genehmigten Dissertation.

**Vorsitz:** Prof. Dr. Gabriele Multhoff

**Prüfer\*innen der Dissertation:**

1. apl. Prof. Dr. Knut Brockow
2. Prof. Dr. Uta Behrends

Die Dissertation wurde am 21.01.21 bei der Technischen Universität München  
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 12.10.2021  
angenommen.

# Inhaltsverzeichnis

<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>iii</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>iv</b>
<b>Abkürzungen</b> .....	<b>v</b>
<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>vii</b>
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 Mastzellen und Mastzellerkrankungen.....	1
1.1.1 Entdeckung von Mastzellen .....	1
1.1.2 Eigenschaften und Funktionen der Mastzelle .....	3
1.1.3 Mastzellerkrankungen .....	7
1.2 Fragestellung und Studienkonzeption .....	13
1.2.1 Fragestellung .....	13
1.2.2 Studienkonzeption .....	14
<b>2 Material und Methoden</b> .....	<b>20</b>
2.1 Patient*innen .....	20
2.2 Hautproben.....	20
2.3 Immunhistochemische Färbungen .....	20
2.4 Mikroskopische Auswertung.....	21
2.4.1 Tryptase .....	21
2.4.2 CD117 .....	24
2.4.3 CD2 und CD25 .....	24
2.4.4 CD3.....	24
2.4.5 CD4 und CD8 .....	24
2.4.6 CD14 .....	24
2.4.7 CD20 .....	25
2.4.8 CD30 .....	25
2.4.9 CD45 .....	25
2.4.10 CD68 .....	25
2.4.11 CD79a .....	25
2.5 KIT D816V - Mutationsanalyse .....	25
2.6 Statistische Auswertung .....	26
2.6.1 Deskriptive Statistik .....	26
2.6.2 Analytische Statistik.....	26
2.7 Labormaterial und Geräte .....	29
<b>3 Ergebnisse</b> .....	<b>33</b>
3.1 Allgemeine Beschreibung der Studienkohorte .....	33
3.1.1 Zusammensetzung der Patient*innenkohorte und Kontrollkohorte .....	33
3.1.2 Alters- und Geschlechtsverteilung .....	33
3.2 Dermatohistopathologische Merkmale.....	35
3.2.1 Mastzellichte .....	35
3.2.2 Mastzellverteilung.....	36

3.2.3	Phänotypisierung der Mastzellen.....	40
3.2.4	Begleitinfiltat .....	46
3.2.5	Basale Pigmentierung .....	50
3.3	KIT D816V Mutation.....	53
3.4	Vorschlag eines diagnostischen Algorithmus .....	53
3.4.1	Entwicklung .....	53
3.4.2	Empfohlener Algorithmus .....	57
3.5	Anwendung des Algorithmus auf Fälle mit bislang unklarer Diagnose.....	58
<b>4</b>	<b>Diskussion und Schlussfolgerungen</b> .....	<b>61</b>
4.1	Diskussion der Methoden .....	61
4.1.1	Kohortenauswahl.....	61
4.1.2	Immunhistochemie .....	62
4.1.3	Mikroskopische Auswertung.....	62
4.1.4	Mutationsanalyse .....	62
4.2	Diskussion der Ergebnisse.....	63
4.2.1	Mastzellichte, Mastzellverteilung, Mastzellphänotyp .....	63
4.2.2	Begleitinfiltat .....	68
4.2.3	Basale Pigmentierung .....	69
4.2.4	KIT D816V Mutationsanalyse .....	69
4.2.5	Empfohlener diagnostischer Algorithmus .....	70
4.3	Schlussfolgerungen und Ausblick.....	71
<b>A</b>	<b>Literatur</b> .....	<b>73</b>
<b>B</b>	<b>Präsentationen</b> .....	<b>89</b>
B.1	Posterpräsentationen .....	89
B.2	Vorträge .....	89
<b>C</b>	<b>Danksagung</b> .....	<b>90</b>

# Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	WHO-Klassifikation der Mastozytose.....	8
Tabelle 2	Klinische Symptome bei Mastozytose .....	12
Tabelle 3	WHO-Kriterien der systemischen Mastozytose .....	13
Tabelle 4	Immunhistochemische Marker.....	16
Tabelle 5	Immunhistochemische Färbungen .....	22
Tabelle 6	Antikörper, Reagenzien und sonstige Materialien.....	30
Tabelle 7	Verwendete Geräte .....	32
Tabelle 8	Geschlechterverteilung der Studienkohorte.....	33
Tabelle 9	Altersverteilung der Studienkohorte .....	34
Tabelle 10	Mastzell-dichte (Gesamt), Tryptase-Färbung .....	36
Tabelle 11	Mastzell-dichte (Gesamt), CD117-Färbung .....	37
Tabelle 12	Mastzell-dichte getrennt nach Hautebene, Tryptase-Färbung .....	37
Tabelle 13	Mastzell-dichte getrennt nach Hautebene, Tryptase-Färbung, Kontrollsub- gruppen.....	38
Tabelle 14	Mastzell-dichte getrennt nach Hautebene, CD117-Färbung.....	40
Tabelle 15	Mastzell-dichte getrennt nach Hautebene, CD117-Färbung, Kontrollsubgruppen	41
Tabelle 16	Mastzellverteilung.....	43
Tabelle 17	Mastzellverteilung in den Kontrollsubgruppen.....	44
Tabelle 18	T-Zellverteilung.....	48
Tabelle 19	T-Zellverteilung in den Kontrollsubgruppen.....	49
Tabelle 20	Pigmentierungsgrad.....	50

# Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Meilensteine der Mastzellforschung .....	2
Abbildung 2	Klinische Beispiele für Mastozytose .....	11
Abbildung 3	Chronologische Darstellung der Studienkonzeption und -durchführung .....	15
Abbildung 4	Referenzbilder zur semiquantitativen Einteilung des Pigmentierungsgrades der basalen Epidermis .....	23
Abbildung 5	Zusammensetzung der Studienkohorte .....	34
Abbildung 6	Mastzelldichte (gesamt).....	37
Abbildung 7	Mastzelldichte getrennt nach Hautebene .....	39
Abbildung 8	Beispiele für Mastzell-Verteilungsmuster.....	42
Abbildung 9	Mastzellgröße .....	45
Abbildung 10	T-Zell-dichte .....	47
Abbildung 11	Fallbeispiel eines typischen histopathologischen Befundes bei MPKM .....	51
Abbildung 12	Fallbeispiel eines typischen histopathologischen Befundes bei einem Mastozytom .....	52
Abbildung 13	Basale Pigmentierung der Epidermis .....	53
Abbildung 14	Beispiele für verschiedene Mastzell-dichten .....	55
Abbildung 15	Graphische Darstellung der Ergebnisse aus dem Random Forest Modell mit KIT D816V-Mutationsstatus als Vergleichsparameter .....	56
Abbildung 16	Graphische Darstellung der Ergebnisse aus dem Random Forest Modell (ohne KIT D816V Mutationsstatus) .....	56
Abbildung 17	Vorschlag eines diagnostischen Algorithmus für Mastozytose der Haut ....	59
Abbildung 18	Zuordnung der bisher unklaren Fälle auf Grundlage des neu entwickelten diagnostischen Algorithmus .....	60

# Abkürzungen

- CC-Chemokin-Ligand** Cystein-Cystein-Chemokin-Ligand
- CD** Cluster of differentiation (engl.): Oberbegriff für verschiedene immunphänotypische Oberflächenmerkmale, z.B. auf Immunzellen (meist Glykoproteine)
- cKIT** Protoonkogen, welches für die Rezeptortyrosinkinase des Stammzellfaktors kodiert
- Ct-Wert** cycle threshold (engl.) - Wert: Grenzwert für die Anzahl von Replikationszyklen bei der qPCR
- DKM** Diffuse kutane Mastozytose
- engl.** englischer Begriff
- ER1/ER2** Epitope Retrieval Lösung 1/2
- Fc $\epsilon$ R** Fragment crystallizable region  $\epsilon$  Rezeptor (engl.): Hochaffiner Rezeptor für die F<sub>C</sub>-Region von IgE
- FFPE** Formalin fixiert Paraffin eingebettet
- GINI-Index** Ungleichverteilungsindex, der nach dem italienischen Statistiker Corrado Gini benannt wurde
- H1/H2-Rezeptor** Histamin-Rezeptoren 1 und 2
- HMC1-Zellen** Human Mast Cell Line 1 (engl.) Zellen: Humane Mastzelllinie zur Zellkultur
- HPF** High power field (engl.): Ausschnitt eines mikroskopischen Präparats, der bei 400-facher Vergrößerung unter einem Mikroskop sichtbar ist
- IgE** Immunglobulin E
- IHC** Immunhistochemie
- IL** Interleukin
- insb.** insbesondere
- ISM** Indolent systemische Mastozytose
- ITAM** Immunorezeptor Tyrosin-basierte Aktivierungsmotive
- IQA** Interquartilsabstand
- JAK/STAT** Januskinase/Signal Transducers and Activators of Transcription (engl.) = Signalüberträger und Transkriptionsaktivator
- KM** Kutane Mastozytose
- KIT D816V** Mutation der Rezeptortyrosinkinase KIT, bei der an Position 816 statt Valin Aspartat vorliegt.
- Lyn** Tyrosinkinase aus der Src (cellular Sarcoma)-Familie
- MHK** Major Histokompatibilitätskomplex
- MIS** „Mastocytosis in the Skin“ (engl.): Mastozytose der Haut (unabhängig von einer möglichen Systembeteiligung)
- MPKM** Makulopapulöse kutane Mastozytose
- MZ** Mastzelle
- MZ<sub>TC</sub>** Mastzellen, die Tryptase und Chymase enthalten
- MZ<sub>T</sub>** Mastzellen, die Tryptase enthalten
- n.s.** nicht signifikant

**OR** Odds Ratio  
**PAF** Plättchenaktivierender Faktor  
**PAMP** Pathogenassoziierte molekulare Muster  
**PRR** Pattern recognition receptor (engl.) = Mustererkennungsrezeptoren  
**qPCR** quantitative Polymerase Chain Reaction (engl.) = quantitative Polymerase-Kettenreaktion  
**RAS/RAF/MAPK** Rat sarcoma protein/Rapidly accelerated fibrosarcoma protein/Mitogen activated protein kinase (engl.) = Rattenfibrosarkom Protein / rasch voranschreitendes Rattenfibrosarkom Protein / Mitogen aktivierte Proteinkinase  
**SCF** Stemcell factor (engl.) = Stammzellefaktor  
**SCF-R** Stemcell factor Rezeptor (engl.) = Stammzellefaktor Rezeptor  
**SFZ** Sehfeldzahl  
**SM** Systemische Mastozytose  
**sog.** sogenannt  
**Syk** Tyrosinkinase aus der Src (cellular Sarcoma)-Familie  
**TH1/TH2** T-Helferzellen Typ 1 und Typ 2  
**TLR** Toll like Receptor (engl.), spezieller Rezeptor aus der Familie der PRR  
**u.v.m.** und viel(e) mehr  
**UP** Urticaria pigmentosa  
**WHO** World Health Organization (engl.) = Weltgesundheitsorganisation

# Zusammenfassung

**Hintergrund** Unter dem Begriff Mastozytose wird eine heterogene Gruppe von Erkrankungen zusammengefasst, bei denen es zu einer Vermehrung und Ansammlung von Mastzellen in einem oder mehreren Organsystemen kommt. Man unterscheidet rein kutane Formen von systemischen Formen, die mit oder ohne Hautbeteiligung einhergehen können. Während für die Diagnosestellung einer systemischen Mastozytose aus den Befunden einer Knochenmarksbiopsie klar definierte Kriterien durch die WHO festgelegt wurden, existieren für die Diagnose einer Mastozytose der Haut (engl. Mastocytosis in the skin = MIS) bislang keine vergleichbar belastbaren Diagnosekriterien. Da auch im Rahmen anderer Hauterkrankungen vermehrt Mastzellen vorkommen können, ist die histologische Diagnosestellung einer MIS häufig nicht eindeutig möglich. Ziel dieser Studie war es daher, spezifische Diagnosekriterien für MIS im Vergleich zu anderen Hauterkrankungen, die zu Mastzellhyperplasie führen können, zu definieren.

**Material und Methoden** 41 MIS-Fälle, 36 Kontrollfälle (Urtikaria, Ekzem, Pruritus sine materia, unspezifisch veränderte, überschüssige Haut aus dermatologischen Operationen) und 17 Fälle mit bislang unklarer Diagnose wurden immunhistochemisch aufgearbeitet und mikroskopisch ausgewertet. Dabei wurden Marker für Mastzellen (CD117, Tryptase), atypische Mastzellen (CD2, CD25, CD30), lymphozytäre Zellen (CD3, CD4, CD8, CD20, CD79a) sowie CD45, CD68 und CD14 (Monozyten, Makrophagen, Langerhanszellen, dendritische Zellen) verwendet. Nach einer ersten vorläufigen Auswertung wurden die als besonders relevant erscheinenden Marker CD117, Tryptase, CD2, CD25 und CD3 ausgewählt. Ergänzend wurden die Proben mittels quantitativer real-time PCR (qPCR) auf das Vorkommen der für Mastozytose typischen KIT D816V Mutation untersucht.

**Ergebnisse** Folgende Kriterien zur Diagnostik von MIS stellten sich als besonders relevant heraus: Mastzellichte in den subepidermalen 300 µm der Haut (Cut-off 140 MZ/mm<sup>2</sup> mit Spezifität von 97,2%), mittlere bis starke basale Hyperpigmentierung der Epidermis und interstitielles Vorkommen von Mastzellen bzw. Vorliegen von Mastzellclustern. Das Vorkommen von T-Zellen im Infiltrat ist häufig, aber unspezifisch. Die Durchführung der KIT D816V Mutationsanalyse ist eine sinnvolle Ergänzung der Diagnostik, falls durch das klinische Bild und die Histopathologie keine eindeutige Diagnose gestellt werden kann. Aus der Gruppe mit bislang unklarer Diagnose konnten wir mit unseren neuen histologischen Kriterien 52,9% einer der Kategorien MIS oder nicht-MIS zuordnen. Weitere 29,4% konnten durch die KIT Mutation eingeteilt werden.

**Schlussfolgerung** Der in dieser Studie erarbeitete diagnostische Algorithmus ist in der Identifikation von MIS deutlich zuverlässiger im Vergleich zu den bisherigen Diagnosekriterien mit Majorkriterium „Typische Hautveränderungen oder Darier-Zeichen positiv bei Ausschluss anderer Hauterkrankungen“ und den beiden Minorkriterien „monomorphes MZ-Infiltrat mit

$\geq 20$  MZ/HPF oder Cluster  $\geq 15$  MZ“ bzw. „Vorliegen einer KIT D816V Mutation“.

# 1. Einleitung

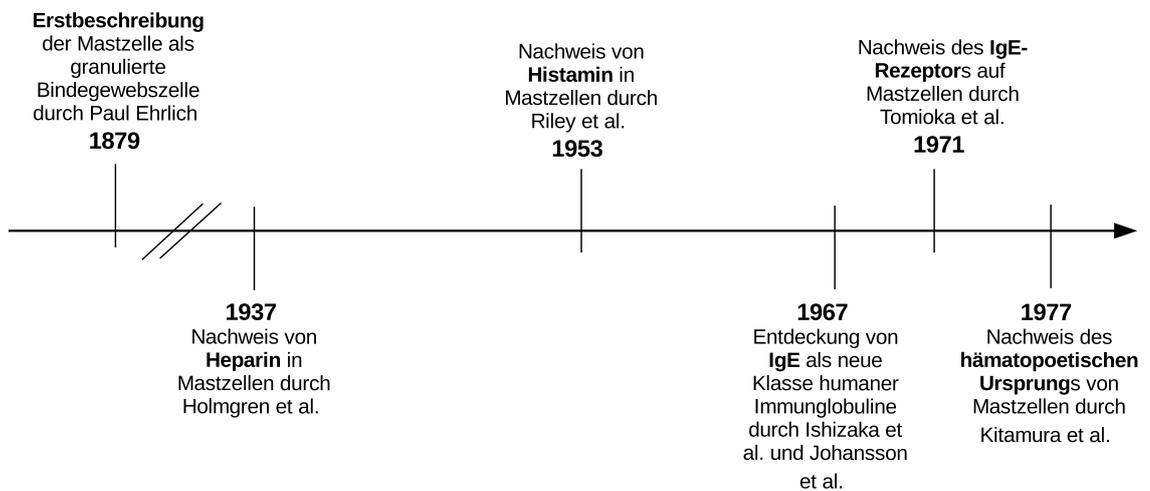
## 1.1. Mastzellen und Mastzellerkrankungen

### 1.1.1. Entdeckung von Mastzellen

„Bei chronischen Entzündungen findet man ausserordentlich [sic!] häufig eine bedeutende Vermehrung der granulirten [sic!] Zellen. [...] Sehr bald zeigte sich, dass das vermehrte Auftreten dieser Zellen sich nicht allein an die chronische Entzündung bindet, sondern überhaupt ein Attribut eines local [sic!] gesteigerten Ernährungszustandes ist, der bald durch chronische Entzündungen, bald durch Stauung (braune Lungeninduration), bald durch Neubildung (besonders Carcinome) hervorgerufen sein kann. Man kann von diesem Standpunkt aus die granulirten [sic!] Zellen gewissermaassen [sic!] als Producte [sic!] der Mäsung der Bindegewebszellen ansehen und sie dem entsprechend als Mastzellen bezeichnen.“ (Ehrlich 1879)

Mit diesen Worten prägte der berühmte Arzt und Forscher Paul Ehrlich 1879 den Namen der „Mastzellen“ (MZ), die er während seiner Studien zu Anilin-Färbungen in der Histologie beschrieb. Mithilfe neu entwickelter Färbemethoden gelang es Ehrlich auch, die noch heute in der Histologie relevante sogenannte (sog.) „Metachromasie“ der Mastzellen darzustellen. Der Begriff beschreibt die Eigenschaft der proteoglykanhaltigen Mastzellgranula, den basophilen, blauen (Anilin-)Farbstoff zu binden und somit einen Farbumschlag ins Violette zu erzielen (Ribatti 2018; Kramer u. a. 1955). Paul Ehrlich vermutete seinerzeit, dass es sich bei Mastzellen um ortsständige Bindegewebszellen handelt, die durch ein Überangebot von Nährstoffen in der Umgebung „gemästet“ wurden. Obwohl Ehrlichs Hypothese über die Ätiologie der Granula und die Herkunft der Zellen heute natürlich widerlegt ist, hat sich der Begriff „Mastzelle“ in der medizinischen Terminologie durchgesetzt und ist sogar ins Englische übernommen worden. (Ehrlich 1879; Siefert u. a. 1983; Blank u. a. 2013)

Wichtige pathophysiologische Funktionen der Mastzellen, insbesondere ihre Rolle bei allergischen Soforttyp-Reaktionen, wurden erst einige Jahrzehnte später erkannt. Abbildung 1 gibt einen Überblick über wichtige Meilensteine der Mastzellforschung. 1937 entdeckte Holmgren H. (1937), dass Mastzell-Granula den gerinnungshemmenden Stoff Heparin enthalten, welcher letztendlich auch die bereits erwähnte Metachromasie bedingt (Oliver u. a. 1947). Zentraler Anknüpfungspunkt für die weitere Erforschung der Funktion von Mastzellen war u.a. der Nachweis von Histamin in Mastzellen (Riley u. a. 1953) sowie die Erkenntnis, dass Histamin und Heparin im Rahmen anaphylaktischer Reaktionen freigesetzt werden (Rocha e Silva u. a. 1947). Dem Verständnis des pathophysiologisch wichtigen Zusammenhangs zwischen Immunglobulin E-Antikörpern (IgE) und Mastzellen wurde mit der Erstbeschreibung der  $\gamma$  E-Antikörper, durch K. Ishizaka u. a. (1967) der Weg geebnet. Hier wurde IgE als „reagierende



**Abbildung 1 Meilensteine der Mastzellforschung** Dieser Zeitstrahl zeigt wichtige Meilensteine in der Erforschung der Pathophysiologie von Mastzellen. Quellen: Ehrlich (1879), Holmgren H. (1937), Riley u. a. (1953), Johansson u. a. (1967), Tomioka u. a. (1971) und Kitamura, Shimada u. a. (1977) (Nennung in chronologischer Reihenfolge).

Substanz“ bei Patient\*innen mit einer Allergie gegen Ambrosia-Pollen nachgewiesen. Zur gleichen Zeit entdeckten Johansson u. a. (1967) ein bislang unbekanntes Myelom-Protein bei einem Patienten. Es zeigte sich schließlich, dass dieses Protein mit dem gleichen sekundären Antikörper detektiert werden konnte, den K. Ishizaka u. a. (1967) zum Nachweis der  $\gamma$ E-Antikörper bei Ambrosia-Allergikern verwendet hatten. Damit war die Identifikation eines neuen humanen Immunglobulins, IgE, gelungen. Kurze Zeit später wurde der passende IgE-Rezeptor, auch  $Fc\epsilon$  - Rezeptor genannt, auf basophilen Granulozyten und Mastzellen nachgewiesen (Tomioka u. a. 1971; T. Ishizaka, Sterk u. a. 1979). Die funktionelle Bedeutsamkeit dieses Zusammenhangs wurde in den folgenden Jahren durch mehrere Veröffentlichungen belegt, die die IgE-abhängige Degranulation von Mastzellen und basophilen Granulozyten untersuchten (T. Ishizaka, K. Ishizaka, Johansson u. a. 1969; T. Ishizaka, Tomioka u. a. 1971; T. Ishizaka, De Bernardo u. a. 1972; Bach u. a. 1971). Eine Beschreibung der durch IgE-Bindung vermittelten Signalkaskade sowie ein Überblick über den aktuellen Forschungsstand zur Pathophysiologie der Mastzelle findet sich im folgenden Kapitel 1.1.2.

Weiterhin unklar war allerdings die eigentliche Herkunft der Mastzellen. Erst 1977 konnten Kitamura, Shimada u. a. (1977) in einem Mausmodell nachweisen, dass Mastzellen aus hämatopoetischen Vorläuferzellen entstehen. Die gleiche Arbeitsgruppe konnte weiterhin belegen, dass Mastzellen und Granulozyten aus der gleichen pluripotenten Stammzelle hervorgehen, Mastzellen im Vergleich zu Granulozyten allerdings in einem unreiferen Stadium über den Blutstrom in periphere Organe migrieren (Kitamura, Yokoyama u. a. 1981).

### 1.1.2. Eigenschaften und Funktionen der Mastzelle

Nach heutigem Wissensstand handelt es sich bei Mastzellen um ubiquitär vorkommende Immunzellen, die wichtige Aufgaben der adaptiven und angeborenen Immunität erfüllen und zur Funktionsfähigkeit und Homöostase zahlreicher Gewebe beitragen (Weller u. a. 2011; Rao u. a. 2008).

#### Ursprung und Differenzierung

Mastzellen haben einen hämatopoetischen Ursprung (Kitamura, Shimada u. a. 1977). Anhand eines Patienten, der aufgrund von Leukämie eine allogene Knochenmarkstransplantation erhalten hat, konnte 1994 nachgewiesen werden, dass auch menschliche Mastzellen dem Knochenmark entstammen (Fodinger u. a. 1994). Die vollständige Ausdifferenzierung von Mastzellen erfolgt allerdings erst im Zielgewebe und ist abhängig von dem dort vorherrschenden Mikromilieu (Kitamura, Sonoda u. a. 1985; Kitamura, Kasugai u. a. 1993; Hallgren u. a. 2007). Mastzell-Vorläuferzellen (sog. Mastzell-Progenitor-Zellen) werden aus dem Knochenmark ins Blut ausgeschwemmt und verteilen sich anschließend in unterschiedlichen peripheren Geweben. Bevorzugt siedeln sie sich dabei im Bereich der Grenzflächenorgane (z.B. Haut, Darm, Respirationstrakt) sowie in der Umgebung von Blutgefäßen, Hautanhangsgebilden, Drüsen und glatten Muskelzellen an (Metcalf, Baram u. a. 1997; Galli, Kalesnikoff u. a. 2005; Metcalfe und Boyce 2006; Jamur, Moreno u. a. 2010). Unreifere Mastzell-Vorstufen, wie beispielsweise sog. „mast cell committed precursors“ sind hingegen (beim gesunden Menschen) nur im Knochenmark zu finden (Jamur, Moreno u. a. 2010). Untersuchungen an Ratten haben ergeben, dass residente Mastzellen eine Lebensdauer von circa zwölf Wochen haben (Kiernan 1979). Interessanterweise scheinen diese residenten Mastzellen aber trotz ihrer Ausdifferenziertheit sowohl die Fähigkeit zur Proliferation (Galli, Kalesnikoff u. a. 2005; Kitamura 1989; Ryan u. a. 2007) als auch zur Regranulation (Dvorak u. a. 1987; Jamur und Vugman 1988; Xiang u. a. 2001) zu besitzen.

Eine gängige Einteilung der humanen Mastzellen unterscheidet zwischen  $MZ_{TC}$  und  $MZ_T$ . Die Abkürzungen stehen dabei für die jeweils (vorwiegend) enthaltenen Proteasen: T = Tryptase, C = Chymase.  $MZ_{TC}$  enthalten neben den beiden genannten Proteasen u.a. noch Carboxypeptidase A and Cathepsin G. Die beiden Mastzelltypen unterscheiden sich ebenfalls in ihrer Verteilung im Gewebe: Während  $MZ_T$  vor allem im Gastrointestinaltrakt und im Respirationstrakt (häufig zusammen mit T-Zellen) zu finden sind, kommen  $MZ_{TC}$  auch in Haut und Lymphknoten in größerer Zahl vor (A. A. Irani, Schechter u. a. 1986; Schwartz 2006; A. M. Irani u. a. 1987). Diese schematische Einteilung lässt allerdings die Tatsache ungeachtet, dass auch Übergangsformen zwischen den beiden Typen (Kitamura 1989) sowie andere, beispielsweise Tryptase - und Carboxipeptidase A - positive Mastzellen, existieren. Letztere wurden z.B. bei Patient\*innen mit Asthma oder eosinophiler Ösophagitis beschrieben (Dougherty u. a. 2010; Abonia u. a. 2010).

Ein entscheidender Faktor bei der Differenzierung von Mastzellen ist, wie bereits oben er-

wähnt, das umgebende Mikromilieu. Mastzellen haben eine wichtige Rolle im Zusammenspiel unterschiedlicher Zellen und Botenstoffe des menschlichen Immunsystems. Aus diesem Grund besitzen sie zahlreiche Rezeptoren auf ihrer Oberfläche, die durch intrazelluläre Signaltransduktionskaskaden die Entwicklung, Proliferation und phänotypische Differenzierung der Mastzelle beeinflussen können (Kitamura, Sonoda u. a. 1985; Kitamura, Kasugai u. a. 1993; Hallgren u. a. 2007). Beispielsweise führt Interleukin 4 zu einem verlängerten Überleben und zur Reifung von Mastzellen während es gleichzeitig zu einer herabgesetzten Expression des Stammzellfaktor-Rezeptors (SCF-R, CD 117) sowie zu einer gesteigerten Bildung von Chymase und Expression des Fc $\epsilon$ Rezeptors I (Fc $\epsilon$ R I) führt (Sillaber u. a. 1991; Yanagida u. a. 1995; Toru, Ra u. a. 1996; Toru, Eguchi u. a. 1998). Die Kombination von Stammzellfaktor (SCF) und Interleukin 4 (IL-4) verändert die Zytokinproduktion von Mastzellen, sodass sie die Differenzierung von TH 2-Lymphozyten begünstigen (Lorentz u. a. 2001). Gleichzeitig führen einige durch T-Zellen ausgeschüttete Zytokine wiederum zu einem Überlebenssignal für Mastzellen (Yanagida u. a. 1995). Weitere Zytokine und Wachstumsfaktoren, die Einfluss auf den Mastzell-Phänotyp ausüben sind IL-3, Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor, IL-10, IL-9, IL-6, IL-33, Transforming Growth Factor $\beta$ , Nerve Growth factor und Neurothrophin 3. Für eine detaillierte Aufstellung der jeweiligen Wirkung sei auf da Silva u. a. (2014) verwiesen.

### **(Patho)-Physiologie**

Mastzellen üben, vorwiegend über die Wirkung der durch sie freigesetzten Mediatoren, zahlreiche Funktionen im Bereich der Immunität und Gewebe-Homöostase aus. Essentiell zur Ausübung dieser Funktionen ist daher die Aktivierung und folgende Degranulation bzw. Synthesisierung bestimmter Zytokine, Chemokine, Wachstumsfaktoren und Proteasen (Galli, Nakae u. a. 2005). Die Aktivierung kann dabei auf unterschiedlichen Wegen erfolgen: Am bekanntesten ist sicherlich der IgE-abhängige Weg, welcher im Rahmen der adaptiven Immunantwort, typischerweise bei allergischen Erkrankungen vom Soforttyp (Typ 1 IgE-vermittelte Allergie), aber beispielsweise auch bei Wurmerkrankungen (Anthony u. a. 2007; Gurish u. a. 2004) stattfindet. Die Initiierung der Signalkaskade geschieht dabei durch Bindung von Antigenen durch IgE, das sich wiederum an den heterotetrameren, hochaffinen Fc $\epsilon$ R<sub>1</sub>-Rezeptoren (Metzger 1992) anlagert. Durch Quervernetzung mehrerer IgE-Immunglobuline auf der Zellmembran kommt es zu einer Translokation des Aggregats in sog. „lipid rafts“ (Lipid-Schollen in der Zellmembran, die als Orte der Signaltransduktion fungieren). Dort kommt es über mehrere Phosphorylierungsschritte, die u.a. ITAMs (Immunoreceptor tyrosine-based activation motifs), Lyn - und Syk-Kinasen umfassen, schließlich zur Aktivierung der Phospholipase C, die wiederum über den Inositol-3-Phosphat-Signalweg zu einer Steigerung der intrazellulären Calcium-Konzentration führt. Dies ist notwendig, damit die Exozytose der präformierten Granula in den Mastzellen stattfinden kann. Zudem werden über die oben skizzierten Signalwege auch Transkriptionsfaktoren phosphoryliert und somit aktiviert, sodass die Zytokinproduktion in den Mastzellen verstärkt wird. Gleichermäßen kommt es zu einer Aktivierung der Phospholipase A<sub>2</sub>, welche Arachidonsäure als Ausgangssubstanz für Lipidmediatoren wie Leukotriene

und Prostaglandine freisetzt (Kovarova u. a. 2001; Siraganian 2003; Benhamou u. a. 1992; Cho u. a. 2004; Hundley u. a. 2004). Besondere Wichtigkeit für die Aktivierung von Mastzellen kommt dem cKIT-Rezeptor zu, welcher durch den Stammzellfaktor (engl. Stem cell factor = SCF) aktiviert wird. Dies führt u.a. über die Aktivierung der JAK/STAT und RAS/RAF/MAPK-Signalwege zu einer Potenzierung der antigenabhängigen Mastzellaktivierung und fördert Zytokinproduktion, Zelldifferenzierung und Proliferation (Hill u. a. 1996; Hundley u. a. 2004; Gilfillan u. a. 2009). Der cKit-Rezeptor nimmt eine Schlüsselrolle in der Pathogenese der Mastozytose ein, auf die im folgenden Kapitel 1.1.3 genauer eingegangen wird.

Im Rahmen ihrer Funktion als Effektorzellen der angeborenen Immunität können Mastzellen aber auch IgE-unabhängig zur (selektiven) Mediatorfreisetzung gebracht werden (Dawicki u. a. 2007; Marshall 2004). Dies kann beispielsweise über die Erkennung sog. Pathogen-assoziiertes molekularer Muster (engl. Pathogen associated molecular patterns = PAMPs) durch Mustererkennungs-Rezeptoren (engl. Pattern recognition receptors = PRRs) erfolgen (Dawicki u. a. 2007). Ein prominentes Beispiel eines solchen PRRs sind die Toll-like-Rezeptoren (TLRs). Zudem verfügen Mastzellen über Rezeptoren für verschiedene Komplementfaktoren, durch die eine weitere Verbindung zwischen angeborener Immunabwehr und Mastzellen als Effektorzellen geschaffen wird (Marshall 2004; Woolhiser u. a. 2004). Zahlreiche andere Stoffe, beispielsweise Toxine oder Medikamente, Immunkomplexe, Wachstumsfaktoren, Neuropeptide oder Cytokine sind zudem in der Lage die Mediatorfreisetzung von Mastzellen zu beeinflussen (Gilfillan u. a. 2009; da Silva u. a. 2014). Vor wenigen Jahren wurde ein neuer G-Protein gekoppelter Rezeptor, der MRGPRX2-Rezeptor, beschrieben, der für die IgE-unabhängigen Mechanismen der Mastzellaktivierung sehr bedeutend ist (McNeil u. a. 2015). Dieser Rezeptor vermittelt möglicherweise die bei Mastozytose-Patient\*innen häufig vorkommenden, pseudoallergischen Reaktionen, die durch eine Vielzahl kationischer Substanzen ausgelöst werden können. In ihrer Gesamtheit werden diese Substanzen als basische Sekretagogien bezeichnet. Dazu zählen u.a. Medikamente (z.B. Chloroquin) oder bestimmte endogene Peptide (z.B. Substanz P). (McNeil u. a. 2015). Ebenso können physikalische Stimuli zur Degranulation führen (da Silva u. a. 2014; D. Zhang u. a. 2012).

Grundsätzlich lassen sich präformierte, in sekretorischen Granula gespeicherte Mastzell-Mediatoren von nach Aktivierung de novo synthetisierten Mediatoren unterscheiden. Bedeutende Vertreter ersterer Gruppe sind Histamin, Heparin, Tryptase, Chymase, Carboxypeptidase A, Cathepsin G, Serotonin, verschiedene Hydrolasen, Peroxidasen und Phospholipasen. Die Freisetzung von Histamin durch Degranulation führt über die Wirkung an H1- und H2-Rezeptoren in verschiedenen Organsystemen zu Typ 1-allergischen Symptomen und im Extremfall zum Symptomkomplex der Anaphylaxie (Brockow 2012). Die freigesetzten Enzyme tragen zum Verdau bzw. zur Umstrukturierung der umgebenden extrazellulären Matrix sowie zur Bildung weiterer Mediatoren (Phospholipasen) oder reaktiver Verbindungen (Peroxidasen) bei. (Metcalfe 2008; Lundquist u. a. 2011)

Zur Gruppe der neu synthetisierten Mediatoren gehören Lipidmediatoren. Ein großer Teil dieser Mediatoren sind Abkömmlinge der Arachidonsäure und wurden früher als „langsam

wirkende Substanz der Anaphylaxie“ („slow reacting substance of anaphylaxis“) beschrieben (T. Ishizaka, K. Ishizaka und Tomioka 1972). Beispiele hierfür sind Leukotrien B<sub>4</sub>, Leukotrien C<sub>4</sub>, Prostalglandin E<sub>2</sub> und Prostaglandin D<sub>2</sub> (Boyce 2005). Leukotriene wirken zum Beispiel durch Rekrutierung weiterer Immunzellen proinflammatorisch (im Zusammenspiel mit Mastzellen insb. eosinophile Granulozyten und T-Zellen) (Goodarzi u. a. 2003). Prostaglandin D<sub>2</sub> führt u.a. über eine Erhöhung der Gefäßpermeabilität zu typischen allergischen Symptomen wie beispielweise Rhinitis, Konjunktivitis oder nasaler Obstruktion (Boyce 2005).

Ein weiterer wichtiger Vertreter der Lipidmediatoren ist der Plättchenaktivierungsfaktor (Platelet-Activation-Factor = PAF), welcher aus Phospholipiden der Zellmembran hergestellt wird (Galli, Nakae u. a. 2005; Metcalfe 2008; Boyce 2005).

Weiterhin neu synthetisiert werden zahlreiche Zytokine, Chemokine und Wachstumsfaktoren. Diese Botenstoffe greifen u.a. in die Regulation der Entzündungsreaktion ein, die auch noch Stunden nach Reizexposition weiter abläuft bzw. bei chronischer Exposition aufrechterhalten wird. Beispielsweise begünstigen die Interleukine 1, 4, 5 und 6 eine TH 2-Immunantwort, während die ebenfalls durch Mastzellen ausgeschütteten Interleukine 2, 3, 12, 18 und Interferon  $\gamma$  sowie Tumornekrosefaktor  $\alpha$  eher eine TH 1-Immunantwort fördern. Gleichermaßen werden sowohl pro - als auch antiinflammatorische Stoffe durch Mastzellen synthetisiert (z.B. Transforming Growth Factor  $\beta$  und Interleukin 10 als antiinflammatorische und CC-Chemokin-Ligand 2, 3 und 4 als proinflammatorische Mediatoren). (Metcalfe 2008; Goodarzi u. a. 2003; Marshall 2004; Burd u. a. 1989; da Silva u. a. 2014)

Entsprechend der geschilderten pathophysiologischen Eigenschaften spielen Mastzellen bei vielen primär oder sekundär inflammatorischen Erkrankungen eine Rolle. Beispiele hierfür sind Tumoren, kardiovaskuläre Erkrankungen (z.B. Artherosklerose), entzündliche Hauterkrankungen (z.B. Ekzeme), chronische Erkrankungen des Gastrointestinaltrakts (z.B. Morbus Crohn) u.v.m.. Eine besonders zentrale Rolle spielen Mastzellen natürlich bei allergischen Sofort-Typ-Reaktionen, da sie die wichtigsten (und neben basophilen Granulozyten auch einzigen) Effektorzellen dieser Reaktionen darstellen (Rao u. a. 2008; Weller u. a. 2011). In der Dermatohistopathologie ist eine reaktive (sekundäre) Vermehrung von Mastzellen (sog. Mastzellhyperplasie) ein gängiger Befund bei unterschiedlichsten Hauterkrankungen. Hierzu zählen sowohl klassische inflammatorische Dermatosen, wie Ekzeme oder Psoriasis, als auch reaktive/parainfektiose Hauterkrankungen wie Urtikaria oder autoimmunologische Hauterkrankungen wie Pemphigus und Sklerodermie im ödematösen Stadium. Auch im Rahmen von Hauttumorerkrankungen oder unspezifischen entzündlichen Veränderungen der Haut können Mastzellen vermehrt vorkommen. (Ludolph-Hauser u. a. 1999; Rothe u. a. 1990) Im Gegensatz zu diesen Erkrankungen mit Mastzellhyperplasie liegt bei den verschiedenen Formen von Mastozytose eine primäre Mastzellvermehrung zugrunde. Im folgenden Kapitel wird nun auf die Pathogenese, Klinik und Diagnostik der verschiedenen Formen von Mastozytose eingegangen.

### 1.1.3. Mastzellerkrankungen

Mastzellerkrankungen können einerseits durch eine erhöhte Anzahl von Mastzellen, andererseits durch eine verstärkte Mastzellaktivierung hervorgerufen werden. Zum Formenkreis der Mastzellerkrankungen gehören die verschiedenen Formen der Mastozytose, die zu Vermehrung und Ansammlung von Mastzellen in verschiedenen Geweben führen, sowie (die teilweise umstrittene Entität der) Mastzellaktivierungssyndrome (Theoharides u. a. 2015). Man unterscheidet primäre, sekundäre und idiopathische Mastzellaktivierungssyndrome. Es wurden drei Kriterien für die Diagnose des Mastzellaktivierungssyndroms definiert: 1. Typische, mastzellvermittelte Symptome (z.B. Urtikaria, Flush, Angioödem, Diarrhoe, Hypotonie, nasale Obstruktion, Atemwegsobstruktion) 2. Anstieg der Serumtryptase um mindestens 20% des Basalwertes + 2 ng/ml innerhalb von 4 Stunden nach einer symptomatischen Periode im Vergleich zum Basalwert. 3. Gutes Ansprechen auf Antihistaminika oder Mastzellstabilisatoren. Zu den primären Mastzellaktivierungssyndromen wird neben den verschiedenen Formen der Mastozytose auch das monoklonale Mastzellaktivierungssyndrom gezählt. Beim monoklonalen Mastzellaktivierungssyndrom liegt ebenfalls eine klonale Vermehrung von Mastzellen im Knochenmark vor, aber die Kriterien zur Diagnosestellung einer SM sind nicht erfüllt. In die Gruppe der sekundären Mastzellaktivierungssyndrome fallen Mastzell-vermittelte Erkrankungen, wie beispielsweise Typ 1-Allergien, nicht IgE-vermittelte Pseudoallergien oder die physikalische Urtikaria. Die Existenz des idiopathischen Mastzellaktivierungssyndroms, bei dem keine zugrundeliegende Erkrankung die Mastzellaktivierung erklären kann, wird teilweise angezweifelt. (Brockow 2013) Aufgrund der thematischen Ausrichtung dieser Arbeit wird im Folgenden nicht weiter auf die Gruppe der Mastzellaktivierungssyndrome eingegangen, sie seien aber aus Gründen der Vollständigkeit an dieser Stelle erwähnt.

### Mastozytose

Unter dem Begriff „Mastozytose“ wird eine Gruppe von Erkrankungen zusammengefasst, bei denen es zu einer Vermehrung und Akkumulation von Mastzellen in einem oder mehreren Organsystemen kommt (Arber u. a. 2016). Entsprechend der Einteilung der Weltgesundheitsorganisation (engl. World Health Organization = WHO) unterscheidet man grundsätzlich zwischen systemischen und rein kutanen Formen der Mastozytose, zudem wird das maligne Mastzellsarkom eigenständig aufgeführt (Arber u. a. 2016; Valent, Akin und Metcalfe 2017). Innerhalb dieser Gruppen gibt es noch weitere Subtypen, welche in Tabelle 1 dargestellt sind. Die Subtypen der kutanen Mastozytose sind im Wesentlichen anhand der klinischen Erscheinungsformen eingeteilt worden. Die Einteilung der systemischen Mastozytose orientiert sich an der Schwere bzw. Malignität der Erkrankung. Die Pathogenese der Mastozytose ist bis heute nicht vollständig verstanden, allerdings spielt insbesondere bei Erwachsenen die Tyrosinkinase cKIT, deren Ligand SCF ist, eine wichtige Rolle (Valent, Akin, Escibano u. a. 2007; Orfao u. a. 2007; Brockow und Metcalfe 2010). Durch eine aktivierende Mutation von cKIT kommt es zu einer konstitutiven Aktivierung und zu einem andauernden Proliferationssignal der Mastzellen (Valent, Akin, Escibano u. a. 2007; Orfao u. a. 2007). Diese unkontrollierte Proliferation führt dann schließlich zur Akkumulation der Mastzellen in verschiedenen Organsystemen (Valent,

**Tabelle 1 WHO-Klassifikation der Mastozytose** Auflistung der verschiedenen Formen der Mastozytose anhand der zuletzt 2016 aktualisierten WHO-Klassifikation (Arber u. a. 2016; Valent, Akin und Metcalfe 2017)

---

### **Kutane Mastozytose (KM)**

Makulopapulöse kutane Mastozytose (Synonym: Urticaria pigmentosa (UP))

Diffuse kutane Mastozytose

Mastozytom der Haut

---

### **Systemische Mastozytose (SM)**

Indolente systemische Mastozytose (ISM)

Smoldering-Typ systemische Mastozytose (smoldering = engl. für schwelend)

Systemische Mastozytose mit einer assoziierten hämatologischen Neoplasie

Aggressive systemische Mastozytose

Mastzell-Leukämie

---

### **Mastzellsarkom**

---

Akin, Escribano u. a. 2007; Orfao u. a. 2007). Die häufigste Mutation äußert sich dabei im Austausch von Aspartat durch Valin an Stelle 816 des Rezeptor-Proteins und wird daher KIT D816V Mutation genannt (Nagata u. a. 1995). Diese KIT D816V Mutation liegt nach aktuellem Kenntnisstand bei  $\geq 90\%$  der erwachsenen Mastozytosepatienten vor (Garcia-Montero u. a. 2006). Bei Kindern wurde diese Mutation in einem weitaus geringeren Anteil der Fälle in Haut oder Knochenmark festgestellt (circa 35%) (Meni u. a. 2015). Im Bereich der kindlichen Mastozytose werden häufiger (circa 40%) auch andere KIT Mutationen beschrieben (Meni u. a. 2015). In circa 25 % der Fälle zeigt sich bei Kindern keinerlei Auffälligkeit im KIT-Gen (Meni u. a. 2015).

**Epidemiologie** Mastozytose gilt als sogenannte „orphan disease“, also als seltene Erkrankung (orpha.net-ID: 98292) (Orpha.net 2019). Schätzungen gehen von einer Prävalenz von circa 0,01 - 0,05% aus, allerdings ist die Datenlage sehr eingeschränkt und beruht im Wesentlichen auf zwei Studien aus Dänemark bzw. den Niederlanden (Brockow 2014; Cohen u. a. 2014; van Doormaal u. a. 2013; Orpha.net 2019). Patient\*innen aller Altersstufen können von Mastozytose betroffen sein (Brockow und Metcalfe 2010). Die jeweils typischen Manifestationszeitpunkte bei Kindern bzw. Erwachsenen liegen zwischen erstem und zweitem bzw. 20. und 50. Lebensjahr (Kettelhut u. a. 1994). Beide Geschlechter sind gleichermaßen betroffen (Brockow 2014). Einzelne Fallberichte über kongenitale (systemische) Mastozytosen existieren (Kuint u. a. 1999; Huang u. a. 2017; H. G. Zhang u. a. 2017).

**Prognose** Bei Kindern kommt es häufig (> 50%) bis zur Adoleszenz zu einer Spontanremission (Uzzaman u. a. 2009), während bei Erwachsenen in der Regel von einem chronischen Fortbestand der Mastozytose ausgegangen werden muss (Brockow 2014). Die kindliche Mastozytose ist typischerweise auf die Haut begrenzt und zeigt sich meist in Form einer Makulopapulösen Mastozytose (MPKM), bzw. am zweithäufigsten in Form singulärer oder multipler Mastozytome (Kettelhut u. a. 1994; Uzzaman u. a. 2009; Hartmann u. a. 2016). Bei Erwachsenen hingegen liegt größtenteils eine Systembeteiligung (exemplarisch nachgewiesen durch eine Knochenmarksbiopsie) vor (Escribano, Alvarez-Twose u. a. 2009). Der prädominante (>90%) Subtyp der SM ist dabei die benigne indolente systemische Mastozytose (ISM) (Brockow und Ring 2011; Brockow 2014). Patienten mit ISM haben eine normale Lebenserwartung. Die Progression einer primär benignen SM in aggressive oder maligne Verlaufsformen ist zwar prinzipiell möglich, aber sehr selten (Escribano, Alvarez-Twose u. a. 2009). Die Smoldering-Typ systemische Mastozytose (SSM), zeigte in einer alterskorrigierten statistischen Analyse von Tefferi u. a. (2019) keinen Unterschied im Bezug auf das Überleben im Vergleich zu ISM. Bei den fortgeschritteneren Formen ist die Lebenserwartung aber z.T. deutlich eingeschränkt: Bei aggressiver systemischer Mastozytose (ASM) liegt das mediane Überleben bei circa 41 Monaten, bei systemischer Mastozytose mit assoziierter hämatologischer Neoplasie (SM-AHN) bei circa 24 Monaten und bei Mastzelleukämie nur noch bei circa 2 Monaten (Pardani 2015). Die Prognose bei Mastzellsarkomen liegt um die 18 Monate (Monnier u. a. 2016).

**Klinik** Das klinische Beschwerdebild unterscheidet sich zwischen rein kutanen und systemischen Formen der Mastozytose. Auch bei SM ist eine Hautbeteiligung typisch. Es wird berichtet, dass bei circa 80% aller Mastozytose-Patient\*innen sowie 95% aller ISM-Patient\*innen typische Hautmanifestationen vorliegen (Akin u. a. 2004; Hartmann u. a. 2016). Allerdings kann davon ausgegangen werden, dass es eine hohe Dunkelziffer von nicht erkannten, isolierten Knochenmarksmastozytosen gibt (Zanotti u. a. 2011). Diese Patient\*innen fallen häufig erstmals wegen einer Anaphylaxie auf, in deren Folge dann (teilweise) erhöhte Serumtryptase-Werte bzw. Mastozytose-typische Befunde in der Knochenmarksbiopsie festgestellt werden. Das Anaphylaxie-Risiko ist bei allen Formen von Mastozytose erhöht, besonders aber bei systemischen Formen (Brockow, Jofer u. a. 2008). Die häufigsten Auslöser sind dabei Insektengifte (Brockow, Jofer u. a. 2008). Zudem fallen Anaphylaxien bei Mastozytose-Patient\*innen häufig schwerer aus, als bei anderen Patient\*innen (Brockow, Jofer u. a. 2008). Systemische Symptome, die durch erhöhte Freisetzung von Mastzellmediatoren bedingt sind, treten typischerweise bei Formen von SM auf, können allerdings auch in Fällen von kutaner Mastozytose vorkommen (Horan u. a. 1991; Travis u. a. 1988; Brockow 2004; Brockow und Metcalfe 2010). Die Ausprägung der Symptome ist von Patient\*in zu Patient\*in sehr unterschiedlich und korreliert nicht unbedingt mit der Ausprägung des Systembefalls (Horan u. a. 1991; Travis u. a. 1988; Brockow 2004; Brockow und Metcalfe 2010). Besonders häufig berichten Patient\*innen von gastrointestinalen Symptomen wie Durchfall und krampfartigen Schmerzen oder Hautsymptomen wie Flush und Juckreiz (Valent, Akin, Escribano u. a. 2007; Brockow und Metcalfe 2010; Horan u. a. 1991; Travis u. a. 1988). Prinzipiell kann aber eine Vielzahl unterschiedlicher

Symptome an verschiedenen Organsystemen auftreten, die in Tabelle 2 zusammengefasst sind. Langfristig ist bei Patient\*innen mit SM das Risiko einer Osteoporose erhöht (Valent, Akin, Escribano u. a. 2007; Brockow 2004).

Der im folgenden verwendete Begriff „Mastocytosis in the Skin“ (MIS, engl. für Mastozytose der Haut) umfasst alle Hautmanifestationen einer Mastozytose (unabhängig von einer möglichen Systembeteiligung).

Die häufigste klinische Präsentationsform von MIS ist die MPKM. Hierbei zeigen sich braunrötliche, circa 3-6 mm durchmessende Maculae und flache Papeln, die vorwiegend im Bereich des Körperstammes lokalisiert sind. Typisch ist die Hyperpigmentierung der Läsionen, die auch im veralteten Begriff „Urticaria pigmentosa“ (UP) als Bezeichnung für MPKM zum Ausdruck kommt. Je nach Ausprägungsgrad können die Läsionen konfluieren oder einzeln stehen (Brockow 2004; Brockow und Metcalfe 2010; Hartmann u. a. 2016) (siehe auch Abbildung 2). Hartmann u. a. (2016) empfehlen, die MPKM weiter in eine „monomorphe“ und eine „polymorphe“ Form zu unterteilen. Die polymorphe MPKM zeichne sich durch insgesamt etwas größere und in Größe und Form unregelmäßigere Hautveränderungen aus. Diese bei Kindern häufigere Form soll mit einer höheren Chance auf Spontanremission einhergehen, als die monomorphe MPKM, die bei fast allen Erwachsenen und einigen Kindern auftritt (Hartmann u. a. 2016). Weitere Manifestationsformen von MIS sind die Diffuse kutane Mastozytose (DKM) und Mastozytome. Die DKM zeichnet sich durch eine diffuse Infiltration der Haut durch Mastzellen aus und führt zum klinischen Bild einer vergrößerten, lederartig-ödematösen und teils gelblich verfärbten Haut. Diese eher seltenen Form der KM entsteht meist bei Säuglingen im ersten Lebensjahr und persistiert bei leichter Besserungstendenz (Brockow und Metcalfe 2010; Hartmann u. a. 2016). Mastozytome wiederum sind lokalisierte, gutartige Tumoren, die eine typische gelblich-orangene Farbe aufweisen, scharf begrenzt sind und meist 2-5 cm Durchmesser (Brockow und Metcalfe 2010; Hartmann u. a. 2016).

Ein klinisch hilfreicher Test für das Vorliegen einer MIS ist das sogenannte Darier-Zeichen. Hierbei wird durch mechanisches Reiben eine Degranulation der Mastzellen in den Läsionen erzeugt, die sich durch Anschwellen und Rötung, gelegentlich auch mit Blasenbildung, äußert (Valent, Akin, Escribano u. a. 2007). Anamnestisch wird dieses Phänomen auch häufig nach alltäglichen physikalischen Stimuli (z.B. Reibung, Temperaturwechsel) berichtet. Weitere typische Symptome, die aus der Hautbeteiligung resultieren, sind in Tabelle 2 aufgeführt.

**Diagnostik** Wichtige Grundpfeiler der Diagnostik der Mastozytose sind Klinik, Anamnese und Hautbefund, Serumtryptase-Spiegel und die pathologisch-zytogenetische Begutachtung von Knochenmarks- und Hautbiopsien. Zunehmend gewinnt auch die KIT D816V Mutationsanalyse im Blut an klinischer Bedeutung (Valent, Akin, Escribano u. a. 2007). Für die Diagnose einer systemischen Mastozytose hat die WHO bereits Kriterien festgelegt, die in Tabelle 3 aufgeführt sind. Die Diagnostik der MIS gestaltet sich in der klinischen Praxis häufig

(a) Mastozytom am medialen rechten Knie



(b) Makulopapulöse MIS an den Beinen



(c) Makulopapulöse MIS am Körperstamm



**Abbildung 2 Klinische Beispiele für Mastozytose** Fotografien aus der Klinik und Poliklinik für Dermatologie am Biederstein, Klinikum rechts der Isar, Technische Universität München. (a) Medial am rechten Knie eines Kindes zeigt sich eine circa 5 cm große, scharf begrenzte gelb-orangefarbene Plaque. Dieser Befund ist typisch für ein Mastozytom. (b) An beiden Beinen eines erwachsenen Patienten zeigen sich zahlreiche rot-braune, circa 3-5 mm durchmessende Papeln und Maculae, die medial an den Oberschenkeln konfluieren. Am rechten Oberschenkel medial sind zwei erythematöse Areale zu erkennen. An diesen Stellen erfolgte vor der Aufnahme eine mechanische Irritation (Darier-Zeichen positiv). Dieser Befund entspricht einer makulopapulösen Form der Hautmastozytose (Urticaria pigmentosa). (c) Am Körperstamm eines erwachsenen Patienten zeigen sich überwiegend einzeln stehende, rot-braune, circa 3-5 mm durchmessende Papeln und Maculae i.S. einer MPKM (Urticaria pigmentosa)

**Tabelle 2 Klinische Symptome bei Mastozytose durch Ausschüttung von Mastzell-Mediatoren** Auflistung typischer Symptome bei Mastozytose getrennt nach Organsystemen. Die Auflistung wurde auf Grundlage von Literaturrecherche (Valent, Akin, Escribano u. a. 2007; Brockow und Metcalfe 2010; Horan u. a. 1991; Travis u. a. 1988) und der klinischen Erfahrung aus der Mastozytose-Sprechstunde an der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie am Biederstein, Technische Universität München, erstellt.

<b>Organsystem</b>	<b>Symptome</b>
Haut	Juckreiz, Rötung, Blasenbildung, Flush
Gastrointestinaltrakt	abdominelle Schmerzen, Diarrhoe, gastroösophagealer Reflux, Übelkeit, Erbrechen
Kardiovaskuläres System	Hypotonie, Tachykardie, Palpitationen, Synkope
Zentrales Nervensystem	Kopfschmerzen, Konzentrationsstörungen, Fatigue, Stimmungsschwankungen
Muskuloskeletales System	Schmerzen, ggf. sekundär Symptome einer Osteopenie/Osteoporose

schwieriger, da bisher spezifische Kriterien nur unzureichend untersucht sind. Mastzellen kommen auch in gesunder Haut vor. Zudem sind auch bei zahlreichen entzündlichen und tumorösen Erkrankungen vermehrt Mastzellen in der Haut zu finden (Brockow, Akin u. a. 2002; Hartmann u. a. 2016; Wilkinson u. a. 1992). Für Dermatolog\*innen fehlen verlässliche Kriterien, z.B. ab welcher Dichte von Mastzellen eine MIS vorliegt. Dies ist insbesondere deswegen problematisch, da sich zwischen MIS und anderen Hauterkrankungen teilweise erhebliche Überlappungsbereiche in der Höhe der Mastzellichte ergeben. Durch eine Expertengruppe wurde 2007 ein Vorschlag für die Standardisierung der Diagnostik bei V.a. MIS bzw. CM konsentiert (Valent, Akin, Escribano u. a. 2007). Dabei wurden ein Major- und zwei Minor-Kriterien festgelegt. Das Majorkriterium besteht in der typischen klinischen Präsentation des Hautbefundes. Das heißt, dass entweder das typische makulopapulöse Bild oder ein positives Darier-Zeichen vorliegen und andere Differentialdiagnosen ausgeschlossen sein müssen. Nach dem vorgeschlagenen Algorithmus sollte dann anschließend eine Hautbiopsie entnommen und immunhistochemisch auf Tryptase untersucht werden. Das erste Minorkriterium umfasst das Vorkommen von Tryptase-positiven Mastzellclustern ( $\geq 15$  Mastzellen pro Cluster) oder von einem monomorphen Mastzellinfiltrat mit  $\geq 20$  Mastzellen/high power field (= HPF, engl. für Sichtfeld eines Mikroskops in 400-facher Vergrößerung). Wenn sowohl Major- als auch Minorkriterium an dieser Stelle zutreffen, soll die Diagnose gestellt werden. Sollte die Histologie „fraglich“ sein, so wird die Durchführung einer KIT D816V Mutationsanalyse in läsionaler Haut vorgeschlagen (zweites Minorkriterium). Sollte diese positiv ausfallen, so ist die Diagnose ebenfalls zu stellen. (Valent, Akin, Escribano u. a. 2007)

2016 veröffentlichten Hartmann u. a. (2016) ein weiteres Konsensus-Statement mit dem

**Tabelle 3 WHO-Kriterien der systemischen Mastozytose** Grundlage zur Diagnose einer systemischen Mastozytose bilden laborchemische (Serumtryptase) und histopathologische Befunde (Knochenmarksbiopsie). Zur Diagnose der Erkrankung müssen entweder ein Major-Kriterium und ein Minorkriterium oder drei Minorkriterien zutreffen. (Arber u. a. 2016; Valent, Akin und Metcalfe 2017)

---

### **Majorkriterium**

multifokale, dichte Mastzellinfiltrate (mit  $\geq 15$  Mastzellen in Aggregaten) in Knochenmarksbiopsie und/oder in anderen extrakutanen Organen

---

### **Minorkriterien**

$\geq 25\%$  der Mastzellen sind atypisch in Knochenmarksaustrichen oder sind spindelförmig in Mastzellinfiltraten in viszeraleen Organen

KIT Punktmutation im Kodon 816 im Knochenmark oder anderen extrakutanen Organen

Mastzellen in Knochenmark, Blut oder anderen extrakutanen Organen exprimieren CD2 oder CD25

Basaler Serumtryptase-Spiegel  $\geq 20$  ng/ml (gilt nur, falls keine unabhängige myeloide Neoplasie besteht)

---

Fokus auf kutane Formen der Mastozytose. Dabei lag der Schwerpunkt zwar deutlich auf den klinischen Präsentationen und deren prognostischem Wert, allerdings wurde auch in Anlehnung an die Arbeit aus 2007 (Valent, Akin, Escibano u. a. 2007) auf histologische Aspekte eingegangen: Hier wurde die Tryptase-Immunhistochemie (IHC) als Goldstandard ausgewiesen. Es wird berichtet, dass Mastzellen in Hautproben von Mastozytose-Patient\*innen durchschnittlich um das 4- bis 8-fache im Vergleich zu gesunder Haut erhöht sind. Als absoluter Richtwert wurde eine Mastzellzahl von 40 Zellen/mm<sup>2</sup> genannt, allerdings wird auch auf die Problematik eines relativ großen Überlappungsbereichs der Mastzellichte in inflammatorisch veränderter oder sogar gesunder Haut hingewiesen. Zudem stellen die Autor\*innen fest, dass der Nutzen zusätzlicher IHC-Färbungen (insb. CD 2, CD 25 oder CD 30) zumindest unklar ist und es wünschenswert ist, die Dermatohistopathologie von MIS bzw. KM genauer zu charakterisieren (Hartmann u. a. 2016).

## **1.2. Fragestellung und Studienkonzeption**

### **1.2.1. Fragestellung**

Wie bereits im Abschnitt 1.1.3 angerissen, existieren für die dermatohistologische Diagnose von MIS bislang keine vergleichbar belastbaren Kriterien, wie für die Diagnose von SM. Im Prinzip stützt sich die Diagnostik im Moment in erster Linie auf das klinische Bild und das Vorkommen vermehrter Mastzellen in der Histologie. Problematisch ist dabei allerdings, dass die genannten Richtwerte für die Mastzellzahl keine eindeutige Zuordnung einer Probe zu MIS im Vergleich zu beispielsweise inflammatorischen Dermatosen (wie z.B. atopischem Ekzem) ermöglicht. Dies kann häufig zu Schwierigkeiten führen, wenn der klinische Befund uneindeutig ist oder die Hautveränderungen nur diskret ausgeprägt sind. Die durch Valent, Akin, Escibano

u. a. (2007) im nächsten Schritt vorgeschlagene KIT D816V Mutationsanalyse aus läsionaler Haut ist momentan nur in sehr wenigen Laboren etabliert und außerdem sehr kostenintensiv. Ziel der Studie war daher die Entwicklung spezifischer Kriterien für die dermatohistologische Diagnose von MIS in Abgrenzung zu anderen Erkrankungen, die zu einer Mastzellvermehrung (Mastzellhyperplasie) führen. Eine Hypothese war, dass sich MIS von Erkrankungen mit Mastzellhyperplasie durch die Komposition des Begleitinfiltrates (z.B. bei Ekzem deutlich mehr T-Zellen als bei MIS) unterscheidet. Eine weitere Annahme war, dass die Anzahl, Größe, Morphologie, Anordnung oder Expression bestimmter immunhistochemischer Marker der Mastzellen oder die basale Pigmentierung der Epidermis eine klare Unterscheidung zwischen Mastzellhyperplasie und Mastozytose zulassen.

### **1.2.2. Studienkonzeption**

Abbildung 3 gibt einen Überblick über den Ablauf und Aufbau der Studie. Wichtige Kernpunkte bei der Planung waren die Auswahl der MIS-Patient\*innen und passender Kontrollen sowie der relevanten immunhistochemischen Färbungen. Zusätzlich wurde zur Validierung der histologischen Kriterien in allen Proben eine KIT D816V Mutationsanalyse durchgeführt.

**Kohortenfestlegung** Anhand folgender Patient\*innengruppen wurden die Diagnosekriterien erarbeitet:

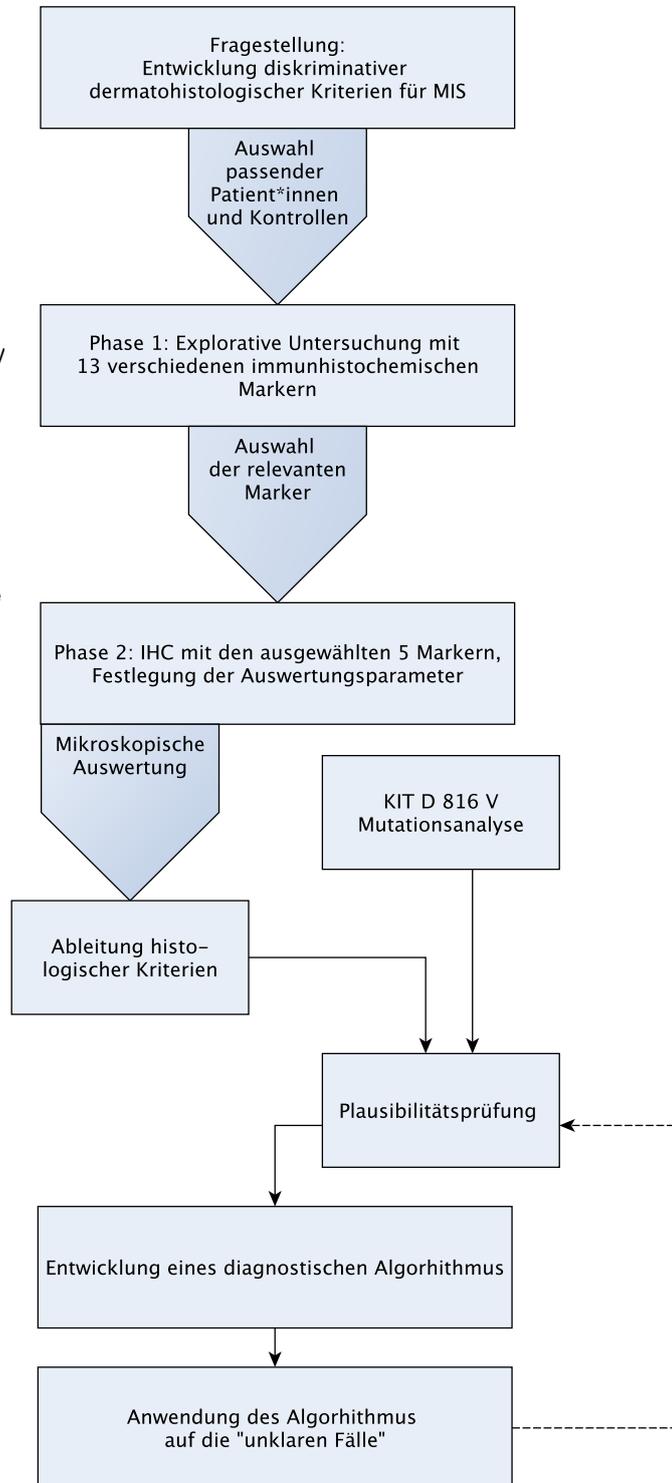
- MIS-Patient\*innen, die entweder aufgrund eines klinisch eindeutigen Befundes oder aufgrund einer gesicherten (I)SM mit Hautbeteiligung diagnostiziert wurden (ohne Mastozytome),
- Mastozytom-Patient\*innen als besondere Untergruppe der MIS,
- Kontroll-Patient\*innen mit Erkrankungen, die zu Mastzellhyperplasie führen können (Ekzem, Urtikaria) oder mit unspezifisch (inflammatorisch) veränderter Haut (Pruritus sine materia, überschüssige Haut aus dermatologischen Operationen).

Zudem schlossen wir eine Gruppe von Patient\*innen in die Studie ein, die bisher nicht eindeutig diagnostiziert werden konnten. Bei diesen Patient\*innen waren die Hautveränderungen klinisch nicht klar einzuordnen oder es lagen bei retrospektivem Einschluss nicht ausreichende klinische Angaben bzw. Fotodokumentation vor. Ebenfalls lagen keine Knochenmarksbefunde vor. Anhand dieser Gruppe soll überprüft werden, ob durch die neu entwickelten Kriterien mehr Patient\*innen korrekt diagnostiziert werden können. Zur Validierung sollen die Ergebnisse der KIT D816V Mutationsanalyse dienen.

**Immunhistochemie** Zur Charakterisierung des histologischen Bildes der MIS wählten wir zunächst ein breites Spektrum immunhistochemischer Färbungen aus, die möglicherweise

**Abbildung 3 Chronologische Darstellung der Studienkonzeption und -durchführung**

Zu Beginn erfolgte die Auswahl von MIS Patient\*innen sowie passenden Kontrollen. In einer kleineren Kohorte wurden dann explorativ 13 unterschiedliche immunhistochemische Marker untersucht. Nach einer kurzen Zwischenevaluation wurden fünf relevante Marker ausgewählt und für alle Fälle gefärbt. Parallel wurde aus dem Gewebematerial eine KIT D816V Mutationsanalyse durchgeführt, deren Ergebnisse zur späteren Validierung der histologischen Kriterien herangezogen wurden. Die anhand der „sicheren MIS-Fälle“ festgelegten Kriterien wurden zum Schluss auf die Gruppe der bislang nicht klar einzuordnenden Fälle angewendet. Schließlich erfolgte eine erneute Plausibilitätsprüfung der neu eingruppierten Fälle anhand der KIT D816V Mutationsanalyse.



relevant für die Anfärbung von Mastzellen und/oder die Charakterisierung des Begleitinfiltrats sein könnten. Tabelle 4 gibt einen Überblick über alle Färbungen, die in der explorativen Phase dieser Studie verwendet wurden. An diese Phase anschließend wurde das finale Set immunhistochemischer Marker, die für alle eingeschlossenen Fälle gefärbt wurden, festgelegt (fett gedruckte Marker in Tabelle 4).

**Tabelle 4 Immunhistochemische Marker** Diese Tabelle zeigt alle Proteine, die im Rahmen dieser Studie immunhistochemisch untersucht wurden. Neben jedem Protein ist eine kurze Erläuterung über die Funktion und den Grund der Auswahl dieses Markers angegeben. Alle **fett** geschriebenen Marker wurden auch in der zweiten Phase der Studie (und somit für alle Fälle) verwendet. (MHK = Major Histokompatibilitäts-Komplex)

<b>Angefärbtes Protein</b>	<b>Beschreibung</b>	<b>Grund der Auswahl</b>
<b>Tryptase</b>	Serin-Protease, Expression durch Mastzellen, (Uhlen u. a. 2015; Human Protein Atlas 2019m; Hantschke 2016)	Aktuell Goldstandard zur Detektion von Mastzellen in der IHC (Valent, Akin, Escribano u. a. 2007; Hartmann u. a. 2016)
<b>CD117</b>	cKIT-Protoonkogen-Tyrosinkinase-Rezeptor, Ligand: SCF, Expression u.a. durch Mastzellen (auch Melanozyten, Brustgewebe etc.)(Uhlen u. a. 2015; Human Protein Atlas 2019a; Hantschke 2016)	Etablierter Mastzellmarker (C. Y. Li 2001), Vergleich zu Tryptase
<b>CD2</b>	T-Zell-Antigen, aberrante Expression bei versch. hämatologischen Erkrankungen (Uhlen u. a. 2015; Human Protein Atlas 2019c; Hantschke 2016)	Aberrante Expression auf Mastzellen im Knochenmark bei SM (Escribano, Orfao u. a. 1998), Minorkriterium der WHO-Diagnosekriterien für SM (Arber u. a. 2016; Valent, Akin und Metcalfe 2017)

*Fortgesetzt auf nächster Seite*

**Tabelle 4** – Fortsetzung von vorangehender Seite

<b>Angefärbtes Protein</b>	<b>Beschreibung</b>	<b>Grund der Auswahl</b>
<b>CD25</b>	Interleukin 2-Rezeptor alpha, Expression v.a. auf Immunzellen (Uhlen u. a. 2015; Human Protein Atlas 2019e; Hantschke 2016)	Aberrante Expression auf Mastzellen im Knochenmark bei SM (Escribano, Orfao u. a. 1998), Minorkriterium der WHO-Diagnosekriterien für SM (Arber u. a. 2016; Valent, Akin und Metcalfe 2017)
<b>CD3</b>	Exprimiert in Proteinkomplex mit dem T-Zell-Rezeptor (Uhlen u. a. 2015; Human Protein Atlas 2019f; Hantschke 2016)	Pan-T-Zell-Marker, Charakterisierung des Begleitinfiltrats bei MIS im Vergleich zu Kontrollen
<b>CD4</b>	Exprimiert von T-Helferzellen, bindet an MHK Typ 2 (Uhlen u. a. 2015; Human Protein Atlas 2019h; Hantschke 2016)	Subdifferenzierung von T-Zellen, Charakterisierung des Begleitinfiltrats bei MIS im Vergleich zu Kontrollen
<b>CD8</b>	Exprimiert von zytotoxischen T-Zellen (Uhlen u. a. 2015; Human Protein Atlas 2019i; Hantschke 2016)	Subdifferenzierung von T-Zellen, Charakterisierung des Begleitinfiltrats bei MIS im Vergleich zu Kontrollen
<b>CD20</b>	Exprimiert von B-Zellen (aber nicht von Plasmazellen), wichtiger Marker in Lymphom- und Leukämiediagnostik (Uhlen u. a. 2015; Human Protein Atlas 2019d; Hantschke 2016)	B-Zell-Marker, Charakterisierung des Begleitinfiltrats bei MIS im Vergleich zu Kontrollen

*Fortgesetzt auf nächster Seite*

**Tabelle 4** – Fortsetzung von vorangehender Seite

<b>Angefärbtes Protein</b>	<b>Beschreibung</b>	<b>Grund der Auswahl</b>
CD45	common leucocyte antigen, exprimiert auf allen Leukozyten (Uhlen u. a. 2015; Human Protein Atlas 2019i; Hantschke 2016)	verstärkte Expression auf Mastzellen bei SM berichtet (Chisholm u. a. 2015), Suchmarker für weitere leukozytische Zellen im Begleitinfiltat
CD14	Affinitätsrezeptor für Lipopolysaccharide, exprimiert u.a. auf Monozyten, Makrophagen, Langerhanszellen, dendritischen Zellen (Uhlen u. a. 2015; Human Protein Atlas 2019b; Hantschke 2016)	Detektion insb. von Langerhanszellen und dendritischen Zellen zur Charakterisierung des Begleitinfiltats bei MIS im Vergleich zu Kontrollen
CD30	Teil der TNF-Superrezeptor-Familie (8), exprimiert auf aktivierten Lymphozyten, häufig in kutanen Lymphomen positiv (Uhlen u. a. 2015; Human Protein Atlas 2019g; Hantschke 2016)	Aberrante Expression auf neoplastischen Mastzellen bei SM (Valent, Akin und Metcalfe 2017)
CD68	Exprimiert von Monozyten, Makrophagen, Mastzellen und myeloiden Vorläuferzellen (Uhlen u. a. 2015; Human Protein Atlas 2019j; Hantschke 2016)	Marker für Makrophagen, Charakterisierung des Begleitinfiltats bei MIS im Vergleich zu Kontrollen, Expression durch Mastzellen

*Fortgesetzt auf nächster Seite*

**Tabelle 4** – Fortsetzung von vorangehender Seite

<b>Angefärbtes Protein</b>	<b>Beschreibung</b>	<b>Grund der Auswahl</b>
CD79a	Exprimiert von B-Zellen und ihren Vorläufern, wichtiger Marker in Lymphom - und Leukämiediagnostik (Uhlen u. a. 2015; Human Protein Atlas 2019k; Hantschke 2016)	Pan-B-Zell-Marker, Charakterisierung des Begleitinfiltrats bei MIS im Vergleich zu Kontrollen

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Patient\*innen

Die Patient\*innenrekrutierung erfolgte an der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie von April 2016 bis Dezember 2017. Patient\*innen wurden entweder prospektiv in die Studie eingeschlossen oder bereits zu diagnostischen Zwecken gesammeltes Material wurde retrospektiv eingeschlossen. Die Sammlung der Hautproben erfolgte über die Biobank Biederstein. Die MIS-Patient\*innen wurden im Rahmen der Mastozytose-Sprechstunde rekrutiert. Für die Kontrollgruppen wurden Patient\*innen aus verschiedenen ambulanten und stationären Abteilungen der Klinik ausgewählt. Bei den Patient\*innen, die retrospektiv eingeschlossen wurden, wurde auf Aktendokumentation und Fotodokumentation zur Einordnung der Diagnose zurückgegriffen. Zusätzlich wurden elf Hautproben freundlicherweise von Herrn Prof. Hans-Peter Horny (Pathologisches Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München, Referenzzentrum des European Competence Network on Mastocytosis) zur Verfügung gestellt. Die vorgelegte Studie wurde durch die Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Technischen Universität München unter dem Zeichen 49/16 S geprüft und genehmigt.

### 2.2. Hautproben

Bei den untersuchten Proben handelt es sich vorwiegend um Stanzbiopsien von meist 4 mm Durchmesser. Vereinzelt wurden auch geringgradig kleinere Biopsien oder größere Exzidate ausgewertet.

Zur Entnahme der Hautproben wurde ein betroffenes Hautareal (bevorzugt im Bereich des Oberschenkels) mit 1-2ml 1% Mepivacainhydrochlorid-Lösung infiltriert. Anschließend wurde mithilfe einer Einmalhautstanze ein Hautzylinder ausgeschnitten und mit einer sterilen Schere basal abgetrennt. Der Hautdefekt wurde durch eine Einzelknopfnah mit Polyamid-Nahtmaterial versorgt und mit einem Druckverband abgedeckt.

Die Hautproben wurden in Formaldehydlösung fixiert und in Paraffin eingedeckt. Die Formalinfixierten und Paraffin-eingebetteten (FFPE) Blöcke wurden nach ausreichender Kühlung am Mikrotom 4  $\mu\text{m}$  dick geschnitten. Die Gewebeschnitte wurden in ein 58°C warmes Wasserbad gelegt, bevor sie auf Objektträger aufgezogen wurden. Die Objektträger wurden zum Abschmelzen des Paraffins bei 70°C für 20 Minuten gelagert und dann abgekühlt.

### 2.3. Immunhistochemische Färbungen

Die Gewebeschnitte wurden immunhistochemisch auf verschiedene Antigene untersucht. Immunhistochemische Färbungen funktionieren nach folgendem Prinzip: Zunächst werden die Gewebeproben mit einem primären Antikörper, welcher ein spezifisches Protein (=Antigen)

bindet, inkubiert. Nach Abwaschen ungebundener Reste des Primärantikörpers wird ein sekundärer Antikörper hinzugefügt, welcher an die gewebegebundenen Primärantikörper bindet. In einem letzten Schritt kommt es durch Zugabe eines Farbstoffes, welcher sich im Bereich der Antigen-Antikörperkomplexe anreichert, zu einer sichtbaren Markierung des gesuchten Proteins. Die Färbungen wurden mit dem BondMax Färbeautomaten (Leica Biosystems Nussloch GmbH) nach den Angaben des Herstellers automatisiert durchgeführt. Die Behandlung der Objektträger erfolgte je nach verwendetem Antikörper entweder mit Citrat-Puffer (Epitope Retrieval Solution 1 = ER1) oder EDTA-Puffer (Epitope Retrieval Solution 2 = ER2) für 20 Minuten. Die jeweiligen Färbeprotokolle der in dieser Studie verwendeten Primärantikörper sind in Tabelle 5 aufgeführt. Die Antigen-gebundenen Primärantikörper wurden durch das Refine Red Detektionskit mit dem Farbstoff gekoppelt. Dieses Kit enthält neben sekundären Antikörpern und Farbstoffpolymeren auch Hämatoxylin zur Gegenfärbung der Zellkerne. Nach Abschluss der Färbungen wurden die Objektträger über eine Alkohol-Xylol-Reihe manuell entwässert und mit Eukitt-Eindeckmedium und Deckgläsern fixiert.

## 2.4. Mikroskopische Auswertung

Die mikroskopische Begutachtung der Gewebeschnitte erfolgte mithilfe des Lichtmikroskops Leica DMRB. Das Mikroskop war zusätzlich mit einem in das Okular integrierten Zählgitter ausgestattet. Bei 400-facher Vergrößerung entsprach die Seitenlänge eines Quadrats des Zählgitters 25  $\mu\text{m}$ . Die Kriterien, anhand derer die einzelnen Gewebeschnitte analysiert wurden, werden im Folgenden erläutert. Für Information über die Gründe der Auswahl der im Folgenden aufgelisteten Färbungen bzw. deren Relevanz für die Fragestellung dieser Arbeit sei auf Abschnitt 1.2.2 verwiesen.

### 2.4.1. Tryptase

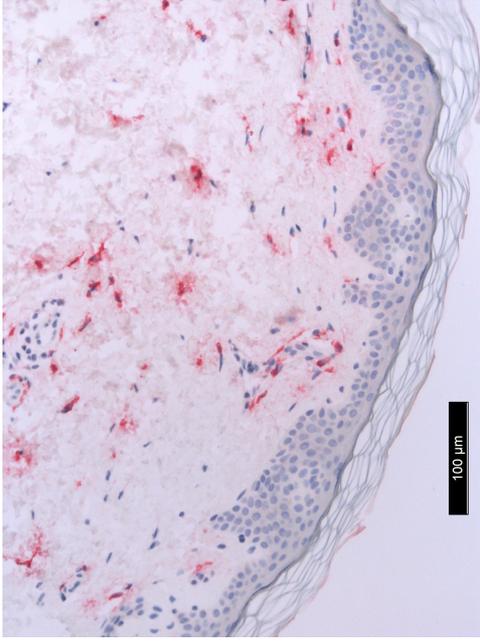
Um die Mastzellichte zu ermitteln, wurden in drei horizontalen (parallel zur Epidermis geschichteten) Ebenen des Gewebeschnitts alle Mastzellen gezählt. Die erste der betrachteten Ebenen umfasste dabei die oberen (epidermal gelegenen) 300 $\mu\text{m}$  der Dermis. Die beiden weiteren Ebenen schlossen sich in 300 bzw. 600 $\mu\text{m}$  Tiefe an, sodass sich der betrachtete Bereich auf insgesamt 900 $\mu\text{m}$  Tiefe und die komplette Breite der jeweiligen Probe erstreckte. Anschließend wurde die Mastzellichte in den einzelnen Ebenen ermittelt, indem die Anzahl der gezählten Mastzellen durch die betrachtete Fläche geteilt wurde.

Außerdem erfolgte eine Klassifizierung der Mastzellverteilung. Dabei wurden die Kategorien „periadnexiell“, „perivasal“, „interstitiell“, „Cluster (3 bis 5 Zellen)“, „Cluster (mehr als 5 Zellen)“ und „disseminierte Verteilung“ jeweils mit „ja“ oder „nein“ beantwortet. Mit der Kategorie „interstitiell“ ist dabei gemeint, dass Mastzellen nicht nur in räumlicher Nähe zu Gefäßen oder Adnexen, sondern auch „frei“ im Gewebe verteilt zu finden sind. Zudem wurde die basale Pigmentierung der Epidermis semiquantitativ bestimmt. Hierzu wurden jeweils ein Referenzfall mit leichter, mittlerer und starker basaler Pigmentierung ausgewählt, anhand derer alle anderen Fälle eingeteilt wurden. Abbildung 4 zeigt histologische Bilder der drei Referenzfälle.

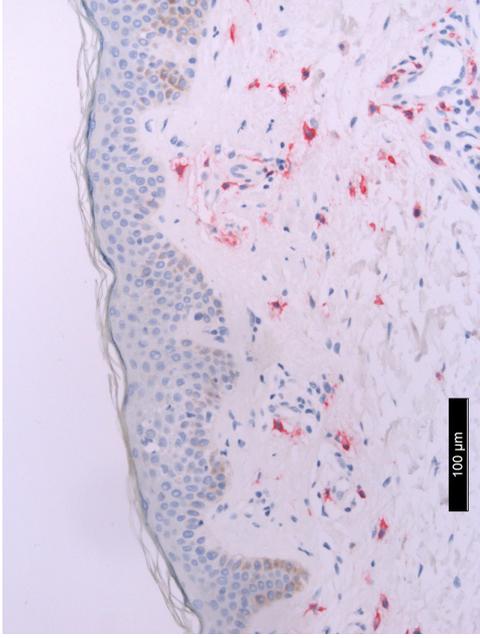
**Tabelle 5 Immunhistochemische Färbungen** Diese Tabelle zeigt eine Auflistung der jeweils für die Primärantikörper verwendeten Verdünnungen und ER Lösungen (ER 1 = Citratpuffer, ER 2 = EDTA-Puffer). Für die genaue Herstellerbezeichnung der einzelnen Antikörper sei auf Tabelle 6 verwiesen

<b>Antikörper</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Protokoll</b>
Tryptase-Antikörper (Maus)	1:300	ER1
CD117-Antikörper (Kaninchen)	pur	ER2
CD2-Antikörper (Maus)	1:1	ER2
CD25-Antikörper RtU (Maus)	1:1	ER2
CD3-Antikörper (Kaninchen)	1:1,5	ER2
CD4-Antikörper (Kaninchen)	1:1	ER2
CD8-Antikörper (Maus)	1:1	ER1
CD20-Antikörper (Maus)	1:1	ER1
CD45-Antikörper (Maus)	1:1	ER1
CD14-Antikörper (Kaninchen)	1:25	ER2
CD30-Antikörper (Maus)	pur	ER1
CD68-Antikörper (Maus)	1:200	ER2
CD79a-Antikörper (Maus)	1:1	ER1

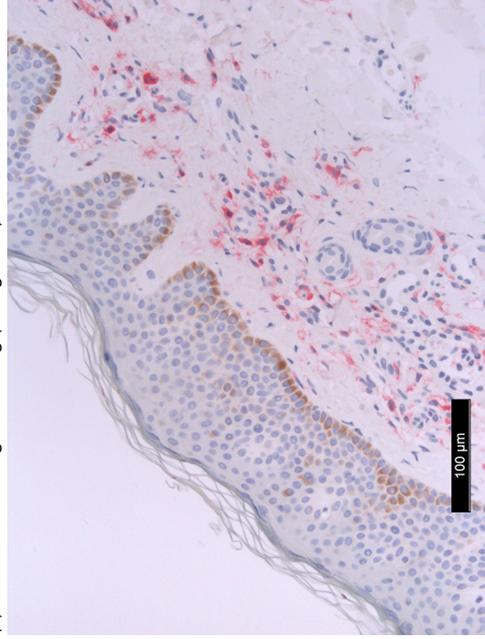
(a) Leichte basale Pigmentierung (Kategorie 1)



(b) Mittlere basale Pigmentierung (Kategorie 2)



(c) Starke basale Pigmentierung (Kategorie 3)



**Abbildung 4 Referenzbilder zur semiquantitativen Einteilung des Pigmentierungsgrades der basalen Epidermis** Gezeigt sind drei Gewebeschnitte in Tryptase-Färbung. Das basal in der Epidermis gelegene Melanin-Pigment kommt ohne spezifische Färbung braun zur Darstellung.

#### **2.4.2. CD117**

Ebenso wie in der Tryptasefärbung wurde auch in der CD117-Färbung die Dichte des Mastzellinfiltrats bestimmt. Das genaue Vorgehen wird im vorhergehenden Abschnitt 2.4.1 beschrieben. Zudem wurde die Größe der Mastzellen unter Zuhilfenahme des Programms ImageJ (Images Processing and Analyzing in JAVA, zur Verfügung gestellt durch das NIH) ermittelt. Hierzu wurden auf digitalen Bildern in 400-facher Vergrößerung die jeweils zehn größten und vollständig mit Zellkern abgebildeten Mastzellen vermessen. Die Mastzellen wurden dabei manuell umzeichnet, damit anschließend der Flächeninhalt des umzeichneten Areals durch das Programm ermittelt werden kann. Das Programm wurde auf den Maßstab, der durch die Software (LAS V4.0 = Leica Application Site Version 4.0) des Mikroskops auf den Bildern eingefügt wurde, geeicht.

Zusätzlich wurde vermerkt, ob die Form der Mastzellen im vorliegenden Gewebe vorwiegend spindelförmig war.

#### **2.4.3. CD2 und CD25**

Wir untersuchten die Positivität der Mastzellen für CD2 und CD25. Diese Färbungen wurden nur bei den Mastozytose-Fällen, Mastozytomen und unklaren Fällen durchgeführt. Spindelförmige Zellen (bei Mastozytomen auch kuboide Zellen) mit einer Färbung auf CD2 oder CD25 wurden als positiv gewertet.

#### **2.4.4. CD3**

Zunächst wurden alle Gewebeschnitte auf CD3 positive T-Zellen untersucht und anschließend in eine der Kategorien „T-Zellen vorhanden“ oder „T-Zellen nicht vorhanden“ eingeteilt. Auf allen Gewebeschnitten der ersten Kategorie wurde die T-Zelldichte in den oberen 900 µm der Dermis nach der in Abschnitt 2.4.1 beschriebenen Methode ermittelt. Dabei wurde allerdings im Falle der CD3-Färbung keine Unterscheidung zwischen den drei Ebenen getroffen, sodass als Messwert nur die T-Zelldichte in den oberen 900 µm der Dermis untersucht wurde. Vergleichbar mit der Klassifizierung der Mastzellverteilung, die in Abschnitt 2.4.1 beschrieben wird, wurden auch die CD3-gefärbten Schnitte nach folgenden Kategorien beurteilt: „periadnexiell“, „perivasal“, „interstitiell“, „Cluster“ und „disseminierte Verteilung“.

#### **2.4.5. CD4 und CD8**

CD4 und CD8 wurden in der Konzeptionsphase dieser Studie bei insgesamt neun Mastozytose-Fällen gefärbt, um bei Vorliegen eines T-zellreichen Infiltrats zwischen CD4- und CD8-positiven T-Lymphozyten zu unterscheiden. Es wurden jeweils alle CD4- bzw. CD8-positiven Lymphozyten auf einem Gewebeschnitt gezählt.

#### **2.4.6. CD14**

CD14 wurde in der Konzeptionsphase dieser Studie bei insgesamt zehn Mastozytose-Fällen und neun Kontroll-Fällen gefärbt. In der mikroskopischen Auswertung dieser Färbungen wurde nach CD14-positiven, monozytären Zellen gesucht und diese wurden gegebenenfalls gezählt.

#### **2.4.7. CD20**

CD20 wurde als B-Zell-Marker in der Konzeptionsphase dieser Studie bei insgesamt vier Mastozytose-Fällen und acht Kontroll-Fällen gefärbt. Gegebenfalls wurden alle CD 20 positiven Zellen gezählt.

#### **2.4.8. CD30**

CD30 wurde in der Konzeptionsphase dieser Studie bei sieben Mastozytose-Fällen und fünf Kontroll-Fällen gefärbt. CD30-positive Mastzellen (also spindelförmigen Zellen) wurden gegebenenfalls gezählt.

#### **2.4.9. CD45**

CD45 wurde in der Konzeptionsphase dieser Studie bei insgesamt vier Mastozytose-Fällen und acht Kontroll-Fällen gefärbt. Wir suchten auf den Gewebeschnitten nach spindelförmigen Zellen (Mastzellen), die sich in ihrer Färbeintensität von anderen umliegenden leukozytischen Zellen unterschieden.

#### **2.4.10. CD68**

CD68 wurde in der Konzeptionsphase dieser Studie bei insgesamt sieben Mastozytose-Fällen und zehn Kontroll-Fällen gefärbt. Es wurde nach CD68 positiven Makrophagen gesucht und diese wurden ggf. gezählt. Zudem wurde evaluiert, ob CD68 von Mastzellen in den jeweiligen Schnitten exprimiert wird. Im Falle einer positiven Färbung der Mastzellen wurde durch den Vergleich mit CD117 und Tryptase-Färbung festgelegt, ob es sich um eine komplette oder partielle CD68-Positivität des Mastzellinfiltrats handelt.

#### **2.4.11. CD79a**

CD79a wurde in der Konzeptionsphase dieser Studie als Pan-B-Zell-Marker bei insgesamt vier Mastozytose-Fällen und zehn Kontroll-Fällen gefärbt. Gegebenenfalls wurden alle CD79a-positiven Zellen gezählt.

### **2.5. KIT D816V - Mutationsanalyse**

Alle Gewebeproben wurden bezüglich einer möglicherweise vorliegenden KIT D816V Mutation untersucht. Die Messung erfolgte mittels quantitativer Real-Time Polymerase-Chain-Reaction (qPCR) und wurde durch die Arbeitsgruppe von Thomas Kristensen (Odense University Hospital, Odense, Dänemark) als Kooperationspartner in dessen Labor durchgeführt. Bei einer qPCR handelt es sich um ein Verfahren, das zum quantitativen Nachweis einer spezifischen DNA Sequenz verwendet wird. Dazu wird mit Hilfe passender Primer sowie einer hitzestabilen DNA-Polymerase eine Vervielfältigung der Zielsequenz erzielt. Der Nachweis der PCR-Produkte erfolgt über die Messung von Fluoreszenzsignalen, welche direkt proportional zur Zunahme des PCR-Produktes ansteigen (Benjamin A Raby 2019). Eine detaillierte Beschreibung der technischen Durchführung der hier verwendeten qPCR findet sich in der Publikation von

Kristensen, Vestergaard u. a. (2011). Als Probenmaterial verwendeten wir mindestens zwei 10 µm dicke Schnitte der FFPE-Blöcke, die beim Einstellen des Mikrotoms zum Herstellen der Schnittserien für die immunhistochemischen Färbungen anfielen (sog. „Trimmen“). Für jede Probe wurde jeweils ein qPCR-Ansatz zur Amplifizierung des Wildtyp-KIT-Gens (Kontroll-Assay) und ein Ansatz zur Amplifizierung des D816V mutierten KIT-Gens hergestellt und gemessen. Zusätzlich wurde parallel eine Messung mit den KIT D816V positiven Zellen der Human Mast Cell 1-Zellkulturlinie (HMC1-Zellen) als Positivkontrolle durchgeführt. Die Proben wurden entsprechend der Ergebnisse als „positiv“, „negativ“ oder „nicht beurteilbar“ eingeteilt. Proben wurden entsprechend des Standards aus dem Methoden-Papier von Kristensen, Vestergaard u. a. (2011) als positiv gewertet, wenn nicht mehr als 44 Replikationszyklen bis zum Nachweis der Mutation notwendig waren (=Ct-Wert). Zur Beurteilung, ob die Qualität der Probe ausreichend war, wurde ein Ct-Wert von  $\leq 33$  Replikationszyklen im Wildtyp-KIT-Assay festgelegt. Dieser Schwellenwert wurde anhand der qPCR-Ergebnisse der Proben, die von erwachsenen Patient\*innen mit Mastozytose stammten, festgelegt, da bei diesen Patient\*innen in  $\geq 90\%$  der Fälle von einem positiven Mutationsstatus ausgegangen werden kann (siehe hierzu auch Abschnitt 1.1.3). Innerhalb dieser Patient\*innengruppe lagen alle Ct-Werte für den Wildtyp-Assay bei  $\leq 33$ , wenn eine KIT D816V Mutation nachweisbar war. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass bei einem Cut-off Ct-Wert von 33 für den Kontroll-Assay eine ausreichende Probenqualität zur Beurteilung des Mutationsstatus vorliegt.

## 2.6. Statistische Auswertung

Zur statistischen Auswertung der erhobenen Daten wurden die Programme SPSS Statistics, Version 24 und 25 von IBM und R Studio (R Studio Inc., Boston, R Version 3.6.1) verwendet. R Studio wurde ausschließlich zur Durchführung der Random Forest Analyse und zur Berechnung von Cut-off-Werten mittels rekursiver Partitionierung verwendet. Hierzu wurden folgende Spezialpakete benutzt: rpart\_4.1-15 (Therneau u. a. 2018), rpart.plot\_3.0.7 (Milborrow 2018), randomForest\_4.6.-14 (Breiman 2002), caret\_6.0-84 (Wing u. a. 2018), rattle\_5.2.0 (Williams 2011). Alle weiteren statistischen Berechnungen wurden mit SPSS Statistics durchgeführt.

### 2.6.1. Deskriptive Statistik

Die Daten wurden mittels Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung überprüft. Bei Datensätzen, bei denen nicht von einer Normalverteilung ausgegangen werden konnte, wurden Median, 25. und 75. Perzentilen (sowie z.T. der daraus errechenbare Interquartilenabstand IQA) als Lage- bzw. Streuungsmaße angegeben. Bei normalverteilten Daten wurden Mittelwert und Standardabweichung berechnet. Zur Beschreibung der Daten wurden absolute und relative Häufigkeiten berechnet.

### 2.6.2. Analytische Statistik

Zur analytischen Aufarbeitung wurden folgende statistische Testverfahren genutzt: Spearman-Korrelation, Pearsons-Chi, Kruskal-Wallis-Test, Mann-Whitney-U-Test, Multivariate logistische Regression, Random Forest Modell. Im Folgenden wird kurz auf die jeweiligen Testverfah-

ren und adressierten Fragestellungen eingegangen. P-Werte  $\leq 0,05$  wurden als signifikant gewertet.

### **Spearman-Korrelation**

Folgende Fragestellung wurde untersucht:

- Korrelation der ermittelten Mastzellichten in der CD117 und in der Tryptase-Färbung

Die Ergebnisse der Spearman-Korrelation wurde nach folgendem Schema angegeben: Korrelationskoeffizient ( $r$ ), p-Wert.

### **Pearsons Chi-Quadrat-Test**

Folgende Fragestellung wurden untersucht:

- Zusammenhang zwischen den Kategorien „Diagnose“ und „Interstitielles Vorkommen von Mastzellen“.

Die Ergebnisse des Pearson Chi-Quadrat-Tests wurden nach folgendem Schema angegeben: Chi-Quadrat(Freiheitsgrad) = Wert des Chi-Quadrats, p-Wert. Als Zusammenhangsmaß wurde bei o.g. Fragestellung Phi nach folgendem Schema angegeben: Phi = Wert des Zusammenhangsmaßes, p-Wert

### **Mann-Whitney-U-Test**

Folgende Fragestellungen wurden untersucht:

- Unterschiede der Mastzellichten zwischen Mastozytose-Fällen und Kontroll-Fällen,
- Unterschiede der Mastzellichten in benachbarten Hautebenen (Zur anschließenden paarweisen Testung nach Durchführung des Kruskal-Wallis-Tests),
- Unterschiede der Mastzellgrößen (als paarweise Vergleiche nach Durchführung des Kruskal-Wallis-Tests).

Die Ergebnisse des Mann-Whitney-U-Tests wurden nach folgendem Schema angegeben: U-Wert, Z-Statistik, p-Wert.

### **Kruskal-Wallis-Test**

Da die Messwerte der Mastzellichten nicht in allen Subgruppen normalverteilt waren und somit die Voraussetzung für eine ANOVA nicht gegeben waren, wurde für folgende Fragestellung

der Kruskal-Wallis-Test verwendet:

- Unterschied der Mastzellichten in verschiedenen Hautebenen (jeweils bei Mastozytose und in der Kontrollgruppe),
- Unterschied der Pigmentierungsgrade in den verschiedenen Untersuchungsgruppen.

Die Ergebnisse des Kruskal-Wallis-Tests wurden nach folgendem Schema angegeben: Chi-Quadrat(Freiheitsgrad) = Wert des Chi-Quadrats, p-Wert.

### **Random Forest Modell**

Der Random Forest ist ein auf dem statistischen Konzept von Entscheidungsbäumen basierendes Vorhersage-Modell. Hierbei wird die Methode des „Ensemble-Lernens“ verwendet. Stark vereinfacht formuliert, wird beim Ensemble-Lernen ein Set (oder Ensemble) von Hypothesen *gemeinsam* betrachtet, um eine Vorhersage zu treffen. Im Falle dieser Arbeit, soll eine Vorhersage bezüglich der Zuordnung zu den Kategorien „Mastozytose“ bzw. „Nicht-Mastozytose“ getroffen werden. Zu diesem Zweck werden von einem Algorithmus auf Grundlage der Daten zahlreiche Entscheidungsbäume aufgebaut. Dazu werden die verschiedenen untersuchten Eigenschaften (=Variablen) der Proben (z.B. Mastzellichte, Pigmentierungsgrad etc.) herangezogen. Für jeden Entscheidungsbaum wird eine zufällige Stichprobe von Fällen aus der Gesamtheit aller Fälle ausgewählt. Dies entspricht dem statistischen Konzept des „Bootstrapping“. Anschließend wird der generierte Entscheidungsbaum dann auf alle Fälle angewendet, die zu seiner Erstellung nicht verwendet wurden (= Out-of-Bag-Vorhersage). Die Besonderheit der Entscheidungsbäume beim Random Forest besteht nun darin, dass pro Baum nicht versucht wird, die bezogen auf *alle* Variablen beste Entscheidung zu treffen, sondern jeweils eine zufällige Auswahl der unterschiedlichen Variablen ausgewählt wird, anhand derer die treffendste Zuordnung festgelegt wird. Zum Schluss werden die Ergebnisse der verschiedenen Out-of-Bag-Vorhersagen aggregiert und der Algorithmus liefert eine Aussage über die globale Wichtigkeit der Einzelvariablen für die Vorhersage (= Mean Decrease Accuracy) und die Reinheit der Trennung, die durch eine Einzelvariable (lokal an einem Entscheidungspunkt) erzielt wird (= Mean Decrease Gini). (Breiman 2001; Liaw u. a. 2002)

Für die Random Forest Analyse wurden nur die Daten der Fälle aus den Gruppen „MPKM“ und „Kontrolle“ verwendet. Die Daten der Mastozytome und die Daten der bislang unklaren Fälle wurde folglich nicht eingespeist. Neben denjenigen dermatohistologischen Kriterien, die bei allen Fällen bestimmt wurden, wurde auch der KIT D816V-Mutationsstatus als Vergleichsparameter mit eingeschlossen. In einem anderen Modell wurden die gleichen Kriterien ohne den Mutationsstatus eingespeist. Beide Modelle schließen auch die möglichen Confounder Alter und Geschlecht ein. Zudem mussten vor Durchführung der Analyse die Daten derart bereinigt werden, dass keine fehlenden Werte im Datensatz vorhanden sind. Dies war in einem Fall für die Werte der „Mastzellichte unten“ und „Mastzellichte Mitte“ notwendig. Die fehlenden Daten kamen dadurch zustande, dass in dem genannten Fall die Hautprobe nur die sehr oberflächlichen Anteile der Dermis miterfasste und somit die unteren Anteile nicht

zur Auswertung zur Verfügung standen. Die fehlenden Werte wurden durch den Mittelwert für die jeweilige Variable in der entsprechenden Untersuchungsgruppe ersetzt. Die Variable der Mastzellgröße wurde nicht in das Modell eingespeist, da nur in 19 von 36 Kontrollfällen Werte vorlagen. Den fehlenden Werten bei der Mastzellgröße liegt das Problem zugrunde, dass in einigen Kontrollfällen nicht zehn vollständig abgebildete Mastzellen vermessen werden konnten, um die Mastzellgröße zu bestimmen. Wenn nun also in 17 Fällen die Messwerte der Mastzellgröße durch den gruppenbezogenen Mittelwert ersetzt worden wären, würde dies möglicherweise zu einer groben Verfälschung der Daten führen.

Die Ergebnisse des Random Forest Modells wurden in dieser Studie dazu verwendet, passende Parameter für die im Folgenden beschriebene logistische Regression auszuwählen.

### **Berechnung von Cut-off-Werten**

Zur Berechnung von Cut-off-Werten, die entweder für den Gini-Index („beste Reinheit der Trennung“) oder für Sensitivität und Spezifität optimiert sind, wurde das Prinzip der rekursiven Partitionierung (Therneau u. a. 2018) angewendet. Hierbei berechnet die Statistik-Software für jeden möglichen Cut-off-Wert die jeweiligen Werte (also Sensitivität, Spezifität oder Gini-Index) im Bezug auf die angefragten Zuordnungskategorien. Am Ende wählt die Software dann den optimalen Wert aus und gibt diesen als Ergebnis an. In dieser Studie wurden Cut-offs für die Mastzellichte in den oberen 300 µm der Dermis anhand der Messergebnisse aus der CD117-Färbung errechnet.

### **Logistische Regression**

In dieser Studie wurden logistische Regressionsmodelle erstellt, die als abhängige Variable die Kategoriezuordnung zu „Mastozytose“ bzw. „Nicht-Mastozytose“ haben. Als unabhängige Variablen wurden diejenigen gewählt, die im Random Forest Modell besonders hoch priorisiert wurden (Pigmentierung, CD117-Dichte obere 300 µm, interstitielle Mastzellen, MZ-Cluster). Die Regressionsmodelle wurden jeweils für Alter und Geschlecht kontrolliert. Die Ergebnisse der Regression wurden nach folgendem Schema angegeben: Chi-Quadrat(Freiheitsgrad) = Wert des Chi-Quadrats, p-Wert, Regressionskoeffizienz = Wert des Regressionskoeffizienten, p-Wert, Odds Ratio (OR).

## **2.7. Labormaterial und Geräte**

Die folgenden Tabellen beinhalten eine Zusammenstellung der verwendeten Antikörper, Reagenzien, sonstigen Materialien und Geräte.

**Tabelle 6** Antikörper, Reagenzien und sonstige Materialien

<b>Name</b>	<b>Hersteller</b>	<b>bez. als</b>
Biopsy Punch Einmalhautstanze 4mm	Stiefel GmbH & Co. KG, München	Einmalhautstanze
Mecain-Actavis 1% Injektionslösung	Actavis, Namensänderung zu PUREN Pharma GmbH & Co. KG, München	Mepivacainhydrochlorid 1%
Dafilon blau monofiles Nahtmaterial aus Polyamid	B. Braun Melsungen AG, Melsungen	Polyamid-Nahtmaterial
Formaldehyd-Lösung, 3,5-3,7%, neutral gepuffert, mit Methanol stabilisiert	Otto Fischer GmbH & Co. KG, Saarbrücken	Formaldehydlösung
Adhäsions-Objektträger Superfrost Plus	Menzel Gläser Thermo Scientific, Waltham (USA)	Objektträger
Paraplast Tissue Infiltration/Embedding Medium	McCormick Scientific, Fabbrico (Italien)	Paraffin
Bond Ready-to-Use Primary Antibody CD25 (4C9)	Leica Biosystems GmbH, Nussloch	CD25-Antikörper RtU
Bond Antibody Diluent	Leica Biosystems GmbH, Nussloch	Verdünnungspuffer
Mouse anti-CD8, 6ml gebrauchsfertig	Zytomed Systems GmbH, Bargteheide	CD8-Antikörper
Rabbit anti CD4, 7ml vorverdünnt	Zytomed Systems GmbH, Bargteheide	CD4-Antikörper

*Fortgesetzt auf nächster Seite*

**Tabelle 6** – Fortsetzung von vorangehender Seite

<b>Name</b>	<b>Hersteller</b>	<b>bez. als</b>
Monoclonal Mouse Anti-Human Mast Cell Tryptase Clone AA1	Dakocytomation GmbH, Hamburg	Tryptase-Antikörper
CD45 (LCA) (2B11 und PD7/26)	Cell Marque Corporation, Rocklin (USA)	CD45-Antikörper
Mouse anti-CD20 (L26), 16ml gebrauchsfertig	Zytomed Systems GmbH, Bargteheide	CD20-Antikörper
Rabbit anti-CD3 (SP7), 16ml gebrauchsfertig	Zytomed Systems GmbH, Bargteheide	CD3-Antikörper
CD2 (MRQ-11)	Cell Marque Corporation, Rocklin (USA)	CD2-Antikörper
CD117/c-kit Rabbit Polyclonal Antibody, 6ml vorverdünnt	Diagnostic BioSystems (Zytomed Systems GmbH, Bargteheide)	CD117-Antikörper (Kaninchen)
Rabbit anti-CD14 (Klon EPR3653), 0,5 ml Konzentrat	Zytomed Systems GmbH, Bargteheide	CD14-Antikörper
Mouse Monoclonal anti CD79a (HM47/A9)	Diagnostic BioSystems (Zytomed Systems GmbH, Bargteheide)	CD79a-Antikörper
CD68 (Makrophage Marker) Ab-3, Klon KP1	NeoMarkers Inc., Portsmouth (USA)	CD68-Antikörper
Mouse anti CD30 (Ki-1-Antigen), 6ml gebrauchsfertig	Zytomed Systems GmbH, Bargteheide	CD 30-Antikörper

*Fortgesetzt auf nächster Seite*

**Tabelle 6** – Fortsetzung von vorangehender Seite

<b>Name</b>	<b>Hersteller</b>	<b>bez. als</b>
Bond Polymer Refine Red Detection	Leica Biosystems GmbH, Nussloch	Refine Red Detektionskit
Eukitt Eindeckmedium	O. Kindler GmbH Mikroskopische Gläser, Freiburg	Eukitt
Cover Slips 24 x 60 mm, #1	Menzel Gläser Thermo Scientific, Waltham (USA)	Deckgläser

**Tabelle 7** Verwendete Geräte

<b>Name</b>	<b>Hersteller</b>	<b>bez. als</b>
BondMax IHC- und ISH-Färbeautomat	Leica Biosystems GmbH, Nussloch	BondMax Färbeautomat
HM355S automatisches Mikrotom	ThermoFisher Scientific Inc., Waltham (USA)	Mikrotom
Leica DMRB Lichtmikroskop	Leica Biosystems GmbH, Nussloch	Mikroskop

## 3. Ergebnisse

### 3.1. Allgemeine Beschreibung der Studienkohorte

#### 3.1.1. Zusammensetzung der Patient\*innenkohorte und Kontrollkohorte

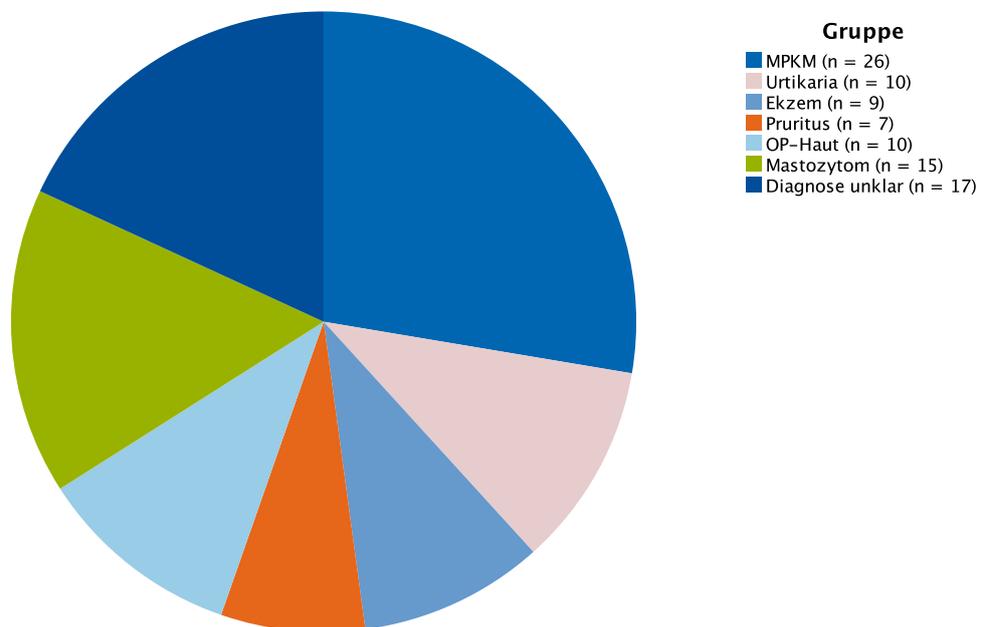
Insgesamt wurden 94 Patient\*innen in diese Studie eingeschlossen. Die Gruppe der MIS-Patient\*innen machte dabei 41 Patient\*innen aus. Diese können weiter unterschieden werden in Patient\*innen mit Mastozytom ( $n = 15$ ) und Patient\*innen mit einer klinisch ( $n = 11$ ) oder durch Knochenmarksbiopsie ( $n = 15$ ) gesicherten Mastozytose vom makulopapulösen Typ (MPKM) ( $n_{\text{gesamt}} = 11 + 15 = 26$ ). Weiterhin wurden 17 Patient\*innen eingeschlossen, bei denen die Diagnose MIS bislang nicht sicher gestellt werden konnte. Die Kontrollgruppe bestand aus 36 Patient\*innen. In der Kontrollgruppe befanden sich Patient\*innen mit Urtikaria ( $n = 10$ ), Ekzem ( $n = 9$ ), Pruritus sine materia ( $n = 7$ ) und Patient\*innen, bei denen im Rahmen dermatologischer Operationen unspezifisch veränderte Haut angefallen ist ( $n = 10$ ). Einen Überblick über die Zusammensetzung der Studienkohorte gibt Abbildung 5.

#### 3.1.2. Alters- und Geschlechtsverteilung

Die Tabellen 8 und 9 zeigen die Alters- und Geschlechtsverteilung in der Studienkohorte und in den einzelnen Untersuchungsgruppen. Ergänzend sei erwähnt, dass in der Gruppe „MPKM“ lediglich ein Kind (1 Jahr alt) eingeschlossen wurde. Alle anderen Patient\*innen dieser Gruppe waren 25 Jahre oder älter. In der Gruppe „Mastozytom“ wurden nur Kinder eingeschlossen.

**Tabelle 8 Geschlechterverteilung der Studienkohorte** Gezeigt ist die jeweilige Anzahl von männlichen und weiblichen Patient\*innen in den einzelnen Gruppen der Studienkohorte und in der Gesamtkohorte. Es wurde die absolute Anzahl und der prozentuale Anteil des jeweiligen Geschlechts in der betrachteten Gruppe angegeben.

Gruppe	männlich	weiblich
MPKM	10; 38,5%	16; 61,5%
Kontrolle	16; 44,4%	20; 55,6%
Mastozytom	9; 60%	6; 40%
Diagnose unklar	7; 41,2%	10; 58,8%
Gesamt	42; 44,7%	52; 55,3%



**Abbildung 5 Zusammensetzung der Studienkohorte** Gezeigt sind die verschiedenen Subgruppen der Studienkohorte und die jeweilige Anzahl an Patient\*innen pro Subgruppe.

**Tabelle 9 Altersverteilung der Studienkohorte** Gezeigt ist das jeweilige mediane Alter in Jahren in den einzelnen Gruppen der Studienkohorte und in der Gesamtkohorte. Zusätzlich wurden Minimum, Maximum, 25. und 75. Perzentile angegeben.

Gruppe	Median	Minimum	Maximum	25. Perzentile	75. Perzentile
MPKM	46	1	70	39	51
Kontrolle	64	22	83	38	75
Mastozytom	3	0	10	1	9
Diagnose unklar	37	0	57	30	44
Gesamt	41	0	83	25	57

## 3.2. Dermatohistopathologische Merkmale

### 3.2.1. Mastzellichte

Die Mastzellichte wurde mit Ausnahme der Mastozytome für alle Fälle sowohl für die CD117 als auch für die Tryptasefärbung berechnet ( $n = 79$ ). Mastozytome wurden von dieser Messung ausgeschlossen, da sie aus kompakten Mastzell-Paketen (i.S. eines Tumors) bestehen und somit eine Berechnung der Dichte von Mastzellen nicht sinnvoll erscheint. Bei den MPKM-Patient\*innen zeigte sich in den oberen 900  $\mu\text{m}$  der Dermis eine mediane Mastzellichte von 134 Zellen/ $\text{mm}^2$  (IQA = 130) in der Tryptase-Färbung und von ebenfalls 134 Zellen/ $\text{mm}^2$  (IQA = 124) in der CD117-Färbung. In der Kontrollgruppe lagen die medianen Messwerte bei 32 (IQA = 40) (Tryptase) bzw. 7 (IQA = 35) (CD117). Eine genaue Aufstellung der Werte findet sich in den Tabellen 10 und 11 bzw. als graphische Darstellung in Abbildung 6. Die Messwerte für die Mastzellichte waren in beiden Mastzell-Färbungen signifikant unterschiedlich zwischen Kontrollgruppe und MPKM-Patient\*innen (Mann-Whitney CD117-Dichte:  $U = 53,000$ ,  $Z = -5,907$ ,  $p < 0,001$ ; Mann-Whitney Tryptase-Dichte:  $U = 163$ ,  $Z = -4,261$ ,  $p < 0,001$ ). Dies war jeweils auch beim paarweisen Vergleich zwischen MPKM und den Kontroll-Subgruppen der Fall: MPKM versus Urtikaria (CD117):  $U = 19$ ,  $Z = -3,925$ ,  $p < 0,001$ ; MPKM versus Urtikaria (Tryptase):  $U = 42$ ,  $Z = -3,110$ ,  $p = 0,002$ ; MPKM versus Ekzem (CD117):  $U = 7$ ,  $Z = -3,939$ ,  $p < 0,001$ ; MPKM versus Ekzem (Tryptase):  $U = 33$ ,  $Z = -2,883$ ,  $p = 0,004$ ; MPKM versus Pruritus (CD117):  $U = 7$ ,  $Z = -3,702$ ,  $p < 0,001$ ; MPKM versus Pruritus (Tryptase):  $U = 30$ ,  $Z = -2,687$ ,  $p = 0,007$ ; MPKM versus OP-Haut (CD117):  $U = 20$ ,  $Z = -3,886$ ,  $p < 0,001$ ; MPKM versus OP-Haut (Tryptase):  $U = 58$ ,  $Z = -2,543$ ,  $p = 0,011$ .

Die Messungen in CD117-Färbung und Tryptase-Färbung ergaben sehr gut vergleichbare Werte. Dies bestätigte die Korrelation nach Spearman: Es zeigte sich erwartungsgemäß eine stark positive Korrelation ( $r = 0,617$ ,  $p < 0,001$ ) zwischen den Ergebnissen der beiden Mastzellfärbungen.

Bei der Betrachtung der Mastzellichten in den unterschiedlichen Ebenen der Dermis (0-300  $\mu\text{m}$ , 300-600  $\mu\text{m}$ , 600-900  $\mu\text{m}$ ) zeigten sich insbesondere bei den MPKM-Patient\*innen in der obersten, subepidermalen Schicht die höchsten Messwerte (siehe Tabellen 12, 13 und 14, 15). Während in der Kontrollgruppe in den unterschiedlichen Ebenen relativ ähnliche Mastzellichten gemessen wurden, zeigte sich bei MPKM ein typischer abfallender Gradient von oben (subepidermal) in die Tiefe der Dermis (siehe auch Abbildung 7). Diese Beobachtung konnte durch den Kruskal-Wallis-Test bestätigt werden: Die zentralen Tendenzen der Messwerte in der oberen, mittleren und unteren Hautschicht waren bei den MPKM-Fällen signifikant unterschiedlich (CD117: Chi-Quadrat(2) = 36,577,  $p < 0,001$ ; Tryptase: Chi-Quadrat(2) = 19,727,  $p < 0,001$ ). In der Kontrollgruppe war dies nicht der Fall (CD117: Chi-Quadrat(2) = 2,487,  $p = 0,288$ ; Tryptase-Färbung: Chi-Quadrat(2) = 1,930,  $p = 0,381$ ). Auch hier galt dies sowohl für die Kontrollgruppe als Ganzes, als auch für die einzelnen Subgruppen (Kruskal-Wallis): Urtikaria CD117: Chi-Quadrat(2) = 1,262,  $p = 0,532$ ; Urtikaria Tryptase: Chi-Quadrat(2) = 0,729,  $p = 0,694$ ; Ekzem CD117: Chi-Quadrat(2) = 0,036,  $p = 0,982$ ; Ekzem Tryptase: Chi-Quadrat(2) = 1,236,  $p = 0,539$ ; Pruritus CD117: Chi-Quadrat(2) = 0,382,  $p = 0,849$ ; Pruritus Tryptase: Chi-Quadrat(2) = 0,780,  $p = 0,677$ ; OP-Haut CD117: Chi-Quadrat(2) = 1,882,  $p = 0,390$ ;

**Tabelle 10 Mastzelldichte (Gesamt), Tryptase-Färbung** Gezeigt ist die mediane Mastzelldichte in n/mm<sup>2</sup> in den oberen 900 µm der Dermis in den unterschiedlichen Patient\*innengruppen. Zusätzlich wurden 25., 75. Perzentilen und der Interquartilsabstand (IQA) angegeben.

Gruppe	Median	25. Perzentile	75. Perzentile	IQA
MPKM	134	58	188	130
Urtikaria	27	5	41	36
Ekzem	37	9	51	42
Pruritus	26	12	33	19
OP-Haut	37	28	65	37
Kontrollen gesamt	32	13	53	40

OP-Haut Tryptase: Chi-Quadrat(2) = 0,707, p = 0,702.

Im paarweisen Vergleich der Messwerte der oberen und mittleren bzw. mittleren und unteren Schicht bei den MPKM-Patient\*innen zeigte sich jeweils ebenfalls ein signifikanter Unterschied:

- Mann-Whitney-U für den Vergleich „oben - Mitte“: CD117: U = 122,000, Z = -3,953, p < 0,001. Tryptase: U = 199,50, Z = -2,536, p = 0,011,
- Mann-Whitney-U für den Vergleich „Mitte - unten“: CD117: U = 160, Z = -3,259, p = 0,001. Tryptase: U = 197,000, Z = -2,581, p = 0,010.

Da die Messwerte in den oberen 300 µm laut Random Forest Analyse eine bessere Vorhersage bezüglich der Diagnosegruppe eines Falles zulässt (siehe auch 3.4), als die Mastzelldichte in der gesamten Dermis, führten wir zur Bestätigung noch einen Mann-Whitney-U-Test zum Vergleich der beiden Variablen durch. Hierbei bestätigte sich, dass auch die Mastzelldichte in den oberen 300 µm der Dermis hoch signifikant zwischen Kontrollen und MPKM-Patient\*innen unterschiedlich ist (CD117-Färbung: U = 32,000, Z = -6,274, p < 0,001; Tryptase-Färbung: U = 140,500, Z = -4,682, p < 0,001).

In den Abbildungen 11 und 12 finden sich (neben anderen Färbungen) jeweils auch ein Beispiel für einen Fall von MPKM bzw. ein Mastozytom in der CD117 und Tryptase-Färbung. Zudem zeigt Abbildung 14 mikroskopische Beispielfotos für unterschiedliche MZ-Dichten in der CD117-Färbung.

### 3.2.2. Mastzellverteilung

Neben den in Abschnitt 3.2.1 bereits beschriebenen Ergebnissen bezüglich der Lokalisationsstiefe von Mastzellen wurden noch weitere morphologische Kriterien zur Mastzellverteilung

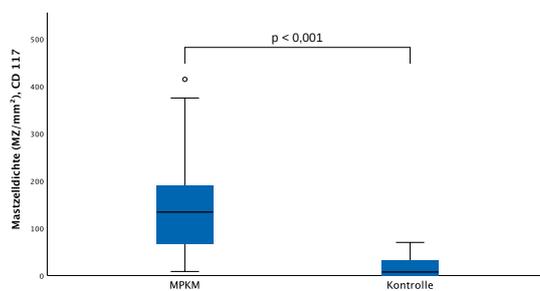
**Tabelle 11 Mastzellichte (Gesamt), CD117-Färbung** Gezeigt ist die mediane Mastzellichte in n/mm<sup>2</sup> in den oberen 900 µm der Dermis in den unterschiedlichen Patient\*innengruppen. Zusätzlich wurden 25., 75. Perzentilen und der Interquartilsabstand (IQA) angegeben.

Gruppe	Median	25. Perzentile	75. Perzentile	IQA
MPKM	134	67	191	124
Urtikaria	6	0	41	41
Ekzem	4	0	21	21
Pruritus	0	0	35	35
OP-Haut	21	0	29	29
Kontrollen gesamt	7	0	35	35

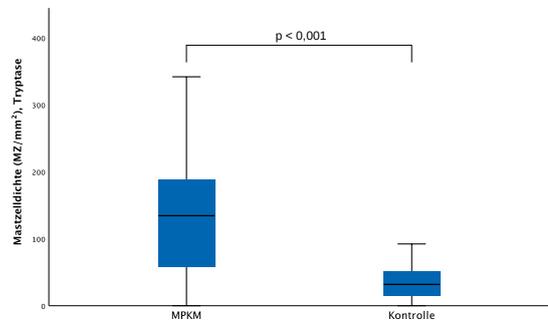
**Tabelle 12 Mastzellichte getrennt nach Hautebene, Tryptase-Färbung** Gezeigt ist die mediane Mastzellichte in n/mm<sup>2</sup> der jeweils 300 µm dicken Schichten der Dermis bei MPKM und Kontrollen. Die Kontrollgruppe wurde aus Gründen der Übersichtlichkeit in dieser Tabelle zusammengefasst. Für die detaillierten Ergebnisse in den Subgruppen der Kontrollgruppe sei auf Tabelle 13 verwiesen. Zusätzlich wurden 25., 75. Perzentilen sowie der IQA angegeben.

Hautschicht	MPKM				Kontrolle			
	Median	25. P.	75. P.	IQA	Median	25. P.	75. P.	IQA
0-300 µm	242	95	367	272	29	5	61	56
300-600 µm	98	38	125	87	33	13	59	46
600-900 µm	42	23	58	35	23	7	45	38

(a) Mastzellichte (gesamt), CD117-Färbung



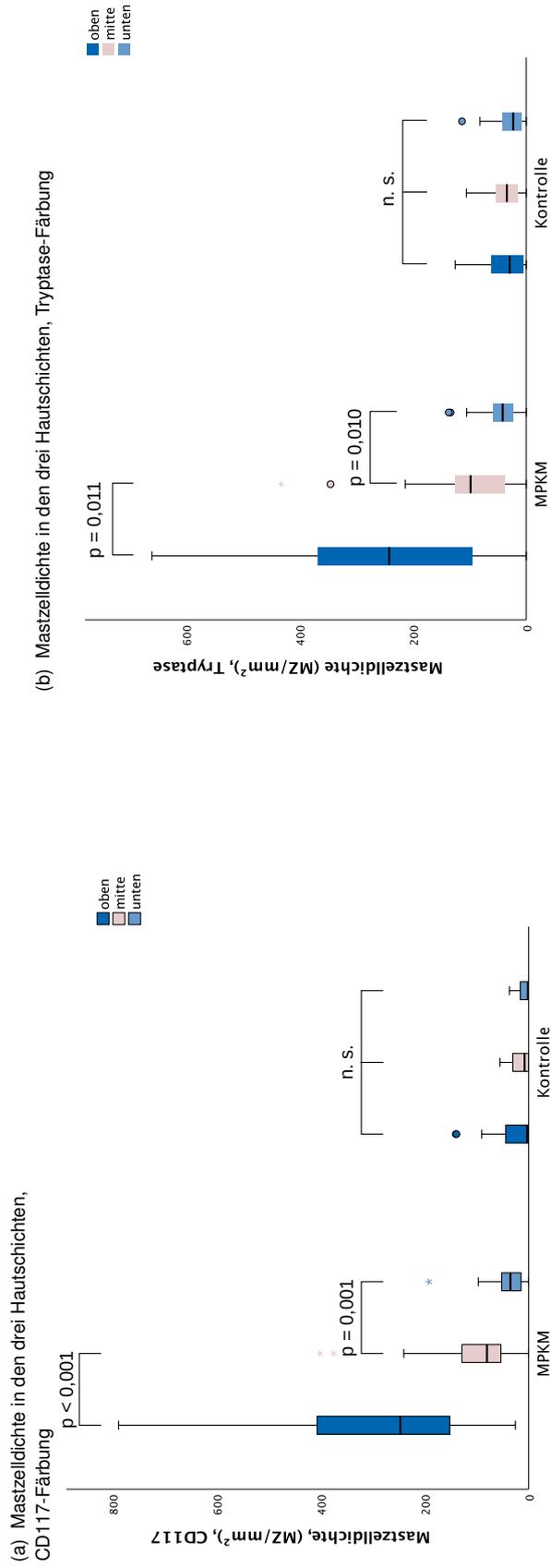
(b) Mastzellichte (gesamt), Tryptase-Färbung



**Abbildung 6 Mastzellichte (gesamt)** Die Boxplots zeigen die jeweiligen Mastzellichten bezogen auf die gesamten betrachteten oberen 900 µm der Dermis. CD117- und Tryptase-Färbungen ergaben gut vergleichbare Ergebnisse. Bei MPKM zeigten sich insgesamt höhere Anzahlen von Mastzellen als in den Kontrollen. (Boxen: Bereich der 25. - 75. Perzentilen; Whiskers: 1,5 x IQA bzw. Maximum/Minimum, falls diese innerhalb 1,5 x IQA liegen)

**Tabelle 13 Mastzellichte getrennt nach Hautebene, Tryptase-Färbung, Kontrollsubgruppen** Gezeigt ist die mediane Mastzellichte in n/mm<sup>2</sup> der jeweils 300 µm dicken Schichten der Dermis in den unterschiedlichen Subgruppen der Kontrollgruppe. Zusätzlich wurden 25., 75. Perzentilen sowie der IQA angegeben.

	Hautschicht			Urtikaria			Ekzem			Pruritus			OP-Haut			
	Median	25. P.	75. P.	IQA	Median	25. P.	75. P.	IQA	Median	25. P.	75. P.	IQA	Median	25. P.	75. P.	IQA
0-300 µm	27	0	62	62	23	5	41	36	9	0	57	57	47	28	65	37
300-600 µm	22	11	39	28	46	7	63	56	25	23	39	16	45	32	67	35
600-900 µm	20	4	24	20	21	7	35	28	22	5	48	37	41	10	62	52



**Abbildung 7 Mastzellichte in unterschiedlichen Hautschichten** Die Boxplots zeigen die jeweiligen Mastzellichten in den Schichten 0-300 µm (=oben), 300-600 µm (=Mitte), 600-900 µm (=unten). Es ist deutlich erkennbar, dass bei den Mastozytosefällen ein Gefälle von oben nach unten besteht, während dies in den Kontrollen nicht der Fall ist. (Boxen: Bereich der 25. - 75. Perzentilen; Whiskers: 1,5 x IQA bzw. Maximum/Minimum, falls diese innerhalb 1,5 x IQA liegen)

**Tabelle 14 Mastzellendichte getrennt nach Hautebene, CD117-Färbung** Gezeigt ist die mediane Mastzellendichte in n/mm<sup>2</sup> der jeweils 300 µm dicken Schichten der Dermis bei MPKM und Kontrollen. Die Kontrollgruppe wurde aus Gründen der Übersichtlichkeit in dieser Tabelle zusammengefasst. Für die detaillierten Ergebnisse in den Subgruppen der Kontrollgruppe sei auf Tabelle 15 verwiesen. Zusätzlich wurden 25., 75. Perzentilen und der IQA angegeben.

Hautschicht	MPKM				Kontrolle			
	Median	25. P.	75. P.	IQA	Median	25. P.	75. P.	IQA
0-300 µm	247	152	407	255	3	0	44	44
300-600 µm	80	53	128	75	8	0	31	31
600-900 µm	35	14	52	38	1	0	18	18

beurteilt. Auch bei dieser Auswertung wurden die Mastozytome ausgeschlossen, da es sich um tumorartige Zellverbände handelt, und somit die im folgenden genannten Verteilungskriterien niemals auf Mastozytome zutreffend sind. Es wurden die Kategorien „periadnexiell“, „perivasal“, „interstitiell“, „Cluster (3 bis 5 Zellen)“, „Cluster (mehr als 5 Zellen)“ und „disseminierte Verteilung“ jeweils mit „ja“ oder „nein“ beantwortet. Die Tabellen 16 und 17 zeigen die beobachteten Häufigkeiten der unterschiedlichen Verteilungskategorien. Auffallend ist, dass bei MPKM häufiger Mastzellen interstitiell (also auch ohne räumlichen Bezug zu Gefäßen und Adnexen) zu finden sind als bei Kontrollen (96% versus 50%). Diese Beobachtung wird durch die Ergebnisse von Pearson's Chi-Test bestätigt: Es zeigte sich, dass ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen den Kategorien „MPKM/Kontrolle“ und „Mastzellen interstitiell ja/nein“ besteht (Chi-Quadrat (1) = 15,131,  $p < 0,001$ ). Der Zusammenhang war dabei relativ stark (Phi = -0,494) ausgeprägt.

Cluster von  $\geq 3$  Mastzellen traten nur in Einzelfällen bei MPKM auf ( $n = 2$ ), zeigten sich allerdings niemals in der Kontrollgruppe. In einem dieser beiden Fälle traten sowohl kleinere (3-5 MZ) als auch größere ( $> 5$  MZ) Cluster auf. Beispiele für disseminierte, interstitielle bzw. perivasale Mastzellverteilung und Mastzellcluster bei MIS zeigt Abb. 8.

### 3.2.3. Phänotypisierung der Mastzellen

Neben der Mastzellendichte und -verteilung wurden auch histomorphologische und immunhistochemische Merkmale der Mastzellen beurteilt. Hierbei wurde zum einen die Form und Größe evaluiert, zum anderen die Expression bestimmter Oberflächenproteine, die beispielsweise bei SM im Knochenmark schon beschrieben wurden.

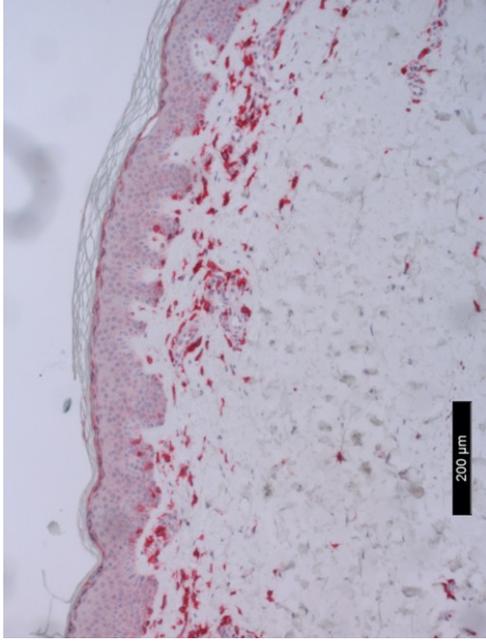
#### Mastzellgröße und -form

Die Größe der einzelnen Mastzellen war in der Kontrollgruppe, in der MPKM-Gruppe und in der Mastozytomgruppe sehr ähnlich. Die mediane Mastzellgröße bei MPKM war 127 µm<sup>2</sup> (IQA = 28) µm<sup>2</sup>, bei den Mastozytomen 110 µm<sup>2</sup> (IQA = 25) und 108 µm<sup>2</sup> (IQA = 35) in

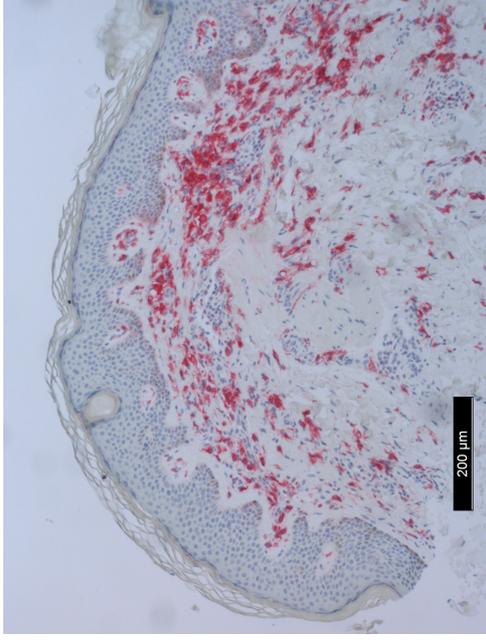
**Tabelle 15 Mastzellichte getrennt nach Hautebene, CD117-Färbung, Kontrollsubgruppen** Gezeigt ist die mediane Mastzellichte in n/mm<sup>2</sup> der jeweils 300 µm dicken Schichten der Dermis in den unterschiedlichen Subgruppen der Kontrollgruppe. Zusätzlich wurden 25., 75. Perzentilen sowie der IQA angegeben.

	<b>Hautschicht</b>			<b>Urtikaria</b>			<b>Ekzem</b>			<b>Pruritus</b>			<b>OP-Haut</b>			
	Median	25. P.	75. P.	IQA	Median	25. P.	75. P.	IQA	Median	25. P.	75. P.	IQA	Median	25. P.	75. P.	IQA
0-300 µm	9	0	50	50	2	0	3	3	0	0	0	56	28	0	52	52
300-600 µm	2	0	31	31	4	0	22	22	0	0	26	26	11	0	37	37
600-900 µm	0	0	5	5	2	0	16	16	0	0	8	8	12	0	20	20

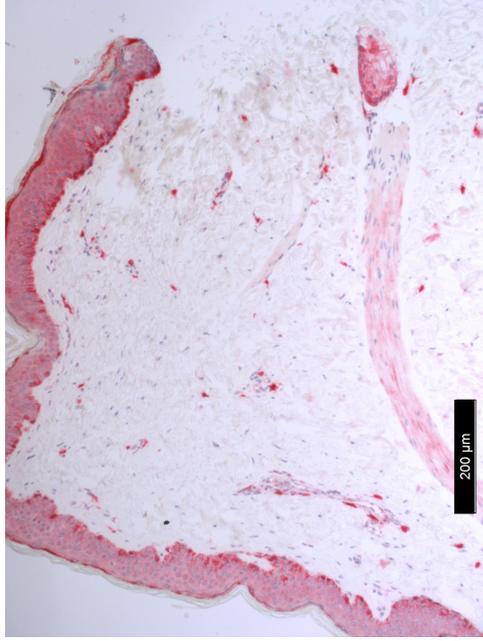
(a) Disseminiertes, interstitielles Verteilungsmuster



(b) Mastzellcluster



(c) Perivaskales Verteilungsmuster



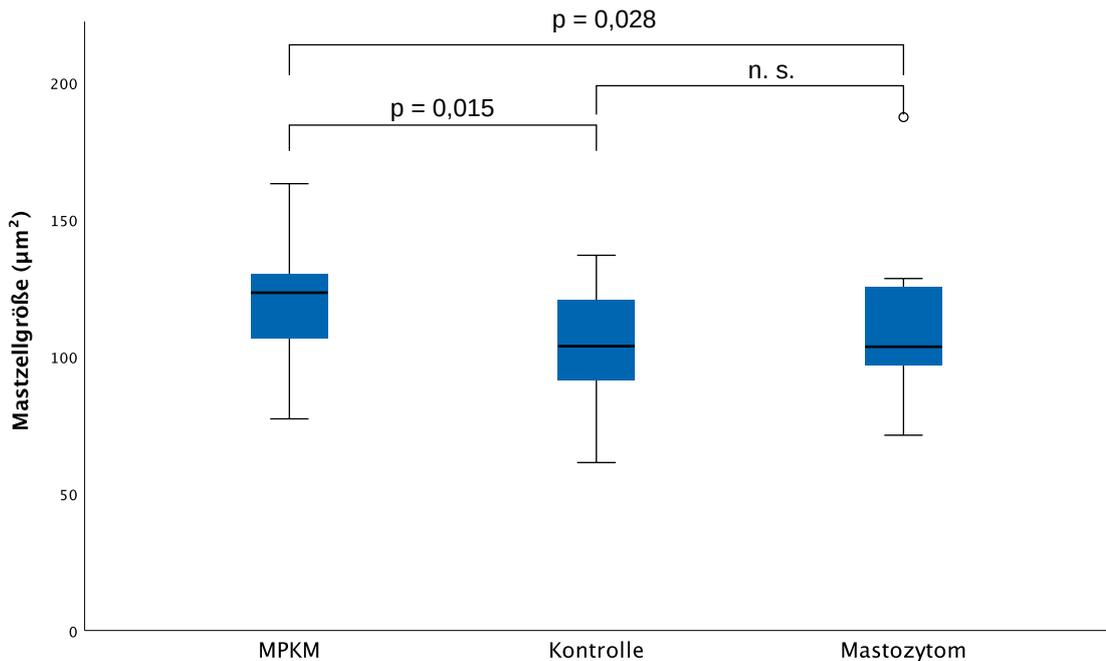
**Abbildung 8 Beispiele für MZ-Verteilungsmuster** Gezeigt sind drei Gewebeschnitte in CD117-Färbung. Im Bild a zeigen sich zahlreiche spindelförmige Mastzellen, die locker in der subepidermalen Dermis verteilt liegen. Dies wird als disseminiertes Verteilungsmuster bezeichnet. Die Mastzellen weisen hier keinen besonderen räumliche Bezug zu Gefäßen und Adnexstrukturen auf und werden daher auch als interstitiell verteilt bezeichnet. Im Bild b zeigen sich neben locker verteilten Mastzellen auch Mastzellcluster, bei denen mehrere Zellen sehr nah aneinander gelagert sind und daher Zellgrenzen schlecht abzugrenzen sind. Dies wird als Mastzellcluster bezeichnet. Die Anzahl der Zellen im Cluster wird anhand der abgebildeten Zellkerne erhoben. Bild c zeigt im Vergleich zu den anderen beiden Fotos weniger Mastzellen, die vorwiegend um die Gefäße angesiedelt sind und somit ein perivaskales Verteilungsmuster zeigen.

**Tabelle 16 Mastzellverteilung** Gezeigt sind die absoluten und relativen Häufigkeiten bestimmter Verteilungsmuster von Mastzellen. Die Auswertung erfolgte anhand der Tryptase-Färbung. Die in Abschnitt 3.2.2 erwähnten Ergebnisse, die sich als charakteristisch für Mastozytose zeigten, sind fett markiert. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde die Kontrollgruppe hier zusammengefasst dargestellt. Für die detaillierten Ergebnisse in den Kontroll-Subgruppen sei auf Tabelle 17 verwiesen.

Kategorie	MPKM		Kontrolle		
		Anzahl	Prozent	Anzahl	Prozent
Periadnexiell	nein	24	92,3%	26	72,2%
	ja	2	7,7%	10	27,8%
Perivasal	nein	3	11,5%	9	25%
	ja	23	88,5%	27	75%
Interstitiell	nein	1	3,8%	18	50%
	ja	<b>25</b>	<b>96,2%</b>	<b>18</b>	<b>50,0%</b>
Cluster 3-5 Zellen	nein	24	92,3%	36	100,0%
	ja	<b>2</b>	<b>7,7%</b>	<b>0</b>	<b>0,0%</b>
Cluster $\geq$ 5 Zellen	nein	25	96,3%	36	100,0%
	ja	<b>1</b>	<b>3,8%</b>	<b>0</b>	<b>0,0%</b>
Disseminiert	nein	1	3,8%	7	19,4%
	ja	25	96,2%	29	80,6%

**Tabelle 17 Mastzellverteilung in den Kontrollsubgruppen** Gezeigt sind die absoluten und relativen Häufigkeiten bestimmter Verteilungsmuster von Mastzellen in den einzelnen Kontrollsubgruppen. Die Auswertung erfolgte anhand der Tryptase-Färbung.

Kategorie	Urtikaria		Ekzem		Pruritus		OP-Haut		
	Anzahl	Prozent	Anzahl	Prozent	Anzahl	Prozent	Anzahl	Prozent	
Periadnexiell	nein	9	90%	7	77,8%	4	57,1%	6	60%
	ja	1	10%	2	22,2%	3	42,9%	4	40%
Perivasal	nein	4	40%	3	33,3%	2	28,6%	0	0%
	ja	6	60%	6	66,7%	5	71,4%	10	100%
Interstitiell	nein	5	50%	5	55,6%	4	57,1	4	40%
	ja	5	50%	4	44,4%	3	42,9%	6	60%
Cluster 3 - 5 Zellen	nein	10	100%	9	100%	7	100%	10	100%
	ja	0	0%	9	0%	0	0%	0	0%
Cluster $\geq$ 5 Zellen	nein	10	100%	9	100%	7	100%	10	100%
	ja	0	0%	9	0%	0	0%	0	0%
Disseminiert	nein	1	10%	3	33,3%	1	14,3%	2	20%
	ja	9	90%	6	66,7%	6	85,7%	8	80%



**Abbildung 9 Mastzellgröße** Gezeigt sind die medianen Mastzellgrößen in  $\mu\text{m}^2$  in den einzelnen Untersuchungsgruppen. (Boxen: Bereich der 25. - 75. Perzentilen; Whiskers: 1,5 x IQA bzw. Maximum/Minimum, falls diese innerhalb 1,5 x IQA liegen); n.s. = nicht signifikant.

der Kontrollgruppe (siehe auch Abbildung 9). Statistisch zeigte sich trotz der in Abbildung 9 sichtbaren, großen Überschneidungsbereiche der Daten ein signifikanter Unterschied in den Mastzellgrößen der Untersuchungsgruppen (Kruskal Wallis: Chi-Quadrat(2) = 7,27,  $p = 0,021$ ). In den paarweisen Vergleichen zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen „MPKM“ und „Kontrolle“ (Mann-Whitney:  $U = 135$ ,  $Z = -2,429$ ,  $p = 0,015$ ) bzw. „MPKM“ und „Mastozytom“ (Mann-Whitney:  $U = 109$ ,  $Z = -2,193$ ,  $p = 0,028$ ). Die Gruppen „Kontrolle“ und „Mastozytom“ zeigten im paarweisen Vergleich keinen signifikanten Unterschied (Mann-Whitney:  $U = 137$ ,  $Z = -0,191$ ,  $p = 0,849$ ). Bei Auftrennung der Kontrollgruppe in ihre Subgruppen zeigten sich dann wiederum aber keine signifikanten Unterschiede zwischen Kontrollen und MPKM bzw. Mastozytomen: Kruskal-Wallis: Chi-Quadrat (5) = 8,388,  $p = 0,136$ . Auch im paarweisen Vergleich zwischen den Kontrollsubgruppen und MPKM bzw. Mastozytomen zeigten sich keine Signifikanzen (Mann-Whitney): Urtikaria vs. MPKM:  $U = 39$ ,  $Z = -1,308$ ,  $p = 0,191$ ; Ekzem vs. MPKM:  $U = 25$ ,  $Z = -0,928$ ,  $p = 0,353$ ; Pruritus vs. MPKM:  $U = 12$ ,  $Z = -1,894$ ,  $P = 0,058$ ; OP-Haut vs. MPKM:  $U = 59$ ,  $Z = -1,722$ ,  $p = 0,085$ ; Mastozytom vs. MPKM:  $U = 57$ ,  $Z = -0,197$ ,  $p = 0,846$ .

Es konnte kein Unterschied in der Form der Mastzellen zwischen Kontrollen und MPKM festgestellt werden. In beiden Gruppen waren die Mastzellen in allen Fällen vorwiegend spindelförmig bzw. sphärisch (abhängig von der Schnittebene). Bei den Mastozytomen zeigten sich dicht gepackte, teils kuboide Mastzellen (i.S. eines gutartigen Tumors).

## **Oberflächenmarker CD2, CD25, CD45, CD30, CD68**

CD30-, CD45- und CD68-Färbungen wurden nur in der Pilotphase der Studie bei der Auswahl passender immunhistochemischer Färbungen verwendet. CD30 zeigte sich auf allen gefärbten Schnitten (Mastozytose n = 7, Kontrolle n = 5) negativ und wurde daher nicht in das Färbe-Protokoll der Studie aufgenommen. CD45 als Pan-Leukozyten-Marker zeigte in den gefärbten Schnitten (Mastozytose n = 4, Kontrolle n = 8) teils zahlreiche positive Zellen. Die Differenzierung war nur sehr eingeschränkt möglich, sodass die CD45-Färbung im Verlauf der Studie nicht weiterverfolgt wurde. Spindelförmige Zellen (als morphologisches Korrelat für Mastzellen), die eine im Vergleich zu den umliegenden CD45-positiven Zellen intensivere Färbungen aufweisen, konnten weder bei Kontrollen, noch bei Mastozytose identifiziert werden. In der CD68-Färbung (Mastozytose n = 7, Kontrolle n = 10) wurde in zwei Mastozytose-Fällen eine vollständige Positivität und in vier Fällen eine partielle Positivität der Mastzellen nachgewiesen. In den Kontrollfällen zeigten sich keine CD68 positiven Mastzellen. Für die Auswertung der CD68-Färbung siehe auch Abschnitt 3.2.4.

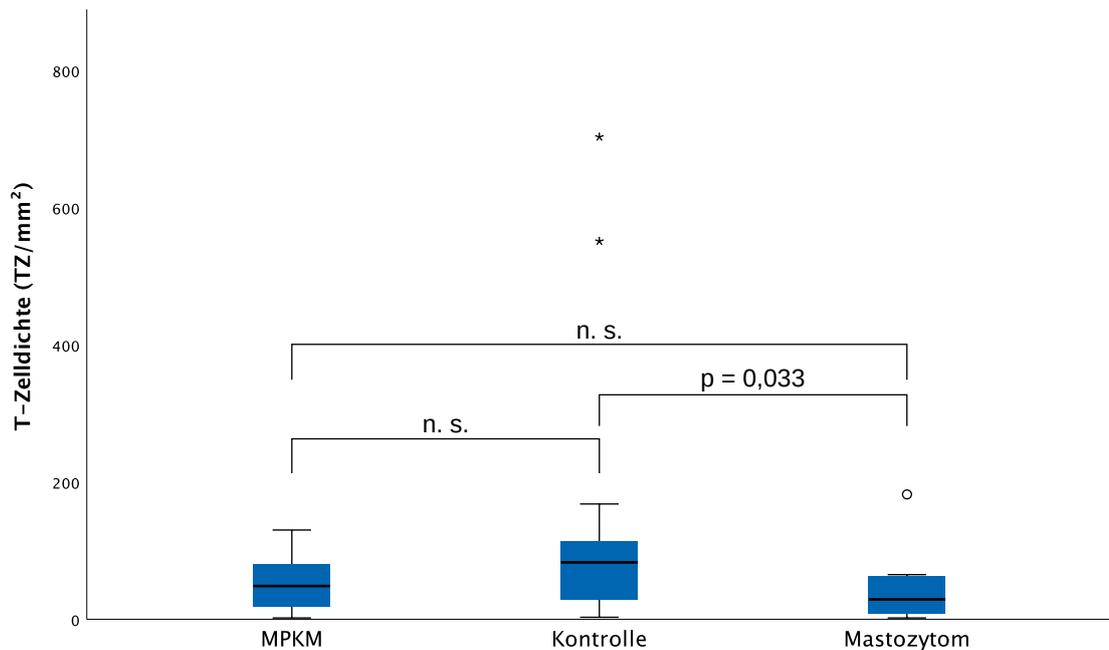
In der CD2- und CD25-Färbung zeigten sich die Mastzellen aller MPKM-Fälle negativ (n = 26). Bei den Mastozytomen konnten je zwei Fälle mit partieller CD2- und CD25-Positivität der Mastzellen detektiert werden. Einer der beiden Fälle ist als Beispiel in Abbildung 12 zu sehen. Da CD2 und CD25 auch von aktivierten Lymphozyten exprimiert werden, zeigten sich in 61,5% (n = 16) bzw. 11,5% (n = 3) der MPKM-Fälle CD2-positiv bzw. CD25-positiv lymphozytäre Zellen. Ein Beispiel für einen MPKM-Fall mit einigen CD2-positiven Lymphozyten wird in Abbildung 11 gezeigt. Lymphozytäre Zellen lassen sich morphologisch aufgrund ihrer deutlichen geringeren Größe und kreisrunden Form gut von Mastzellen unterscheiden. Bei den Mastozytomen waren in 53,3% (n = 8) CD2-positiv und in 20,0% (n = 3) CD25-positiv Lymphozyten zu sehen.

### **3.2.4. Begleitinfiltat**

Zur Charakterisierung des Infiltrats bei Mastozytose wurden im Rahmen dieser Studie zahlreiche weitere immunhistochemische Färbungen zur Detektion unterschiedlicher Immunzellen in der Haut durchgeführt (siehe auch Tabelle 4) Im Folgenden werden die Ergebnisse aufgetrennt nach Zelltyp beschrieben.

### **T-Lymphozyten**

Zu Beginn der Studie wurden die Marker CD3, CD4 und CD8 zur Darstellung von T-Lymphozyten verwendet. CD4 und CD8 wurden bei neun Mastozytose-Fällen verwendet, um ein möglicherweise vorhandenes T-Zellinfiltrat genauer zu charakterisieren. In acht dieser Fälle zeigten sich CD4- und/oder CD8-positiv Lymphozyten. Davon zeigten sich in vier Fällen ausschließlich CD4-positiv, in vier Fällen CD4- und CD8-positiv und in einem Fall keine Lymphozyten. Die CD8-positiven Lymphozyten waren in allen Fällen weniger zahlreich als die CD4-positiven Lymphozyten (CD4/CD8 Ratios 3,8 - 32,8). Insgesamt zeigte sich somit in dieser kleinen Testgruppe ein CD4-dominiertes T-Zellinfiltrat. Im Verlauf der Studie wurde nur noch CD3



**Abbildung 10 T-Zelldichte** Gezeigt sind die medianen T-Zelldichten (Zellen/mm<sup>2</sup>) in den einzelnen Untersuchungsgruppen (CD3-Färbung). (Boxen: Bereich der 25. - 75. Perzentilen; Whiskers: 1,5 x IQA bzw. Maximum/Minimum)

als Pan-T-Zell-Marker verwendet. In den Abbildungen 11 und 12 finden sich (neben anderen Färbungen) jeweils auch ein Beispiel für einen Fall von MPKM bzw. ein Mastozytom in der CD3-Färbung. Die Auswertung der CD3-Färbung ergab, dass in 76,9% (n = 20) der MPKM-Fälle T-Lymphozyten nachweisbar waren. In der Kontrollgruppe war dies bei 69,4% (n=25) der Fall. Auch bei den Mastozytomen fanden sich in 46,7% (n = 7) CD3-positive lymphozytäre Zellen. Im direkten Vergleich derjenigen Fälle, in denen ein T-Zellinfiltrat nachweisbar war (n = 52), zeigten sich zwischen Kontrollgruppe und MPKM-Gruppe durchaus größere Überlappungsbereiche: Die mediane T-Zelldichte bei MPKM lag bei 48 Zellen/mm<sup>2</sup> (IQA = 61) und bei Kontrollfällen 83 Zellen/mm<sup>2</sup> (IQA = 85). Bei den Mastozytomen lag die T-Zelldichte etwas niedriger bei Median = 29 Zellen/mm<sup>2</sup> (IQA = 58). In der statistischen Analyse zeigte sich bei Betrachtung der zusammengefassten Kontrollgruppe im Vergleich zu MPKM und Mastozytomen kein signifikanter Unterschied: Kruskal-Wallis: Chi-Quadrat (2) = 5,271, p = 0,072. Bei Betrachtung der nach Subgruppen aufgeteilten Kontrollgruppe zeigte sich hingegen eine knappe Signifikanz: Kruskal-Wallis: Chi-Quadrat (5) = 12,722, p = 0,026. Beim paarweisen Vergleich zwischen den Untersuchungsgruppen zeigte sich bei zusammengefasster Kontrollgruppe lediglich eine knappe Signifikanz zwischen Kontrollgruppe und Mastozytomen (Mann-Whitney: U = 169, Z = -2,135, p = 0,033). Bei aufgeteilter Kontrollgruppe zeigten sich in den paarweisen Vergleichen nur signifikante Unterschiede zwischen Ekzem (Median 104 Zellen/mm<sup>2</sup>, IQA = 30) und Mastozytom (Median 0 Zellen/mm<sup>2</sup>, IQA = 29) (Mann-Whitney-U: U = 16 Z = -3,129, p = 0,002) bzw. Ekzem und MPKM (Median 28 Zellen/mm<sup>2</sup>, IQA = 57) (Mann-Whitney-U: U = 51,5 Z = -2,479, p = 0,013). Siehe hierzu auch Abbildung 10.

Ähnlich wie in Kapitel 3.2.2 für die Mastzellen beschrieben, wurde auch die Verteilung der T-Zellen in den Hautproben untersucht. Hierfür wurden die gleichen Kategorien wie für die Auswertung der Mastzellverteilung verwendet, mit Ausnahme der Kategorie „Cluster (3 bis

**Tabelle 18 T-Zellverteilung** Gezeigt sind die absoluten und relativen Häufigkeiten bestimmter Verteilungsmuster von T-Zellen. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde die Kontrollgruppe in dieser Darstellung zusammengefasst. Für die detaillierten Ergebnisse in den Kontroll-Subgruppen sei auf Tabelle 19 verwiesen. Die Auswertung erfolgte anhand der CD3 Färbung.

Kategorie		MPKM		Kontrolle		Mastozytom	
		Anzahl	Prozent	Anzahl	Prozent	Anzahl	Prozent
Periadnexiell	nein	24	92,3%	31	86,1%	14	93,3%
	ja	2	7,7%	5	13,9%	1	6,7%
Perivasal	nein	8	30,8%	11	30,6%	13	86,7%
	ja	18	69,2%	25	69,4%	2	13,3%
Interstitiell	nein	12	46,2%	19	52,8%	9	60,0%
	ja	14	53,8%	17	47,2%	6	40,0%
Cluster $\geq$ 5 Zellen	nein	8	30,8%	11	30,6%	13	86,7%
	ja	18	69,2%	25	69,4%	2	13,3%
Disseminiert	nein	14	53,8%	19	52,8%	9	60,0%
	ja	12	46,2%	17	47,2%	6	40,0%

5 Zellen)“. Bei den T-Zellen wurden erst Cluster ab 5 Zellen gezählt, da kleinere T-Zell-Anhäufungen praktisch immer zu finden sind, wenn ein T-zellreiches Infiltrat vorliegt. Die absoluten und relativen Häufigkeiten der unterschiedlichen Verteilungsmuster sind in den Tabellen 18 und 19 aufgelistet. Es zeigten sich insgesamt keine relevanten Unterschiede in der T-Zellverteilung zwischen Kontrollen und Mastozytose-Patient\*innen.

### B-Lymphozyten

Zur Detektion von B-Lymphozyten wurden in der Konzeptionsphase der Studie in einer kleineren Testgruppe die CD79a- und CD20-Färbung verwendet. In beiden Färbungen zeigten sich sowohl bei Kontrollen (CD20 n = 8; CD 79a n = 10), als auch bei den Mastozytosefällen (CD20 n = 4, CD79a n = 4) keine positiven Färbeergebnisse. Lediglich in einem Kontrollfall zeigte sich eine einzelne CD79a-positive Zelle. Aus diesem Grund wurde im weiteren Verlauf der Studie auf diese Färbungen verzichtet.

**Tabelle 19 T-Zellverteilung in den Kontrollsubgruppen** Gezeigt sind die absoluten und relativen Häufigkeiten bestimmter Verteilungsmuster von T-Zellen in den einzelnen Kontrollsubgruppen. Die Auswertung erfolgte anhand der CD3 Färbung.

Kategorie	Urtikaria		Ekzem		Pruritus		OP-Haut	
	Anzahl	Prozent	Anzahl	Prozent	Anzahl	Prozent	Anzahl	Prozent
Periadnexiell	nein	80%	8	88,9%	7	100%	8	80%
	ja	20%	1	11,1%	0	0%	2	20%
Perivasal	nein	40%	0	0%	4	57,1%	3	30%
	ja	60%	9	100%	3	42,9%	7	70%
Interstitiell	nein	50%	1	11,1%	5	71,4	8	80%
	ja	50%	8	88,9%	2	28,6%	2	20%
Cluster $\geq$ 5 Zellen	nein	40%	0	0%	4	57,1%	3	30%
	ja	60%	9	100%	3	42,9%	7	70%
Disseminiert	nein	40%	2	22,2%	5	71,4%	8	80%
	ja	60%	7	77,8%	2	28,6%	2	20%

**Tabelle 20 Pigmentierungsgrad** Gezeigt sind die absoluten und relativen Häufigkeiten der einzelnen Pigmentierungsgrade in den Untersuchungsgruppen. Die Auswertung erfolgte semiquantitativ anhand dreier Referenzslides in der Tryptase-Färbung (siehe Abschnitt 2.4.1).

Gruppe	schwach		mittel		stark	
	Anzahl	Prozent	Anzahl	Prozent	Anzahl	Prozent
MPKM	8	30,8%	14	53,8%	4	15,4%
Kontrolle	31	86,1%	5	13,9%	0	0,0%
Mastozytom	9	64,3%	5	35,7%	0	0,0%

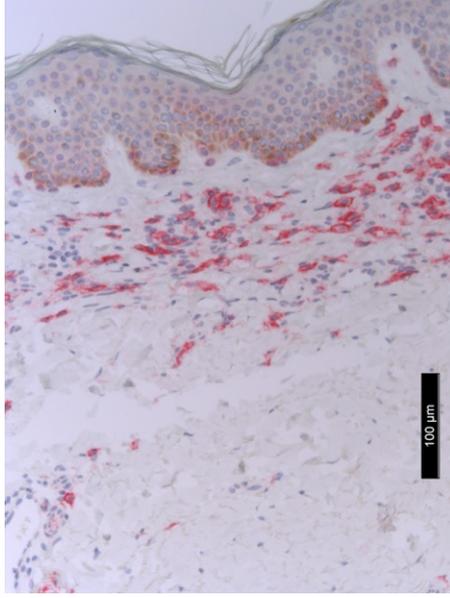
### Makrophagen, Langerhanszellen, dendritische Zellen

Zur Detektion von Makrophagen, Langerhanszellen und dendritischen Zellen wurden in der Konzeptionsphase der Studie bei einer kleineren Testgruppe die CD14 und CD68-Färbung verwendet. In der CD14-Färbung (Mastozytose n = 10; Kontrolle n = 9), die insbesondere zur Identifikation von dendritischen Zellen und Langerhanszellen ausgewählt wurde, zeigten sich nur in wenigen Schnitten positive Zellen: Bei zwei Kontrollen zeigten sich jeweils drei bzw. acht positive Zellen. In zwei Mastozytose-Fällen zeigten sich jeweils drei bzw. 26 positive Zellen. Da sich somit kein relevantes CD14-positives Begleitinfiltrat zeigte, wurde die Färbung im Folgenden nicht mehr verwendet. In der CD68-Färbung (Mastozytose n = 7; Kontrolle n = 10) zeigten sich keine morphologisch der Gruppe der Makrophagen zuordenbare Zellen. Wie in Kapitel 3.2.3 beschrieben ist, zeigten sich aber teils CD68-positive Mastzellen.

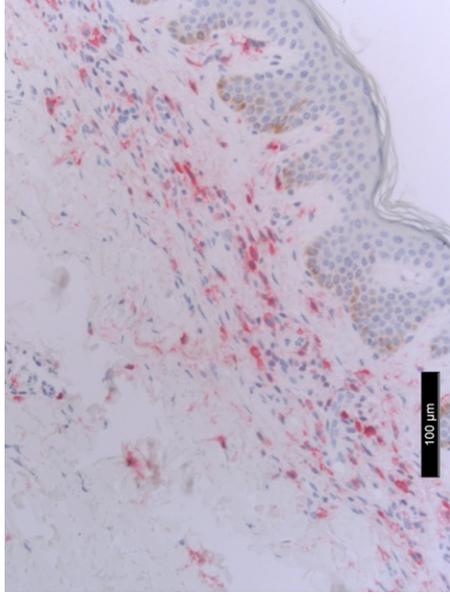
### 3.2.5. Basale Pigmentierung

Die basale Pigmentierung der Epidermis wurde semiquantitativ anhand der Tryptase-gefärbten Schnitte ausgewertet. Unterschieden wurden die Kategorien „schwach“, „mittel“ und „stark“ (siehe hierzu auch Abbildung 4). Die absoluten und relativen Häufigkeiten der einzelnen Pigmentierungsgrade in den Untersuchungsgruppen zeigt Tabelle 20. Insgesamt zeigte sich ein signifikanter Unterschied in der Verteilung der Pigmentierungsgrade zwischen den Untersuchungsgruppen (Kruskal-Wallis: Chi-Quadrat (2) = 21,121,  $p < 0,001$ ). In der graphischen Darstellung der Daten (Abbildung 13) fällt auf, dass bei MPKM der Pigmentierungsgrad insgesamt stärker ist, als in der Kontrollgruppe. Dies zeigte sich auch im paarweisen Vergleich statistisch signifikant (Mann-Whitney:  $U = 199$ ,  $Z = -4,515$ ,  $p < 0,001$ ). Bei den Mastozytomen ist die Pigmentierung ebenfalls signifikant weniger stark als bei den anderen Mastozytosefällen (Mann-Whitney:  $U = 111$ ,  $Z = -2,229$ ,  $p = 0,045$ ), allerdings zeigte sich etwas häufiger als in der Kontrollgruppe eine mittlere Pigmentierung (35,7% versus 13,9%). Mastozytome und Kontrollfälle unterschieden sich hingegen nicht signifikant voneinander (Mann-Whitney:  $U = 197$ ,  $Z = -1,715$ ,  $p = 0,086$ ).

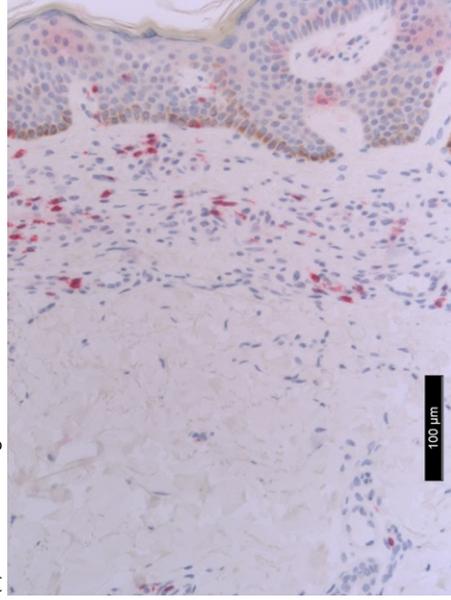
(a) CD117-Färbung



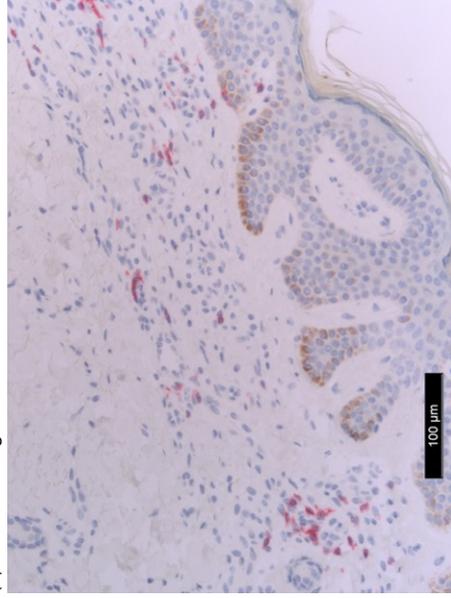
(b) Tryptase-Färbung



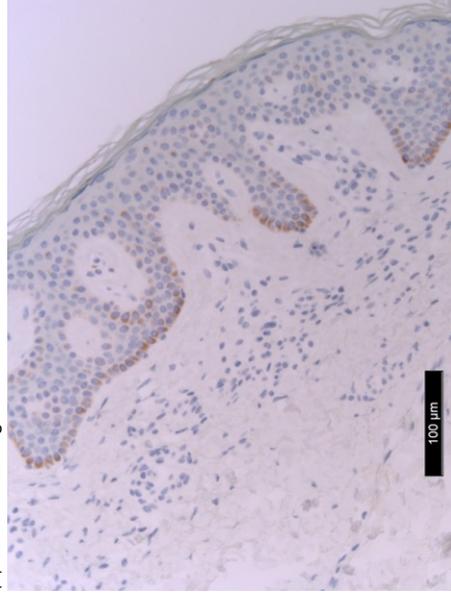
(c) CD3-Färbung



(d) CD2-Färbung

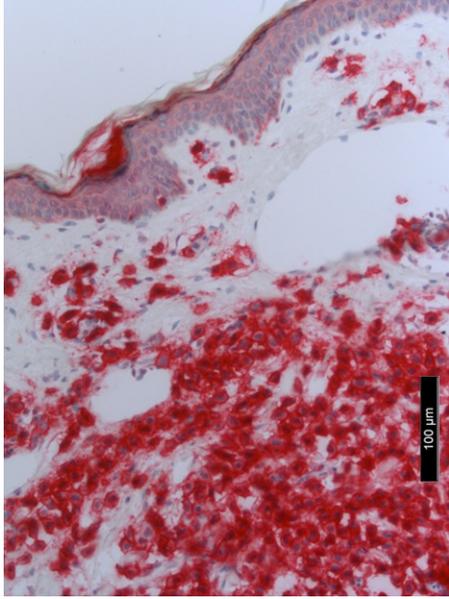


(e) CD25-Färbung

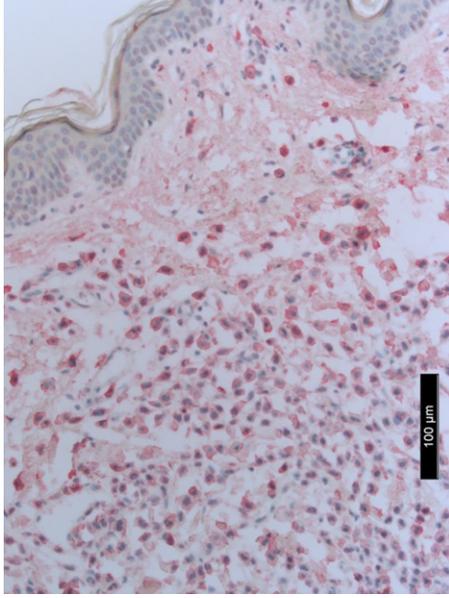


**Abbildung 11 Fallbeispiel eines typischen histopathologischen Befundes bei MPKM.** Gezeigt sind die in dieser Studie standardmäßig durchgeführten immunohistochemischen Färbungen für CD117, Tryptase, CD3, CD2 und CD25 bei einem sowohl klinisch als auch histopathologisch typischen Fall von MPKM. Die Mastzellen zeigten sich negativ für CD2 und CD25. In Bild d zeigen sich einige CD2 positive Lymphozyten.

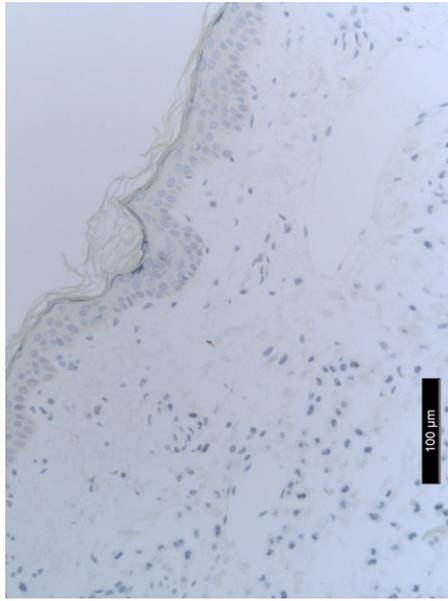
(a) CD117-Färbung



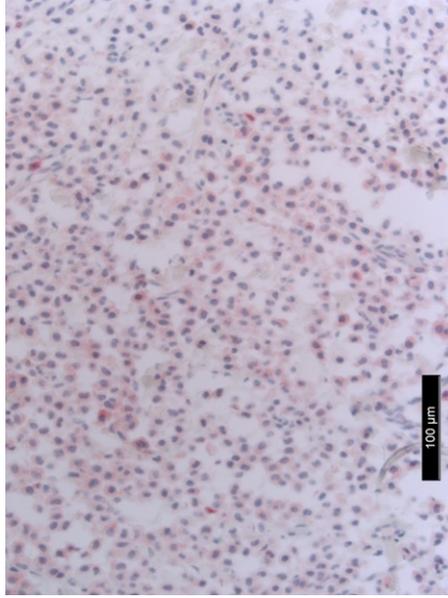
(b) Tryptase-Färbung



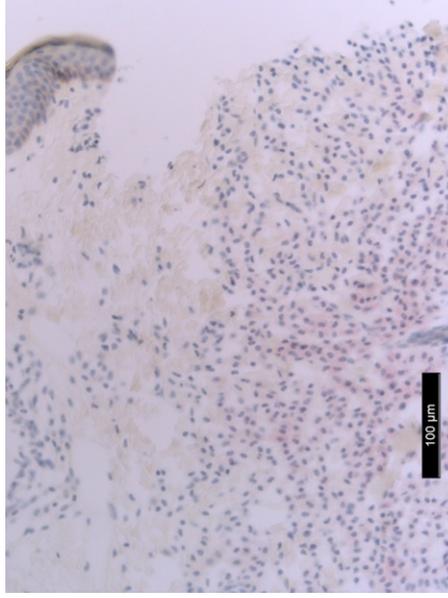
(c) CD3-Färbung



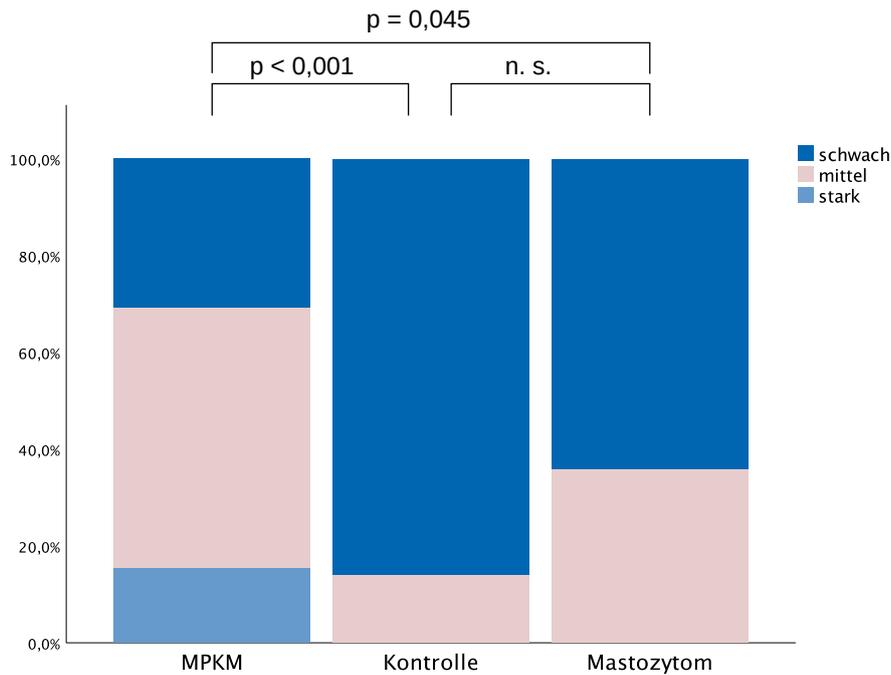
(d) CD2-Färbung



(e) CD25-Färbung



**Abbildung 12** Fallbeispiel eines typischen histopathologischen Befundes bei einem Mastozytom. Gezeigt sind die in dieser Studie standardmäßig durchgeführten immunhistochemischen Färbungen für CD117, Tryptase, CD3, CD2 und CD25. Mastzellen zeigten sich partiell schwach positiv für CD2 und CD25. Lymphozyten finden sich nur ganz vereinzelt (siehe Bild c.)



**Abbildung 13 Basale Pigmentierung der Epidermis** Gezeigt sind die prozentualen Anteile der jeweiligen Pigmentierungsstufen der basalen Epidermis in den einzelnen Untersuchungsgruppen (Tryptase-Färbung).

### 3.3. KIT D816V Mutation

Die KIT D816V Mutationsanalyse erfolgte aus dem paraffinisierten Hautgewebe, welches auch für die histologische Begutachtung verwendet wurde und wurde durch die Arbeitsgruppe von Thomas Kristensen in Odense, Dänemark durchgeführt. Es zeigte sich, dass in 84,6% (n = 22) der Proben aus der MPKM-Gruppe die KIT D816V Mutation nachweisbar war. Bei den restlichen vier Fällen war die Probenqualität nicht ausreichend, um eine Aussage über den Mutationsstatus zu treffen. In der Kontrollgruppe zeigte sich in keinem Fall eine KIT D816V Mutation. In 63,9% (n = 23) der Kontrollfälle war die Probenqualität zur abschließenden Beurteilung als negativ ausreichend, in 13 Fällen konnte keine Aussage getroffen werden. Bei den Mastozytomen zeigte sich bei 13 Proben eine nicht ausreichende Probenqualität, sodass nur zwei von 15 Proben abschließend beurteilbar waren. Von diesen beiden Proben zeigte sich je eine positiv bzw. negativ für die KIT D816V Mutation.

### 3.4. Vorschlag eines diagnostischen Algorithmus

#### 3.4.1. Entwicklung

Zur Identifikation wichtiger Unterscheidungsmerkmale zwischen Kontrollen und Mastozytose (MPKM) wurden Random Forest Modelle erstellt. Dabei wurde in einem Modell neben denjenigen dermatohistologischen Kriterien, die bei allen Fällen bestimmt wurden, auch der KITD816V-Mutationsstatus als Vergleichsparameter mit eingeschlossen. In einem anderen Modell wurden die gleichen Kriterien ohne den Mutationsstatus eingespeist. Beide Modelle

schließen auch die möglichen Confounder Alter und Geschlecht ein. Aus den in Abschnitt 2.6.2 beschriebenen methodischen Gründen wurde die MZ-Größe nicht eingeschlossen. Die detaillierten Ergebnisse sind in den Abbildungen 15 und 16 aufgeführt. Die Mastzellendichte (vor allem in den oberen 300 µm der Dermis) zeigte sich entsprechend dieser Ergebnisse als besonders wichtiges histologisches Kriterium. Da sich aus unserem Datensatz die Messergebnisse für die CD117-Färbung besser zur Unterscheidung zwischen Mastozytose- und Kontrollfällen herausstellten, als die Werte der Tryptasefärbung, verwendeten wir im Folgenden die CD117-Ergebnisse zur Entwicklung von Cut-off-Werten für die Mastzellendichte. Wir berechneten dabei drei Grenzwerte, die in dem uns vorliegenden Datensatz jeweils entweder für Sensitivität, Spezifität oder die beste Balance zwischen Sensitivität und Spezifität optimiert sind (=GINI-optimiert).

Cut-off-Werte für die Mastzellendichte in den oberen 300 µm der Dermis (CD117-Färbung):

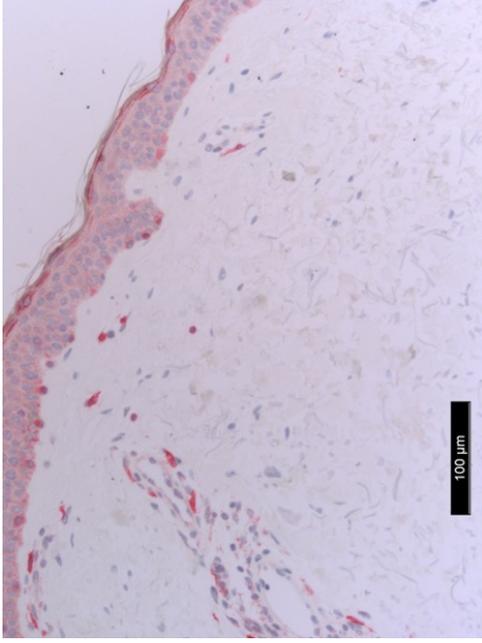
- > 95% Sensitivität (tatsächliche Sensitivität 96,2%, Spezifität 75,0%):  $\geq 38$  Mastzellen/mm<sup>2</sup>; entspricht circa 8 MZ/high power field (HPF) bei Sehfeldzahl (SFZ) 20,
- balanciert (Sensitivität 92,3%, Spezifität 91,7%):  $\geq 62$  Mastzellen/mm<sup>2</sup>; entspricht circa 12 MZ/HPF bei SFZ 20,
- > 95% Spezifität (tatsächliche Spezifität 97,2%, Sensitivität 76,9%):  $\geq 140$  Mastzellen/mm<sup>2</sup>; entspricht circa 27 MZ/HPF bei SFZ 20.

Zur Veranschaulichung der oben genannten Grenzwerte zeigt Abbildung 14 Beispielfotos in der CD117-Färbung, die die jeweiligen Cut-off-Werte für die MZ-Dichte repräsentieren.

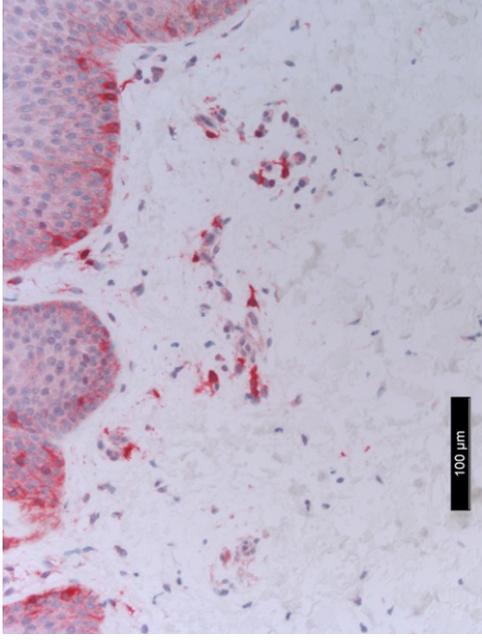
Neben den unterschiedlichen Messwerten für die Mastzellendichte rangierten der Grad der Pigmentierung, das Vorkommen interstitieller Mastzellen und MZ-Cluster auf den höheren Plätzen im Random Forest Modell. Aus diesem Grund wurden diese drei Kriterien bei der Entwicklung unseres diagnostischen Algorithmus ebenfalls berücksichtigt.

In Anknüpfung an die Ergebnisse des Random Forest Modells wählten wir die (unabhängigen) Variablen „Mastzellendichte der oberen 300 µm (CD117)“, „Pigmentierung“, „Interstitielles Vorkommen von Mastzellen“ und „Mastzell-Cluster“ aus, um eine logistische Regression durchzuführen. Die abhängige Variable des Modells war dabei die Diagnosezuordnung (MPKM ja/nein). Hierfür verwendeten wir den für Sensitivität und Spezifität balancierten Cut-off Wert von  $\geq 62$  Mastzellen/mm<sup>2</sup>. Die Variable „Pigmentierung“ wurde in die binären Kategorien „Pigmentierung mittel oder stark“ bzw. „Pigmentierung schwach“ aufgeteilt. Diese Aufteilung ist zur Umkodierung der ordinalen Variable in eine Dummy-Variable notwendig, um sie in das Regressionsmodell zu integrieren. Zudem wurde Alter und Geschlecht in das Modell eingeschlossen, um für diese Faktoren zu kontrollieren. Das Regressions-Modell zeigte sich als Ganzes signifikant (Chi-Quadrat (6) = 71,978,  $p < 0,001$ ,  $n = 62$ ). Von den einzelnen unabhängigen Variablen zeigte sich allerdings nur der Regressionskoeffizient der CD117-Dichte oben

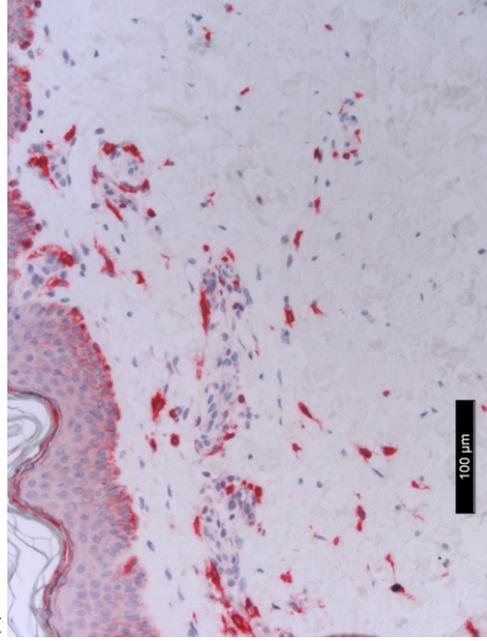
(a) MZ-Dichte von circa 38 MZ/mm<sup>2</sup>



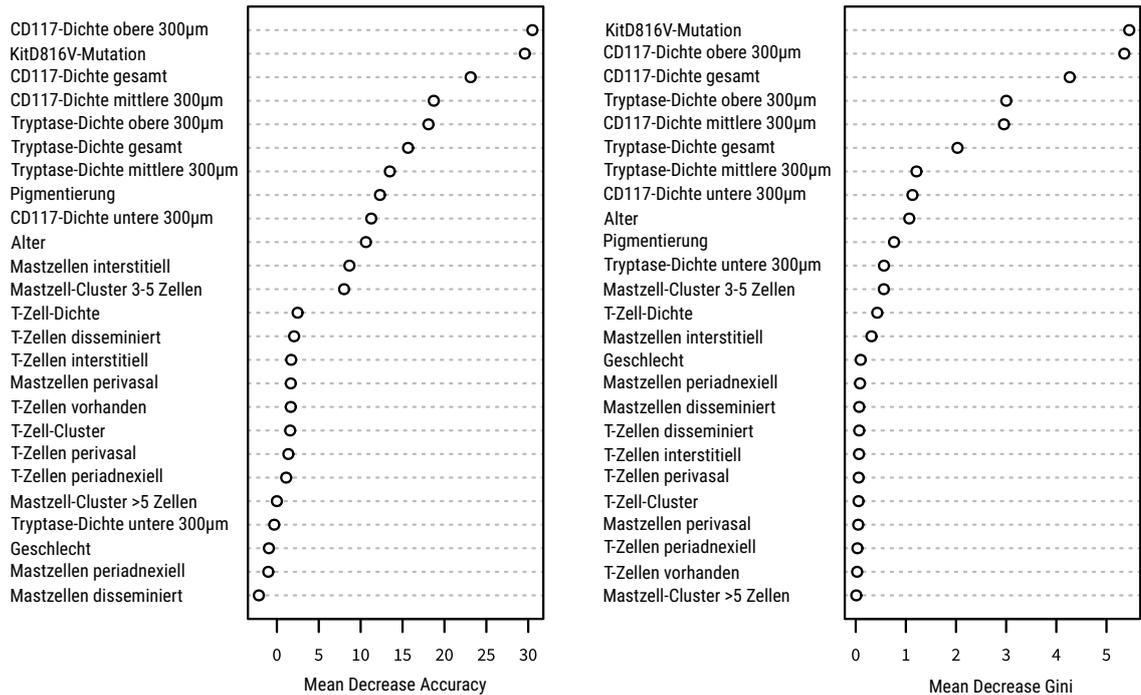
(b) MZ-Dichte von circa 62 MZ/mm<sup>2</sup>



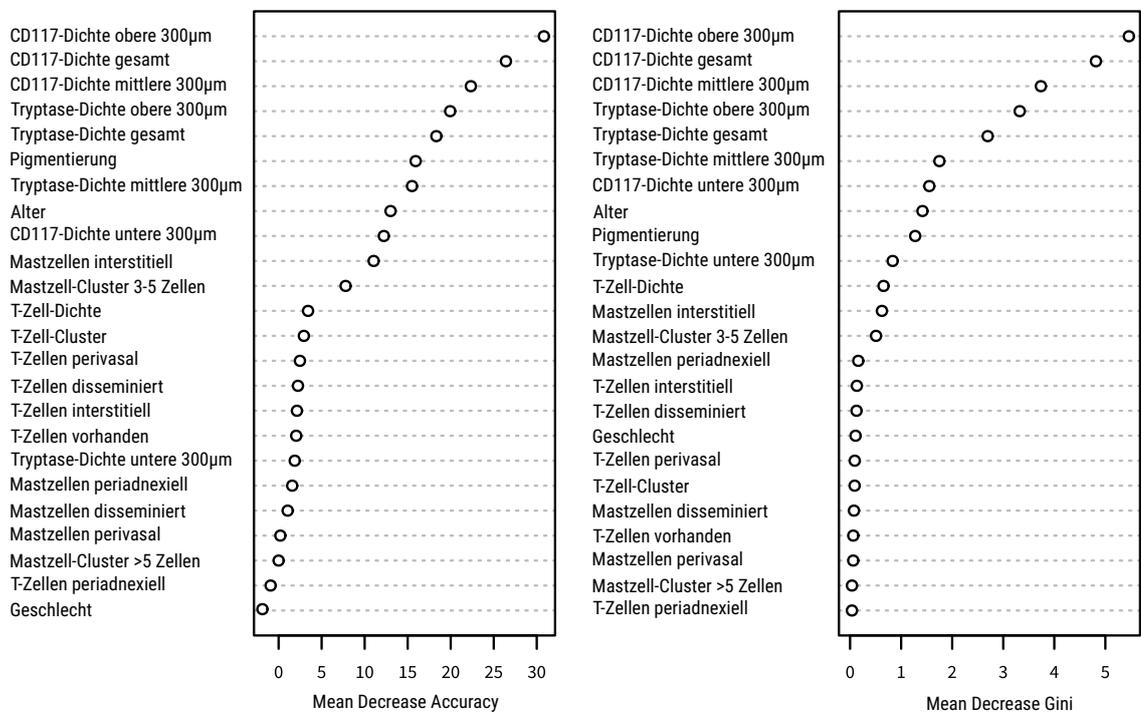
(c) MZ-Dichte von circa 140 MZ/mm<sup>2</sup>



**Abbildung 14 Beispiele für verschiedene Mastzellichten** Gezeigt sind drei Gewebeschnitte in CD117-Färbung, die jeweils unterschiedliche MZ-Dichten repräsentieren. Bild a veranschaulicht den für die Diagnose MIS zu 96% sensitiven Cut-off-Wert von 38 MZ/mm<sup>2</sup>, während Bild b den mittleren Grenzwert von 62 MZ/mm<sup>2</sup> und Bild c den höchsten Cut-off mit 140 MZ/mm<sup>2</sup> zeigen



**Abbildung 15 Graphische Darstellung der Ergebnisse aus dem Random Forest Modell mit KIT D816V-Mutationsstatus als Vergleichsparameter** Dargestellt sind die jeweils hierarchisch angeordneten Werte für Mean Decrease Accuracy = „globale Wichtigkeit“ und Mean Decrease GINI = „Reinheit der Trennung“ der einzelnen Kriterien. Es wurden alle Kriterien in das Modell eingespeist, die für alle Kontroll- und MPKM-Fälle erhoben wurden. Kriterien, die beispielweise nur bei den Mastozytosefällen erhoben wurden (z.B. CD2/CD25-Positivität) sind entsprechend nicht eingefloßen. In diesem Modell wurde auch der KIT D816V Mutationsstatus als Vergleichsparameter für die dermatohistologischen Parameter mit eingeschlossen. In Abbildung 16 sind die Ergebnisse des Modells ohne KIT-Mutationsdaten gezeigt.



**Abbildung 16 Graphische Darstellung der Ergebnisse aus dem Random Forest Modell (ohne KIT D816V Mutationsstatus)** Dargestellt sind die jeweils hierarchisch angeordneten Werte für Mean Decrease Accuracy = „globale Wichtigkeit“ und Mean Decrease GINI = „Reinheit der Trennung“ der einzelnen Kriterien. Es wurden alle Kriterien in das Modell eingespeist, die für alle Kontroll- und MPKM-Fälle erhoben wurden. Kriterien, die beispielweise nur bei den Mastozytosefällen erhoben wurden (z.B. CD2/CD25-Positivität) sind entsprechend nicht eingefloßen.

( $r = 7,960$ ,  $p = 0,031$ ,  $OR = 2863$ ) als signifikant. Betrachtet man nun Regressionsmodelle, die ebenfalls für Alter und Geschlecht kontrolliert sind, aber jeweils nur eine der vier oben genannten unabhängigen Variablen enthalten, zeigen sich für CD117 Dichte, Pigmentierung und interstitielle MZ signifikante Regressionskoeffizienten. Das Kriterium der Cluster zeigte sich (vermutlich aufgrund der Seltenheit) als nicht signifikant.

- Regressionsmodell „Alter, Geschlecht, CD117-Dichte oben“: Chi-Quadrat (3) = 60,180,  $p < 0,001$ ; Regressionskoeffizient CD117-Dichte oben = 7,133;  $p = 0,001$ ,  $OR = 1253,121$
- Regressionsmodell „Alter, Geschlecht, Pigmentierung mittel oder stark“: Chi-Quadrat (3) = 25,165,  $p < 0,001$ ; Regressionskoeffizient Pigmentierung mittel oder stark = 2,537;  $p < 0,001$ ,  $OR = 12,643$ ,
- Regressionsmodell „Alter, Geschlecht, Mastzellen interstitiell“: Chi-Quadrat (3) = 29,058,  $p < 0,001$ ; Regressionskoeffizient Mastzellen interstitiell = 3,918;  $p = 0,001$ ,  $OR = 50,317$ ,
- Regressionsmodell „Alter, Geschlecht, MZ Cluster > 3“: Chi-Quadrat (3) = 11,949,  $p = 0,008$ ; Regressionskoeffizient MZ Cluster = 21,071;  $p = 0,999$ ,  $OR = 1,415^9$ .

### 3.4.2. Empfohlener Algorithmus

Anhand der Ergebnisse dieser Arbeit, der bereits vorhandenen Literatur (Valent, Akin, Escribano u. a. 2007) und der klinischen Erfahrung aus der Mastozytose-Sprechstunde an der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie am Biederstein (München), entwickelten wir den in Abbildung 17 gezeigten Workflow, der die Diagnostik von Mastozytose der Haut erleichtern soll. In der ersten Stufe soll die Notwendigkeit einer Hautprobe für die Diagnostik festgelegt werden. Falls bereits ein ausreichend eindeutiger klinischer Befund vorliegt, muss nicht zwingend eine Hautprobe entnommen werden. In der zweiten Stufe erfolgt die histopathologische Beurteilung. Die in den vorangehenden Abschnitten beschriebenen Unterscheidungskriterien zwischen Mastozytose und anderen Hauterkrankungen, die mit Mastzellhyperplasie einhergehen können, bilden die Grundlage dieser Stufe (vgl. auch Abschnitt 3.4.1). Das Kriterium der MZ-Cluster zeigte sich als einziges der nach der Random Forest Analyse ausgewählten Kriterien nicht signifikant im Regressionsmodell. Da MZ-Cluster außerdem nur in zwei MPKM-Fällen vorkamen, die auch bereits durch die anderen Kriterien (MZ-Dichte, Pigmentierung und interstitielle MZ) eindeutig zugeordnet werden konnten, scheint dieses Kriterium zwar sehr spezifisch, praktisch aber eher von untergeordneter Wichtigkeit zu sein. Aus diesen beiden Gründen wurde es mit dem Kriterium der interstitiellen MZ zusammengefasst.

In Stufe drei soll in weiterhin dermatohistologisch nicht klar zuordenbaren Fällen eine Untersuchung des KIT-Mutationsstatus durchgeführt werden. Sollte auch dies keine Klarheit schaffen, verbleiben in Stufe 4 noch die Möglichkeiten der Reevaluation z.B. durch erneute Probenentnahme bzw. Knochenmarksuntersuchung (insb. bei Erwachsenen). Der vorgeschlagene Workflow wurde auf Plausibilität geprüft, indem für alle in die Studie eingeschlossenen Fälle mit Ausnahme der Mastozytome und der Fälle mit unklarer Diagnose der entsprechende Punktwert in Stufe 2 ermittelt wurde. Anschließend wurde überprüft, ob sich daraus Fehlzuordnungen ergeben. Es zeigte sich, dass 24 der 26 (= 92,3%) sicher als Mastozytose

klassifizierten Fälle durch den Algorithmus histologisch eindeutig zugeordnet werden. Die übrigen zwei Fälle erreichten jeweils einen Punkt und werden damit in die nächste Stufe weitergeleitet. Beide Fälle zeigten auch in der KIT D816V-Mutationsanalyse keine ausreichende Probenqualität, sodass keine endgültige Zuordnung erfolgen konnte.

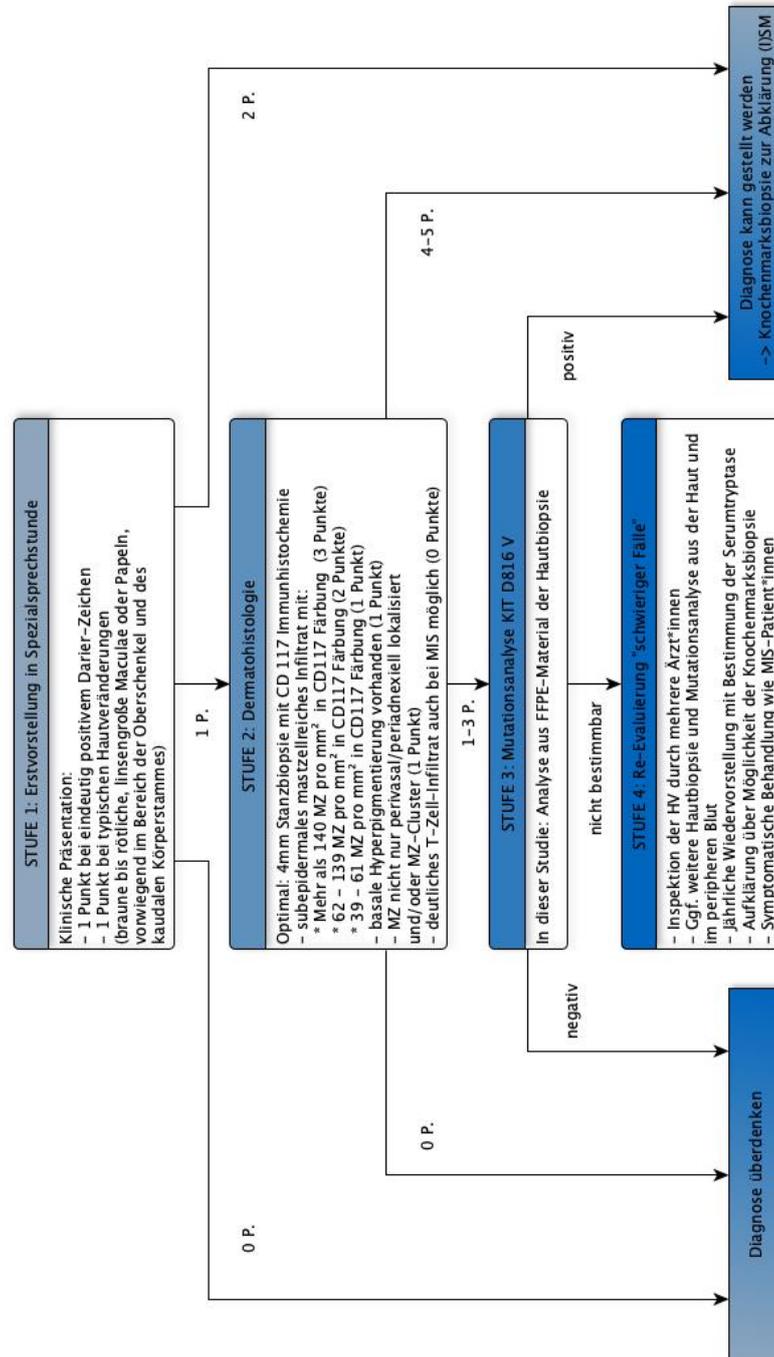
28 von 36 Kontrollfällen (= 77,7%) konnten durch den Algorithmus eindeutig zugeordnet werden. Davon konnten 13 Kontrollfälle (= 36,1%) in Stufe 2 histologisch zugeordnet werden. Ein Kontrollfall erreichte aufgrund einer Mastzellendichte von genau 140 Zellen/mm<sup>2</sup> und dem interstitiellen Vorkommen von Mastzellen 4 Punkte und wurde daher (vermutlich fälschlicherweise) der Mastrozytosegruppe zugeordnet. Die übrigen sieben Fälle konnten aufgrund nicht ausreichender Probenqualität in der qPCR sowie einer Punktzahl von 1-2 Punkten in Stufe zwei nicht klassifiziert werden. Zusammenfassend ergaben sich somit bei den Mastrozytose-Fällen keine falsch-negative Zuordnungen, während sich bei den Kontrollen eine falsch-positive Zuordnung ergab.

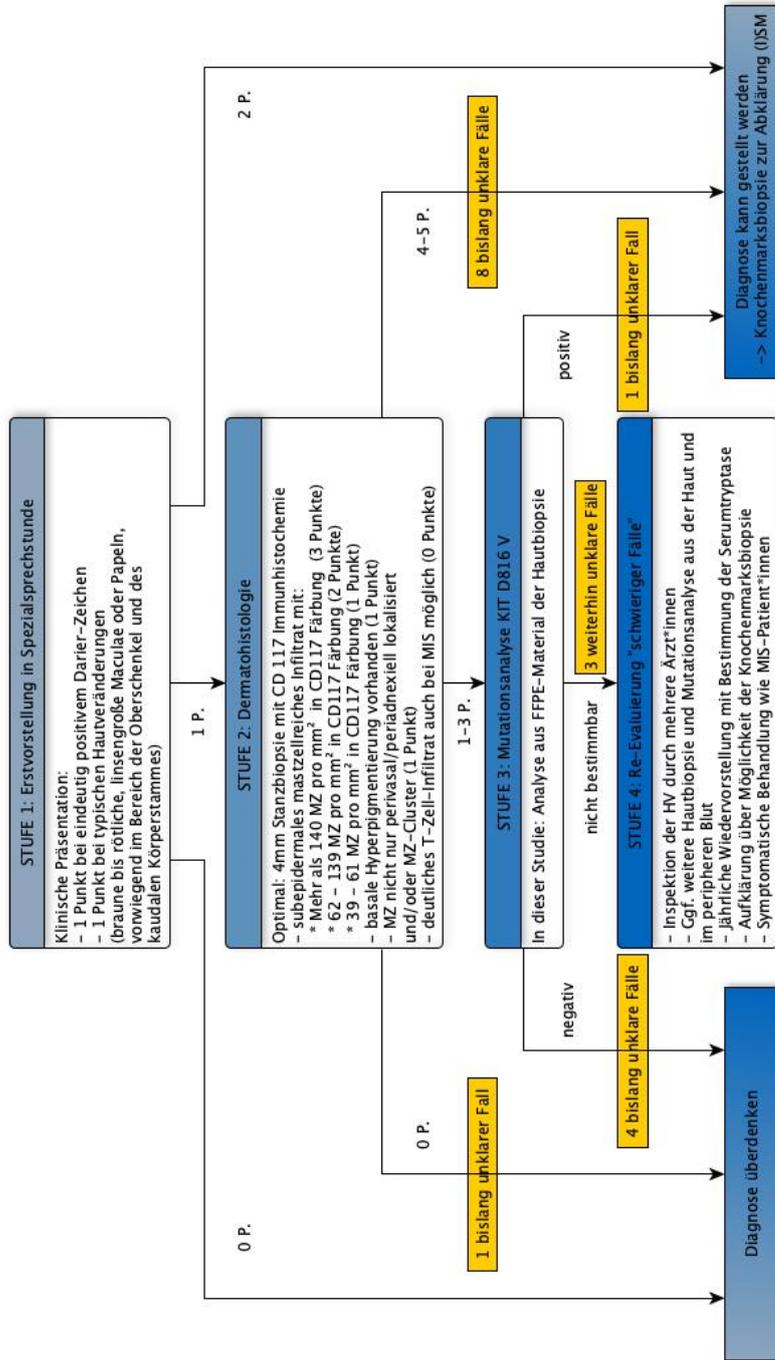
Weitere Erläuterungen zu diesem Workflow finden sich auch im Beschreibungstext der entsprechenden Abbildung 17.

### 3.5. Anwendung des Algorithmus auf Fälle mit bislang unklarer Diagnose

Wie zu Beginn dieser Arbeit erwähnt, schlossen wir auch eine Gruppe von 17 Fällen mit bislang unklarer Diagnose in diese Studie ein. Ziel war es, mithilfe neuer Kriterien in diesen Fällen eine Diagnosestellung zu ermöglichen. Wir wendeten demnach den in Abschnitt 3.4.2 beschriebenen Workflow an, um diese 17 Fälle neu einzuteilen. In einem zweiten Schritt überprüften wir, ob sich die histologischen Zuordnungen mit den Ergebnissen der KIT D816V Mutationsanalyse decken. Abbildung 18 zeigt, wieviele bislang unklare Fälle auf welcher Stufe des Workflow jeweils in eine der beiden Diagnosegruppen eingeteilt werden konnten: 8 von 17 Fällen konnten anhand der neuen histologischen Kriterien bereits der Mastrozytose-Gruppe zugeordnet werden. Diese Zuordnung deckt sich weitestgehend auch mit den Ergebnissen aus der Mutationsanalyse: Sechs der Fälle zeigten eine KIT D816V Mutation, zwei Fälle zeigten keine KIT D816V Mutation. Einer der 17 Fälle konnte histologisch der Nicht-Mastrozytose-Gruppe zugeordnet werden. Dieser zeigte auch keine KIT-Mutation. Fünf weitere Fälle konnten durch die KIT-Mutationsanalyse zugeordnet werden (davon vier negativ, einer positiv). Insgesamt konnten somit mit unserem Workflow 82,4% der bislang nicht zuordenbaren Fälle aufgeklärt werden.

**Abbildung 17 Vorschlag eines diagnostischen Algorithmus für Mastozytose der Haut** Auf Grundlage der Ergebnisse dieser Studie wurden dermatohistologische Kriterien entwickelt, die zur Differenzierung zwischen Mastozytose und anderen Hauterkrankungen, die zur Mastzellhyperplasie führen können, dienen. Diese Kriterien sind in Stufe 2 aufgeführt. Grundlage dieses diagnostischen Workflows ist ein Punktesystem. Das Vorliegen eines T-Zell-Infiltrats wird nicht als Kriterium gewertet, soll aber nicht zum Ablehnen der Diagnose „Mastozytose der Haut“ führen und wurde daher aufgeführt. Sollte sich aus der Dermatohistologie kein für die Diagnosestellung ausreichender Punktwert ergeben, ist insbesondere bei Erwachsenen eine KIT D816V Mutationsanalyse ein sinnvoller nächster Schritt. In dieser Studie wurde diese aus dem paraffinisierten Gewebe der Hautbiopsie angefertigt. Prinzipiell sind aber auch andere Ausgangsmaterialien denkbar (z.B. Blut). Die Indikationsstellung für die Hautbiopsie sowie der Umgang mit weiterhin nicht sicher zuordenbaren Fällen (Stufe 1 und 4) wurden auf Grundlage der klinischen Erfahrung in der Mastozytose-Sprechstunde definiert.





**Abbildung 18 Zuordnung der bisher unklaren Fälle auf Grundlage des neu entwickelten diagnostischen Algorithmus** Mithilfe des im Rahmen dieser Studie entwickelten Algorithmus (siehe auch 3.4) konnten insgesamt 14 von 17 zuvor unklaren Fällen zugeordnet werden. Als Überprüfung der Validität unserer dermatohistologischen Kriterien wurden die Ergebnisse der KIT D816V Mutationsanalyse herangezogen.

## 4. Diskussion und Schlussfolgerungen

### 4.1. Diskussion der Methoden

Im Folgenden sollen zunächst die in dieser Arbeit verwendeten Methoden und Materialien beurteilt, sowie wichtige Limitationen erörtert werden.

#### 4.1.1. Kohortenauswahl

Die Kohorte dieser Studie bestand aus insgesamt 41 gesicherten Fällen von MIS sowie 36 Kontrollfällen und 17 Fällen mit unklarer Diagnose. Die eingeschränkte Patient\*innenzahl könnte daher zu einer Verfälschung der Ergebnisse führen. Da es sich bei Mastozytose allerdings um eine seltene Erkrankung handelt (Orpha.net 2019), konnten auch in vergleichbaren Studien bislang keine wesentlich größeren Patient\*innenzahlen erzielt werden: Wolff u. a. (2001) werteten beispielweise insgesamt 45 histologische Proben von MIS-Patient\*innen aus. In dieser Studie wurden allerdings keine Kontrollen als Vergleichsgruppe eingeschlossen. Garriga u. a. (1988) untersuchten 20 Patient\*innen mit MIS sowie 6 Patient\*innen mit idiopathischem Flushing bzw. idiopathischer Anaphylaxie und verglichen diese mit Hautproben von hautgesunden Patient\*innen. In einer vergleichbaren Studie von A. A. Irani, Garriga u. a. (1990) wurden 15 MIS-Fälle (davon in 10 Fällen sowohl läsionale als auch nicht-läsionale Haut) mit 13 hautgesunden Kontrollen und 6 Fällen mit idiopathischem Flushing oder Anaphylaxie verglichen. Ähnlich wie in der hier vorgelegten Arbeit haben Wilkinson u. a. (1992) einen Vergleich von MIS mit anderen inflammatorischen Hauterkrankungen durchgeführt, sich dabei allerdings lediglich auf die Mastzellzahl und Mastzellgröße konzentriert. In dieser Studie wurden 30 Proben von Erwachsenen Mastozytose-Patient\*innen und 50 Patient\*innen mit unterschiedlichen entzündlichen Hauterkrankungen eingeschlossen.

Leider konnten in dieser Studie seltene Manifestationsformen von MIS, wie beispielweise die diffuse kutane Mastozytose, nicht einbezogen werden, da keine Patientenproben zur Verfügung standen. Auch Wolff u. a. (2001), Garriga u. a. (1988) und A. A. Irani, Garriga u. a. (1990) konzentrierten sich (vermutlich aus dem gleichen Grund) in ihren Studien hauptsächlich auf die makulopapulöse kutane Mastozytose und die „noduläre“ Mastozytose (entspricht dem Begriff „Mastozytome“ in dieser Arbeit).

Wie bereits in Abschnitt 3.4.1 erwähnt, stellte das Alter in unserer Kohorte einen Confounder dar, da die Mastozytose-Patient\*innen (Mastozytome wurden hier als eigene Gruppe betrachtet) im Median deutlich jünger waren (46 Jahre, IQA = 12), als die Kontroll-Patient\*innen (64 Jahre, IQA = 37). Die Altersverteilung der Mastozytose-Patient\*innen entspricht aber insofern den Erwartungen, als dass neben dem Säuglings- und Kleinkindalter vor allem zwischen dem 20. und 50. Lebensjahr die Diagnose Mastozytose der Haut gestellt wird (Brockow 2014). Die Geschlechterverteilung der Mastozytose-Patient\*innen war in unserer Kohorte etwas in Richtung weiblicher Patientinnen verschoben (61,5%), obwohl in der Literatur bislang ein ausgeglichenes Verhältnis zwischen Männern und Frauen beschrieben wird (Brockow 2014).

#### **4.1.2. Immunhistochemie**

Die immunhistochemischen Färbungen wurden automatisiert mit dem BondMax Färbeautomaten der Firma Leica durchgeführt. Die automatisierte bzw. teilautomatisierte Immunhistochemie ist in den letzten Jahren zunehmend zu einem wichtigen Bestandteil der histopathologischen Aufarbeitung geworden und wird erfolgreich auch in der klinischen Routine eingesetzt (u.a. auch an der Klinik und Poliklinik für Dermatologie am Biederstein, München). Ein wichtiger Vorteil dieser Methode gegenüber der manuellen IHC ist das hohe Maß an Standardisierung und Reproduzierbarkeit (Prichard 2014). Dennoch ist es extrem wichtig, zur Etablierung jeder neuen immunhistochemischen Färbung zu Anfang das Färbeprotokoll anhand geeigneter Positiv- und Negativ-Kontrollen zu optimieren und zu überprüfen (Prichard 2014). Dies wurde für alle im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Färbungen durchgeführt. Zudem wurden in jedem Färbeprozess stets mehrere Schnitte mit dem gleichen Antikörper angefärbt, sodass bei negativem Färbeprozess einzelner Schnitte in der Regel andere, positiv angefärbte Vergleichsschnitte zur Verfügung standen und somit ein Versagen des Färbeprotokolls als Ursache für negative Färbeprozesse weitgehend ausgeschlossen werden kann. Bei einzelnen Antikörpern, die sich auf der Mehrzahl der Schnitte negativ zeigten (insb. die in der Pilotphase verwendeten Marker CD30, CD79a, CD20, CD14), könnten allerdings auch falsch-negative Ergebnisse übersehen worden sein.

#### **4.1.3. Mikroskopische Auswertung**

Die mikroskopische Auswertung erfolgte größtenteils allein durch die Autorin dieser Arbeit. Einzelne repräsentative Schnitte wurden mit Herrn Prof. Dr. Knut Brockow und Herrn Prof. Dr. Hans-Peter Horny (Institut für Pathologie der Ludwig-Maximilians-Universität München) nochmals mikroskopiert, um die Ergebnisse der Autorin zu validieren und zu überprüfen. Dies erfolgte insbesondere im Hinblick auf die teilweise relativ subjektiven Auswertungskategorien bei der Mastzell- und T-Zellverteilung sowie in Bezug auf die Positivität von CD2 und CD25. Es ist dennoch davon auszugehen, dass die Beurteilung der genannten Verteilungskriterien stark untersucher\*innenabhängig ist. Auch das Zählen der Mastzellen erfolgte manuell durch die Autorin. Hier hätte durch zwei unabhängige Untersucher\*innen ein höheres Maß an Genauigkeit erzielt werden können. Dies war aus organisatorischen Gründen im Rahmen dieser Studie aber leider nicht möglich. Zudem wurde pro untersuchtem Fall stets nur ein Schnitt pro immunhistochemischem Marker ausgewertet. Dies war hauptsächlich einer Materialknappheit geschuldet. Es ist daher möglich, dass die Lokalisation einzelner Schnitte nicht optimal intraläsional getroffen wurde und es somit zu einer Verfälschung der Ergebnisse gekommen sein könnte.

#### **4.1.4. Mutationsanalyse**

Im Rahmen dieser Studie wurden KIT D816V Mutationsanalysen aus dem FFPE-Gewebe, das auch für die Histopathologie verwendet wurde, durchgeführt. Der Nachweis von KIT D816V in läsionaler Haut wird auch bereits im vorgeschlagenen diagnostischen Procedere von Valent, Akin, Escribano u. a. (2007) als Minor Kriterium der Stufe 2 und (aktueller) von Hartmann u. a. (2016) als Kriterium für MIS aufgegriffen. Allerdings ist die Mutationsanalyse in

vielen Zentren noch kein Teil der Routinediagnostik und bisher hauptsächlich im Rahmen von Studien durchgeführt worden. Kristensen, Broesby-Olsen u. a. (2013) verwendeten in Ihrer Studie dafür beispielsweise nicht fixierte (frische) Hautproben. Sie konstatieren in ihrer Arbeit ferner, dass FFPE-Proben weniger gut geeignet sind, da teilweise zu wenig amplifizierbare DNA extrahierbar ist (Kristensen, Broesby-Olsen u. a. 2013). FFPE-Gewebe ist aber sehr viel häufiger verfügbar, da es nach der Probeentnahme und histologischen Aufarbeitung in der Regel über mindestens 10 Jahre aufbewahrt wird. In den Untersuchungen von Buttner u. a. (1998) und Longley u. a. (1999) wurden erfolgreich auch FFPE-Proben zur Mutationsanalyse verwendet. Von insgesamt 94 Proben, die im Rahmen dieser Studie ausgewertet wurden, war bei 55 Proben eine ausreichende Materialqualität vorliegend. Dies entspricht einer Quote von 58,5%. Dabei ist zu beachten, dass in der Gruppe der Mastozytome besonders viele (nämlich 13 von 15) Fälle als nicht beurteilbar klassifiziert worden sind und sich dies auf die Gesamtquote selbstverständlich negativ auswirkt. In den anderen Untersuchungsgruppen konnten deutlich bessere Ergebnisse erzielt werden, z.B. zeigte sich in der Mastozytosegruppe ein Anteil von 84,6% auswertbarer Proben. Dies könnte möglicherweise auf Unterschiede im Fixationsprozess der Hautproben zurückzuführen sein. Dabei ist insbesondere zu beachten, dass bis auf eine Probe alle Mastozytome freundlicherweise durch Herrn Prof. Horny (Institut für Pathologie, LMU München) zur Verfügung gestellt wurden, während alle anderen Proben an der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie am Biederstein (München) gewonnen wurden. Insofern könnten Unterschiede in der Probenaufbereitung für die Probenqualität bei der KIT D816V Mutationsanalyse bedeutend sein.

## 4.2. Diskussion der Ergebnisse

In diesem Abschnitt werden die Ergebnisse der Arbeit mit bisher veröffentlichten Daten verglichen und Unterschiede bzw. Überschneidungen mit der verfügbaren Literatur diskutiert.

### 4.2.1. Mastzellichte, Mastzellverteilung, Mastzellphänotyp

Anzahl, Verteilung und Aussehen der Mastzellen sind naheliegende Kriterien, die zur Diagnosefindung bei Verdacht auf MIS zur Anwendung kommen (sollten). Aus diesem Grund wurde in dieser Studie versucht, das Vorkommen und Aussehen der Mastzellen bei MIS (im Vergleich zu anderen Hauterkrankungen) zu quantifizieren. Im Folgenden sollen diese Ergebnisse mit den Ergebnissen bereits publizierter Arbeiten verglichen werden.

#### **Mastzellichte**

Die im Rahmen dieser Studie ermittelten Werte für die Mastzellichte bei Mastozytose zeigen sich in der Größenordnung vergleichbar mit den Ergebnissen anderer Autoren. Wilkinson u. a. (1992) ermittelten in ihrer Studie eine mittlere Dichte von  $381 \pm 27,79$  MZ/mm<sup>2</sup> in der subepidermalen Dermis bei MIS. Die Detektion der Zellen erfolgte allerdings nicht immunhistochemisch, sondern mit einer Chloracetat-Ester-Färbemethode (Leder-Färbung). Unsere

Daten ergaben eine mediane Mastzellendichte von 247 (IQA = 255) für die CD117-Färbung bzw. 242 (IQA = 272) für die Tryptase-Färbung in den oberen 300 µm der Dermis. Die Messwerte für Kontrollfälle mit entzündlichen Dermatosen bzw. nicht-entzündeter Haut zeigen sich ebenfalls vergleichbar: Während Wilkinson u. a. (1992) bei gesunder Haut Werte von  $53,96 \pm 7,28$  MZ/mm<sup>2</sup> bzw. bei entzündlichen Hauterkrankungen  $42,85 \pm 4,96$  MZ/mm<sup>2</sup> ermittelten, zeigten sich in unserer Kontrollgruppe subepidermal im Median 3 MZ/mm<sup>2</sup> (IQA = 44) (CD117-Färbung) bzw. 29 MZ/mm<sup>2</sup> (IQA = 56) (Tryptasefärbung). Eine Studie von Garriga u. a. (1988) untersuchte anhand von mit Toluidin-Blau gefärbten Schnitten die Mastzellendichte bei Patient\*innen mit MIS, UP und bei hautgesunden Proband\*innen. Die Autor\*innen erhoben hier insgesamt etwas höhere Mastzellzahlen, als in unserer Studie: Für Patient\*innen mit UP  $596,5 \pm 278$  MZ/mm<sup>2</sup> und sogar  $720,6 \pm 176$  MZ/mm<sup>2</sup> für Patient\*innen mit MIS bei ISM. Bei hautgesunden Probanden fanden sich in dieser Untersuchung  $38,3 \pm 4$  MZ/mm<sup>2</sup>. In unseren Daten finden sich zwar vereinzelt Fälle mit ähnlich hoher Mastzellendichte, insgesamt fanden wir aber weniger Mastzellen. Die Daten von Garriga u. a. (1988) gehen auf die Auswertung von Toluidin-Blau-Färbungen zurück. Diese Färbung ermöglicht zwar die Identifikation von Mastzellen deutlich besser, als beispielsweise eine Hämatoxylin-Eosin-Färbung, ist einer immunhistochemischen Detektion gegenüber allerdings unterlegen (Ribatti 2018). Insofern ist bei den Daten von Garriga u. a. (1988) eventuell mit einer höheren Zählunsicherheit zu rechnen, als in den hier vorliegenden Daten. Andererseits kann in unserer Studie aufgrund der limitierten Anzahl von Schnitten und hohen Anzahl von immunhistochemischen Färbungen nicht ausgeschlossen werden, dass einige der Schnitte, die zur Auszählung der Mastzellen verwendet wurden, nicht mehr optimal intraläsional gelegen waren und somit etwas geringere Mastzellzahlen zustande kamen. A. A. Irani, Garriga u. a. (1990) ermittelten beispielsweise auch insgesamt etwas höhere Werte für die Mastzellendichte im Bereich der subepidermalen Dermis bei Mastozytose: In der Auszählung von Chymase- und Tryptase-gefärbten Gewebeschnitten zeigten sich bei Mastozytose der Haut in deren Studie  $40985 \pm 21772$  MZ/mm<sup>3</sup> (dies entspricht  $553,3 \pm 293,9$  MZ/mm<sup>2</sup>). In gesunder Haut detektierten die Autoren allerdings auch eine überraschend hohe durchschnittliche Mastzellendichte von umgerechnet  $99,2 \pm 40,1$  MZ/mm<sup>2</sup>. Diese Unterschiede in den berichteten Mastzellendichten machen die Festlegung von Grenzwerten schwierig. Wie gerade beschrieben, wurden teilweise auch für gesunde Haut relativ hohe Mastzellendichten berichtet. Es liegt daher nahe anzunehmen, dass die Höhe der Messwerte stark methodenabhängig ist. Im Rahmen unserer Auswertung wurden nur Mastzellen gezählt, deren Zellkern erkennbar gewesen ist. Wenn aber alle Zellanschnitte mitgezählt werden, wird man natürlich auch höhere Werte für die Mastzellendichte erhalten. Diese methodische Divergenz erscheint als plausible Erklärung für die insgesamt niedrigeren Zahlen, die in dieser Studie ermittelt wurden. Die Divergenz der berichteten Mastzellendichten macht die Festlegung diagnostischer Grenzwerte schwer und verdeutlicht, dass die Mastzellendichte nicht als alleiniges Kriterium für die Diagnose MIS verwendet werden sollte. Insgesamt erscheint es uns daher sinnvoll, die Grenzwerte für mit MIS vereinbare Mastzellendichten so zu wählen, dass möglichst wenige falsch-negative Fälle zustande kommen - also eher niedrigere Messwerte zugrunde zu legen, als zu hohe (vgl. dazu auch Abschnitt 4.2.5).

## Mastzellverteilung

A. A. Irani, Garriga u. a. (1990) erwähnen in Ihrer Veröffentlichung, dass sich in Läsionen von MIS-Patient\*innen Mastzellen diffus verstreut in der Dermis finden, während bei nicht-läsionaler oder gesunder Haut Mastzellen vor allem perivasal und periadnexiell auftreten. Dies deckt sich mit den Daten dieser Arbeit, die besagen, dass das interstitielle Vorkommen von Mastzellen statistisch stark mit der Diagnose Mastozytose zusammenhängt ( $p < 0,001$ , vgl. Tabelle 16). Auch Garriga u. a. (1988) beschreiben, dass Mastzellen bei Patient\*innen mit Mastozytose häufiger in größerem Abstand zu Blutgefäßen in der Haut zu finden sind, als bei anderen Erkrankungen.

In der Studie von Wilkinson u. a. (1992) konnte, wie auch in unserer Untersuchung, ein Gradient der Mastzellichte von subepidermal in Richtung der tieferen Dermis festgestellt werden. Dies gilt laut den Autoren sowohl für Mastozytose, als auch für entzündliche Hauterkrankungen, wie z.B. subakuten Dermatitis oder progressiver pigmentierter Purpura, sei aber bei Mastozytose deutlicher ausgeprägt gewesen. In nicht-entzündeter Haut und bei Patient\*innen mit Lichen planus konnten Wilkinson u. a. (1992) keinen signifikanten Abfall der Mastzellichte in der tieferen Dermis feststellen. Allerdings geben die Autoren keine Auskunft darüber, in welcher Tiefe genau jeweils gezählt wurde. A. A. Irani, Garriga u. a. (1990) unterschieden bei der Messung der Mastzellichte zwei Zähllebenen, die jeweils relativ superfiziell gelegen sind. Die erste Ebene erstreckt sich dabei von der dermo-epidermalen Junction bis in 183  $\mu\text{m}$  Tiefe, die zweite Ebene reicht 366  $\mu\text{m}$  tief. Hierbei zeigten sich sowohl bei MIS, als auch bei normaler Haut höhere Mastzellzahlen in der superfizielleren Ebene. Allerdings führten die Autoren keine statistische Analyse der Signifikanz diese Abfalls durch bzw. berichteten diese nicht. In unserer Studie wurde insgesamt ein größerer Betrachtungsbereich von 3 Zähllebenen mit jeweils 300  $\mu\text{m}$  Breite gewählt. Anhand dieser Daten ließ sich ein statistisch signifikanter Abfall der Mastzellichte tatsächlich nur bei den Mastozytose-Fällen zeigen ( $p_{\text{Mastozytose, CD117}} < 0,001$ ;  $p_{\text{Mastozytose, Tryptase}} < 0,001$ ;  $p_{\text{Kontrollen, CD117}} = 0,288$ ;  $p_{\text{Kontrollen, Tryptase}} = 0,381$ ).

Wolff u. a. (2001) unterscheiden vier verschiedene Verteilungsmuster von Mastzellen bei MIS: Perivasal in der papillären und oberen retikulären Dermis, interstitiell, „deckenförmig“ und nodular. Diese unterschiedlichen histopathologischen Muster sollen allerdings nur teilweise mit bestimmten klinischen Erscheinungsmustern der MIS korrelieren (Mihm u. a. 1973; Wolff u. a. 2001). In unserer Studie wurden in erster Linie Proben von Patient\*innen mit UP und Mastozytomen untersucht. Für Mastozytome ist das typische Verteilungsmuster selbstverständlich auch in unserer Kohorte als nodular zu bezeichnen, da es sich um tumorartige Mastzellverbände handelt. Die anderen Verteilungsmuster „perivasal“, „deckenförmig“ und „interstitiell“ waren in unseren MIS-Fällen ebenfalls alle vertreten. Hierbei ist allerdings anzumerken, dass durchaus mehrere dieser Verteilungsmuster innerhalb der gleichen Hautprobe zu finden sein können bzw. eine strikte Abgrenzung zwischen einem MIS-Fall mit beispielsweise perivasalem Verteilungsmuster im Gegensatz zu einem anderen Fall mit interstitiellem Verteilungsmuster weder sinnvoll noch möglich erscheint. Das deckenförmige Verteilungsmuster könnte terminologisch als stark subepidermal betontes Infiltrat mit hoher Mastzellichte beschrieben werden und vereint somit zwei Kriterien, die unseren Daten zufolge charakteristisch für MIS sind.

## Mastzellphänotyp

Wie bereits einleitend im Abschnitt 1.1.3 beschrieben, ist für Mastzellen, die im Rahmen einer systemischen Mastozytose vermehrt im Knochenmark vorliegen, ein bestimmter Phänotyp sehr typisch, welcher auch Einzug in die WHO-Kriterien (Tabelle 3) zur Diagnose einer systemischen Mastozytose gefunden hat. Der Phänotyp von Mastzellen in der Haut bei MIS ist allerdings bislang weniger gut definiert. Angelehnt an die genannten WHO-Kriterien, wurde die vorwiegend vorliegende Form der Mastzellen auf allen untersuchten Gewebeschnitten definiert. Hierbei zeigte sich in dieser Studie, dass die Zellen in ihrer Form nicht von anderen, physiologischerweise in der Haut vorkommenden Mastzellen unterscheidbar sind. Sowohl in den Kontrollen, als auch in den MIS-Fällen zeigten sich (mit Ausnahme der Mastozytome) spindelförmige bzw. sphärische Mastzellen (bei querschnittlichem Anschnitt der Zellen). In den tumorartigen Zellverbänden der Mastozytome zeigten sich die Zellen kuboid bis rund. Dies entspricht auch den zuvor berichteten Beobachtungen von A. A. Irani, Garriga u. a. (1990) und Mihm u. a. (1973).

Aus unseren Daten geht hervor, dass Mastzellen bei MIS im Mittel etwas größer sind, als Mastzellen bei Kontroll-Hautproben, auch wenn sich bei der Betrachtung der Einzelzellgrößen sehr große Überlappungsbereiche ergeben. Diese Beobachtung machten auch Wilkinson u. a. (1992) und Tharp u. a. (1988). Wilkinson u. a. (1992) ermittelten bei der computergestützten Ausmessung von Mastzellen auf histologischen Schnitten eine mittlere MZ-Größe von  $47,4 \pm 2,26 \mu\text{m}^2$  bei MIS bzw.  $32,34 \pm 2,22 \mu\text{m}^2$  bei Kontrollen. Tharp u. a. (1988) ermittelten elektronenmikroskopisch eine mittlere Zellgröße von  $53,3 \mu\text{m}^2$  (Zytoplasma) +  $20,4 \mu\text{m}^2$  (Zellkern) =  $73,7 \mu\text{m}^2$  (gesamt), während sie bei gesunden Kontrollen eine Größe von  $34,4 \mu\text{m}^2$  (Zytoplasma) +  $14,1 \mu\text{m}^2$  (Zellkern) =  $48,5 \mu\text{m}^2$  (gesamt) maßen. Einen weiteren Vergleichswert für die durchschnittliche Größe von (physiologischen) Mastzellen im Allgemeinen bietet die Untersuchung von A. A. Irani, Schechter u. a. (1986). Hier wurde eine mediane Größe von  $76 \mu\text{m}^2$  von Tryptase-Chymase-positiven Mastzellen ermittelt, wobei Zellen in Lunge, Mukosa und Haut untersucht wurden. Die Werte der genannten Vorstudien liegen jeweils sowohl für die Kontrollgruppen, als auch für MIS unterhalb den in unserer Studie ermittelten Werten von median  $127 \mu\text{m}^2$  bei MIS (Mastozytome ausgenommen) bzw.  $108 \mu\text{m}^2$  bei Kontrollen. Dies ist am ehesten auf einen methodischen Unterschied zurückzuführen: In unserer Studie wurden jeweils die zehn größten, vollständig abgebildeten Mastzellen jedes Gewebeschnittes vermessen, während in den genannten Studien keine Vorauswahl der größten Zellen erfolgte. Somit erscheint es nachvollziehbar, dass die Werte unserer Untersuchung höher liegen. Die Tatsache, dass MIS-Mastzellen im Durchschnitt etwas größer waren, als in den Kontrollen, konnte aber in unseren Daten, wie auch in den genannten Publikationen, gleichermaßen nachvollzogen werden.

Die Expression von CD2 und CD25 ist ein wichtiges Kriterium bei der Diagnostik von Mastozytose im Knochenmark (Arber u. a. 2016; Valent, Akin und Metcalfe 2017). Einige Autoren postulieren auch, dass die Expression dieser Oberflächenmarker, insbesondere von CD25, auf Mast-

zellen bei MIS von diagnostischer Bedeutung sei (Hollmann u. a. 2008; Morgado u. a. 2014; Lange u. a. 2014). So berichteten z.B. Hollmann u. a. (2008) in einem Patient\*innenkollektiv von 10 Patient\*innen mit SM in allen Fällen eine Ko-Expression von CD25 auf Mastzellen gefunden zu haben. Bei kutaner Mastozytose sei dies in fünf von 20 Patient\*innen der Fall gewesen. In der Folge untersuchten Lange u. a. (2014) ein größeres Kollektiv von 52 MIS-Fällen. Hier zeigte sich in der Mehrheit von 67,3% zumindest eines der beiden Antigene CD2 oder CD25 als positiv. Ebenfalls zeigte sich eine höhere Quote an CD2- und/oder CD25-positiven Fällen bei den Patient\*innen mit SM im Vergleich zu CM (57,1% versus 90,3%). Interessanterweise spiegeln sich diese Ergebnisse in unseren Daten allerdings nicht wider. In unserer Kohorte zeigten sich nur in je 2 Fällen von Mastozytomen CD2- bzw. CD25-positive Mastzellen, während sich die anderen Mastozytose-Fälle für beide Marker negativ zeigten. Morgado u. a. (2014) haben in ihrer Betrachtung eines pädiatrischen Kollektivs ebenfalls festgestellt, dass die Expression von CD25 besonders häufig bei Mastozytomen zu finden ist, nämlich in insgesamt 53% der untersuchten Mastozytome. Insgesamt konnten auch diese Autoren eine deutlich höhere Quote an CD25-positiven Fällen konstatieren als wir, nämlich insgesamt in 28% der untersuchten MIS-Fälle (MPKM und Mastozytome zusammengenommen). Bei der Betrachtung dieser Ergebnisse ist zu beachten, dass auch aktivierte Lymphozyten CD2 und CD25 exprimieren können und somit als interne Positiv-Kontrolle dienen. Da sich in unseren Daten in 61,5% der Mastozytosefälle CD2-positive Lymphozyten bzw. in 11,5% CD25-positive Lymphozyten zeigten, kann davon ausgegangen werden, dass unsere negativen Ergebnisse nicht durch eine falsch-negative Färbung erklärbar sind. Da sowohl in dieser, als auch in den zuvor zitierten Studien allerdings keine Doppelfärbungen (z.B. CD117 und CD25) durchgeführt worden sind, kann eine Missinterpretation des Zelltyps (Lymphozyt versus Mastzelle) jeweils nicht sicher ausgeschlossen werden, obwohl beide Zellen morphologisch sehr unterschiedlich sind. Es wäre insofern wünschenswert, die Diskrepanz zwischen unseren Ergebnissen und der vorliegenden Literatur z.B. durch genannte Doppelfärbungen zu überprüfen.

Neben CD2 und CD25 ist auch CD30 ein Oberflächenprotein, welches bei der Diagnostik der systemischen Mastozytose im Knochenmark relevant ist (Valent, Akin und Metcalfe 2017). CD30 wird in der Untersuchung von Knochenmark insbesondere mit fortgeschrittenen bzw. aggressiveren Formen von systemischer Mastozytose in Zusammenhang gebracht (Sotlar u. a. 2011). Es gibt allerdings auch Berichte von CD30-exprimierenden Mastzellen in der Haut. Beispielsweise berichten Morgado u. a. (2014) von CD30 Expression durch Mastzellen in der Haut in 82% der (benignen) pädiatrischen MIS-Fälle, die sie untersucht haben. Hierbei zeigten sich in den unterschiedlichen klinischen Präsentationsformen der MIS keine Unterschiede. Auch Russano de Paiva Silva u. a. (2018) fanden in den meisten MIS-Fällen (39 von 42) zumindest eine partielle Positivität für CD30. Allerdings waren sowohl Intensität der Färbung, als auch der positive Mastzellanteil pro Fall sehr stark schwankend. Die Autoren konnten ebenfalls keinen Zusammenhang zur Aggressivität oder klinischen Präsentationsform und CD30-Positivität feststellen. In Kontrollfällen fanden sie keine CD30-positiven Mastzellen. In unserer Studie wurden nur wenige Fälle auf CD30 untersucht, da sich in der Pilotphase nach Färbung von sieben MIS- und fünf Kontrollfällen keine CD30-Positivität zeigte. Da aufgrund

der vorliegenden Literatur davon auszugehen ist, dass CD30 meist nur eine partielle Positivität schwankender Intensität in MIS-Infiltraten aufweist, ist es bei der geringen Anzahl gefärbter Gewebeschnitte nicht auszuschließen, dass einzelne partiell CD30-positive Fälle als falsch-negativ gewertet wurden. Jedoch zeigte unsere initialen Auswertung keinen Wert des Markers in der Diagnostik von MIS.

Auch CD45 wurde in dieser Untersuchung nur bei wenigen Fällen gefärbt. Chisholm u. a. (2015) hatten in Flow-zytometrischen Untersuchungen beobachtet, dass Mastzellen von SM-Patient\*innen eine höhere Expression von CD45 aufweisen. Akiyama u. a. (1991) berichten in einem kurzen Kommentar ebenfalls, dass sie bei einigen UP-Proben CD45 positive Mastzellen detektieren konnten. Da sich der Marker als Pan-Leukozyten-Antigen auch als „Screening-Marker“ für andere mögliche Zellen im Begleitinfiltrat bei MIS eignet, wurde er in die Pilotphase der Studie mit aufgenommen. Es konnte allerdings keine immunhistochemisch fassbare verstärkte CD45 Expression auf Mastzellen bei MIS-Patient\*innen im Vergleich zu Kontrollen dargestellt werden. Zudem zeigte sich die mikroskopische Differenzierung der angefärbten Zellen als sehr schwierig, sodass der Marker nicht weiter angewendet wurde.

Eine weitere Färbung, welche nur in der Anfangsphase der Studie angewendet wurde, ist CD68. CD68 ist ein Marker, der im Rahmen unterschiedlicher hämatologischer Erkrankungen auf neoplastischen Zellen vorkommen kann (W. V. Li u. a. 1996) und somit nicht als spezifisch für Mastzellerkrankungen gilt. W. V. Li u. a. (1996) definierten das Vorkommen CD68-positiver Mastzellen aber als charakteristischen Phänotyp für Mastrozytose. Es gibt auch einige Berichte über atypische Fälle von Mastrozytose mit Hautbeteiligung, die CD68 positive Mastzellen exprimieren (Marrero Aleman u. a. 2017; Lachapelle u. a. 2012). Die Relevanz dieses Befundes ist allerdings unklar. Auch in unserer Pilotstudie zeigten von sieben gefärbten Mastrozytose-Fällen zwei eine vollständige und vier eine partielle CD68-Positivität der Mastzellen, während zehn von zehn Kontrollfällen negativ blieben. CD68 könnte insofern durchaus ein interessanter Marker zur Detektion neoplastischer Mastzellen in der Haut sein (vgl. auch Russano de Paiva Silva u. a. (2018)), wurde allerdings zugunsten derzeit in der Diagnostik von Mastrozytose etablierterer Atypie-Marker (wie CD2 und CD25) aufgrund von Materialknappheit in dieser Studie nicht weiter verfolgt, ist aber ein interessanter Aspekt für zukünftige Studien.

#### **4.2.2. Begleitinfiltrat**

Bei der histologischen Beschreibung von MIS-Läsionen stehen aus naheliegenden Gründen die vermehrt vorkommenden Mastzellen im Vordergrund. Anderen Immunzellen kommt dabei (bislang) keine besondere Beachtung zu. Mihm u. a. (1973) und Wolff u. a. (2001) beschreiben lediglich das vereinzelt vermehrte Vorkommen eosinophiler Granulozyten in den Läsionen. Dies erscheint naheliegend, da MZ aufgrund ihres Zytokinprofils eine TH2-Immunantwort und darüber indirekt die Rekrutierung von Eosinophilen bewirken können (Goodarzi u. a. 2003). Im Rahmen zahlreicher inflammatorischer Pathologien, beispielsweise des gastrointestinalen Traktes oder Atemwege, kommen Mastzellen, eosinophile Granulozyten und T-Zellen daher häufig gemeinsam vor. A. M. Irani u. a. (1987) postulieren beispielweise auch, dass T-Zellen wichtigen Einfluss auf die Differenzierung von Mastzellen nehmen. Die Beimengung von T-Lymphozyten im Infiltrat einer MIS-Läsion ist allerdings bisher (zu unserer Kenntnis) nicht

systematisch untersucht worden. In den Konsensus-Papieren von Valent, Akin, Escribano u. a. (2007) und Hartmann u. a. (2016) wird von einem monomorphen Mastzellinfiltrat als diagnostisches Kriterium gesprochen. Zwar erwähnen Valent, Akin, Escribano u. a. (2007), dass ein gemischtzelliges Infiltrat die Diagnose nicht zwangsläufig ausschließt, allerdings wird in keiner der Veröffentlichungen näher auf mögliche weitere Zelltypen im Infiltrat eingegangen. Im Rahmen dieser Studie wurden in der Pilotphase zahlreiche immunhistochemische Färbungen zum „Screening“ nach anderen Immunzellen angewendet, welche größtenteils aufgrund negativer Ergebnisse dieser Vorstudie nicht weiter verfolgt wurden (vgl. hierzu auch Tabelle 4). Allerdings zeigte sich passend zu den oben beschriebenen pathophysiologischen Zusammenhängen zwischen Mastzellen, Eosinophilen und T-Lymphozyten, dass das Vorkommen von T-Zellen – teils in durchaus relevanter Anzahl – bei MIS häufig (in 76,9%) ist. Dies ist aus unserer Sicht bei der histologischen Diagnosestellung wichtig zu berücksichtigen, insbesondere in Hinblick auf die bisherigen Formulierungen bezüglich eines monomorphen Infiltrats in den Konsensus-Veröffentlichungen. Aus diesem Grund wurde dieser Punkt in den diagnostischen Workflow (siehe auch 4.2.5) aufgenommen, obwohl er kein Diagnosekriterium für Mastozytose der Haut darstellt.

#### **4.2.3. Basale Pigmentierung**

Wie bereits in dem (veralteten) Begriff *Urticaria pigmentosa* zum Ausdruck kommt, ist eine Hyperpigmentierung der Hautläsionen bei MIS sehr typisch. Die Ursache für die vermehrte Pigmentierung ist nicht geklärt, diskutiert werden Mechanismen der postinflammatorischen Hyperpigmentierung sowie eine fokale Dysregulation der SCF-Aktivität mit Aktivierung von Melanozyten (Tomita u. a. 1993; Cerroni u. a. 2016). Obwohl es sich also um ein bekanntes und typisches Merkmal der MIS handelt, wurde die basale Hyperpigmentierung der Epidermis bislang in keinem der beiden Konsensus Statements zur Diagnostik der Mastozytose der Haut (Valent, Akin, Escribano u. a. 2007; Hartmann u. a. 2016) explizit als Kriterium angeführt. Aus unseren Daten geht hervor, dass das Vorliegen einer mittleren bis starken Pigmentierung in der logistischen Regression immerhin eine OR von 12,643 bezogen auf die Diagnose MIS bedingt. Dabei ist allerdings zu beachten, dass sich die erhobenen Daten auf die kaukasische Bevölkerung beziehen und die Pigmentierung allein selbstverständlich keine Diagnose zulässt. Dennoch erscheint sie ein wichtiges Zusatzkriterium zu sein, wie auch die Ergebnisse der Random Forest Analyse (vgl. Abbildungen 15 und 16) bestätigen.

#### **4.2.4. KIT D816V Mutationsanalyse**

Die technisch-methodische Diskussion der KIT D816V Mutationsanalyse in dieser Studie ist bereits in Abschnitt 4.1.4 abgehandelt worden. Insgesamt zeigen sich die Ergebnisse der als auswertbar klassifizierten Hautproben gut passend zu bislang publizierten Daten. Es zeigte sich in keinem der Fälle von MIS bei Erwachsenen eine negative KIT D816V Mutation; alle auswertbaren Proben zeigten sich positiv. Im Vergleich dazu zeigte sich bei Mastozytomen (nur von Kindern) nur eine KIT D816V Mutation in 15 Proben. Eine weitere der 15 Proben zeigte sich negativ, alle anderen wurden als nicht beurteilbar eingeteilt. Möglicherweise lagen hier andere KIT Mutationen vor, siehe hierzu auch die Ausführungen in Unterabschnitt 4.1.4. Kristensen,

Vestergaard u. a. (2011), Buttner u. a. (1998) und Longley u. a. (1999) konnten ebenfalls in jeweils mindestens 95% der Hautproben von erwachsenen MIS-Patient\*innen die KIT D816V Mutation nachweisen, während bei Kindern in den Untersuchungen von Buttner u. a. (1998) und Longley u. a. (1999) keine oder teilweise andere KIT Mutationen nachweisbar waren. Somit zeigen sich unsere und die genannten Ergebnisse gut mit der Hypothese vereinbar, dass die KIT D816V Mutation nahezu pathognomonisch für Mastozytose bei erwachsenen Patient\*innen ist. Insofern erscheint es sinnvoll, wie bereits von Valent, Akin, Escribano u. a. (2007) und Hartmann u. a. (2016) vorgeschlagen, den Nachweis einer KIT D816V Mutation in einer Hautprobe als ausreichend für die Diagnosestellung einer MIS zu bewerten, falls die Diagnose auf konventionelle Weise nicht gestellt werden kann.

#### **4.2.5. Empfohlener diagnostischer Algorithmus**

Auf Grundlage der in dieser Studie ermittelten Ergebnisse erstellten wir einen diagnostischen Workflow, der die Diagnose von MIS verbessert und erleichtert. Eine genaue Beschreibung und graphische Darstellung dieses Vorschlags findet sich in Abschnitt 3.4.2.

Die Punktwerte in Stufe 2, die zur Zuordnung zu einer der Kategorien „Diagnose überdenken“ bzw. „Diagnose kann gestellt werden“ führen, wurden so gewählt, dass kein Mastozytose-Fall falsch-negativ eingeordnet wird. Würden beispielsweise für die Kategorie „Diagnose überdenken“ die Punktwerte 0 und 1 in Stufe 2 festgelegt, so wären zwei Mastozytose-Fälle falsch-negativ klassifiziert worden. Es ist denkbar, dass diese beiden Fälle deshalb nur einen Punkt in Stufe 2 erreicht haben, weil die ausgewerteten Schnitte die eigentliche Läsion nicht optimal erfasst haben. Dennoch erschien es uns sinnvoll, die Grenzwerte möglichst streng in Bezug auf falsch-negative Zuordnungen zu wählen, sodass im Zweifel weitere Untersuchungen zur Diagnosefindung (z.B. KIT Mutationsanalyse in Haut oder peripherem Blut bzw. Entnahme einer zweiten Hautprobe) angeschlossen werden würden. Die gewählten Grenzen für die Zuordnung zur Kategorie „Diagnose kann gestellt werden“ sind etwas großzügiger gewählt, sodass möglichst viele tatsächliche MIS-Fälle auch detektiert werden. Dies führt allerdings dazu, dass ein Kontroll-Fall falsch-positiv zugeordnet wird. Dabei ist zu bedenken, dass in dem vorgeschlagenen Workflow der Dermatohistologie noch eine klinische Stufe vorgeschaltet ist. In der klinischen Praxis wäre dieser Fall (einer Urtikaria) also aufgrund der unpassenden klinischen Präsentation bereits aussortiert worden. Bei der Anwendung des Algorithmus auf die bislang unklaren Fälle konnten mehr als 2/3 (82,4%) der Fälle einer der Kategorien zugeordnet werden. Davon konnten mehr als die Hälfte allein durch die Histologie eingruppiert werden. Erfreulicherweise zeigten sich die Zuordnungen auch in guter Konkordanz zu den Mutationsanalyse-Ergebnissen, wobei nur zwei Proben histologisch als positiv eingeordnet wurden, bei denen keine KIT D816V Mutation vorliegt. Eine fehlende KIT D816V Mutation schließt die Diagnose einer MIS nicht aus, macht sie aber insbesondere bei Erwachsenen deutlich weniger wahrscheinlich (Garcia-Montero u. a. 2006). Hierbei könnte es sich also möglicherweise um eine falsch-positive Zuordnung handeln. Genauso ist es allerdings denkbar, dass es sich um eine Mastozytose mit einer anderen oder ohne KIT-Mutation handelt. In jedem Fall erscheint bei passenden klinischen Hinweisen eine weitergehende Abklärung (z.B. durch eine Knochenmarksbiopsie) sinnvoll.

Es wurde bereits früher von Valent, Akin, Escribano u. a. (2007) ein Algorithmus zur Diagnostik der MIS vorgeschlagen. In dieser Konsensus-Publikation wurde als Majorokriterium die typische klinische Präsentation oder ein positives Darier-Zeichen bei Ausschluss anderer zugrundeliegender Hauterkrankungen definiert. Die beiden Minorkriterien sind: 1. MZ Aggregate > 15 MZ/Cluster oder monomorphes Infiltrat mit > 20 MZ/HPF und 2. (falls 1. nicht zutrifft) positiver KIT D816V Nachweis in läsionaler Haut. Diese Kriterien werden in der genannten Publikation allerdings nicht an einem Patient\*innenkollektiv überprüft. Wendet man den Algorithmus von Valent, Akin, Escribano u. a. (2007) auf unser (gesichertes) MIS-Patient\*innenkollektiv an, werden von 26 Fällen insgesamt 22 (84,6 %) eindeutig als MIS klassifiziert, vier bleiben unklar bei nicht bestimmbarer KIT Mutation. Von diesen 22 entfallen nur sechs auf das histologische Minor-Kriterium, die übrigen 16 werden durch die KIT Mutation detektiert. (Hierbei wurde ein Infiltrat, das > 10% T-Zellbeimengung aufweist, als nicht monomorph eingeordnet sowie eine Sehfeldzahl von 20 für die HPFs angenommen.) Im Vergleich zeigen sich bei unserem Vorschlag 24 von 26 eindeutig positive Zuordnungen, die allesamt auf Grundlage der Histologie erfolgten. Von den in unserer Kohorte als „unklare Fälle“ bezeichneten Patient\*innen, werden durch den genannten Algorithmus sieben von 17 Fällen als MIS klassifiziert, davon nur zwei auf Grundlage der Histologie. Sieben von 17 werden aufgrund der negativen Mutation als nicht MIS eingeordnet, drei bleiben unklar. Mit unserem neuen Workflow ergeben sich im Vergleich 8 histologische MIS Zuordnungen und eine histologische nicht MIS Zuordnung. Fünf weitere Fälle werden über die KIT Mutation eingeteilt (vier negativ, einer positiv).

Wendet man die beiden Minorkriterien von Valent, Akin, Escribano u. a. (2007) auch auf unsere Kontrollgruppe an, so werden von 36 Fällen nur 23 als nicht MIS erkannt, 13 bleiben unklar, während laut unseres Algorithmus 28 von 36 Kontrollen negativ eingeordnet werden.

Es zeigt sich also insgesamt durch unseren Algorithmus sowohl für Kontrollen als auch für MIS-Fälle eine bessere Zuordnungsquote. Darüber hinaus zeigen sich insbesondere unsere spezifischeren histologischen Kriterien als überlegen, sodass weniger häufig die KIT D816V Mutationsanalyse zur Diagnosezuordnung durchgeführt werden muss.

### 4.3. Schlussfolgerungen und Ausblick

Zusammenfassend lassen unsere Daten darauf schließen, dass der durch uns empfohlenen Workflow die Diagnostik für MIS deutlich verbessert. Im Vergleich zu den bislang bestehenden Diagnosekriterien für MIS stellt unser Vorschlag eine deutliche Konkretisierung und Erweiterung dar. Die Kriterien „interstitielles Vorkommen von Mastzellen“ und „Pigmentierung“ wurden in den bisherigen Empfehlungen (Valent, Akin, Escribano u. a. 2007; Hartmann u. a. 2016) nicht berücksichtigt, obwohl sie auf Grundlage unserer Ergebnisse wichtige Kriterien darstellen. Ferner bieten wir erstmals drei Cut-off-Werte für die ermittelte Mastzellichte eines Präparates an, die bezüglich Sensitivität bzw. Spezifität festgelegt wurden und somit eine deutlich bessere Orientierung zulassen, als die bisherigen Angaben von mehr als 40 MZ/mm<sup>2</sup> (Hartmann u. a. 2016) bzw. mehr als 20 MZ/HPF (dies entspricht circa 50-200 MZ/mm<sup>2</sup>, je nach Sehfeldzahl

des Mikroskops) (Valent, Akin, Escribano u. a. 2007). Wie bereits im entsprechenden Abschnitt 4.2.1 erwähnt, konnten leider auch im Rahmen dieser Studie nicht alle (möglicherweise) interessanten und relevanten Parameter ausreichend untersucht werden. Wünschenswert wären insbesondere weitere Daten zur Expression von CD68. Vorherige Publikationen und die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen teils divergierende Daten bezüglich der Expression von CD30, CD2 und CD25 auf Mastzellen bei MIS (Russano de Paiva Silva u. a. 2018; Morgado u. a. 2014; Hollmann u. a. 2008; Lange u. a. 2014). Möglicherweise haben sich diese Marker auch deshalb noch nicht in der klinischen Routine zur Diagnostik der MIS etabliert. Doppelfärbungen mit CD117 bzw. Tryptase und den genannten Proteinen wären daher in zukünftigen Studien wünschenswert. Die diskret unterschiedliche Mastzellgröße bei Mastozytose bzw. anderen Mastzellhyperplasien ist derzeit (noch) von eingeschränkter diagnostischer Relevanz, da die Unterschiede in Bezug auf die Einzelzellen durch konventionelle mikroskopische Begutachtung kaum fassbar sind. Vorstellbar wäre allerdings, dass computergestützte oder auf künstliche Intelligenz aufbauende Auswertesysteme diese diskreten Unterschiede nutzbar machen könnten. Da genetische Untersuchungen zunehmend leistbarer und verbreiteter sind, ist zudem davon auszugehen, dass in Zukunft die Bestimmung des KIT-Mutationsstatus aus Haut, Blut und Knochenmark weiter an Bedeutung zunehmen wird.

## A. Literatur

- Abonia, J. P., C. Blanchard, B. B. Butz, H. F. Rainey, M. H. Collins, K. Stringer, P. E. Putnam und M. E. Rothenberg (2010). „Involvement of Mast Cells in Eosinophilic Esophagitis“. In: *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 126.1, S. 140–149. ISSN: 1097-6825 (Electronic) 0091-6749 (Linking). DOI: 10.1016/j.jaci.2010.04.009. PMID: 20538331.
- Akin, C. und D. D. Metcalfe (2004). „Systemic Mastocytosis“. In: *Annual Review of Medicine* 55, S. 419–432. ISSN: 0066-4219. DOI: 10.1146/annurev.med.55.091902.103822. pmid: 14746529.
- Akiyama, M., Y. Watanabe und T. Nishikawa (1991). „Immunohistochemical Characterization of Human Cutaneous Mast Cells in Urticaria Pigmentosa (Cutaneous Mastocytosis)“. In: *Acta pathologica japonica* 41.5, S. 344–349. ISSN: 0001-6632 (Print) 0001-6632 (Linking). PMID: 1651041.
- Anthony, R. M., L. I. Rutitzky, J. Urban J. F., M. J. Stadecker und W. C. Gause (2007). „Protective Immune Mechanisms in Helminth Infection“. In: *Nature Reviews Immunology* 7.12, S. 975–987. ISSN: 1474-1741 (Electronic) 1474-1733 (Linking). DOI: 10.1038/nri2199. PMID: 18007680.
- Arber, D. A., A. Orazi, R. Hasserjian, J. Thiele, M. J. Borowitz, M. M. Le Beau, C. D. Bloomfield, M. Cazzola und J. W. Vardiman (2016). „The 2016 Revision to the World Health Organization Classification of Myeloid Neoplasms and Acute Leukemia“. In: *Blood* 127.20, S. 2391–2405. ISSN: 1528-0020 (Electronic) 0006-4971 (Linking). DOI: 10.1182/blood-2016-03-643544. PMID: 27069254.
- Bach, M. K., K. J. Block und K. F. Austen (1971). „IgE and IgG<sub>a</sub> Antibody-Mediated Release of Histamine from Rat Peritoneal Cells. II. Interaction of IgG<sub>a</sub> and IgE at the Target Cell“. In: *Journal of Experimental Medicine* 133.4, S. 772–784. ISSN: 0022-1007 (Print) 0022-1007 (Linking). DOI: 10.1084/jem.133.4.772. PMID: 4101607.
- Benhamou, M. und R. P. Siraganian (1992). „Protein-Tyrosine Phosphorylation: An Essential Component of Fc Epsilon RI Signaling“. In: *Immunology Today* 13.6, S. 195–197. ISSN: 0167-5699 (Print) 0167-5699 (Linking). PMID: 1320890.
- Benjamin A Raby MD, M. (2019). *UptoDate: Tools for Genetics and Genomics: Polymerase Chain Reaction*. URL: [https://www.uptodate.com/contents/tools-for-genetics-and-genomics-polymerase-chain-reaction?search=PCR&source=search\\_result&selectedTitle=1~150&usage\\_type=default&display\\_rank=1](https://www.uptodate.com/contents/tools-for-genetics-and-genomics-polymerase-chain-reaction?search=PCR&source=search_result&selectedTitle=1~150&usage_type=default&display_rank=1).
- Blank, U., F. H. Falcone und G. Nilsson (2013). „The History of Mast Cell and Basophil Research - Some Lessons Learnt from the Last Century“. In: *Allergy* 68.9, S. 1093–1101. ISSN: 1398-9995 (Electronic) 0105-4538 (Linking). DOI: 10.1111/all.12197. PMID: 23991682.

- Boyce, J. A. (2005). „Eicosanoid Mediators of Mast Cells: Receptors, Regulation of Synthesis, and Pathobiologic Implications“. In: *Chemical Immunology and Allergy* 87, S. 59–79. ISSN: 1660-2242 (Print) 0079-6034 (Linking). DOI: 10.1159/000087571. PMID: 16107763.
- Breiman, L. (2001). „Random Forests“. In: *Machine Learning* 45.1, S. 5–32. ISSN: 0885-6125. DOI: 10.1023/A:1010933404324. URL: %3CGo%20to%20ISI%3E://WOS:000170489900001.
- Breiman, L. (2002). „Manual on Setting up, Using, and Understanding Random Forests v3. 1“. In: *Statistics Department University of California Berkeley, CA, USA* 1, S. 58.
- Brockow, K. (2004). „Urticaria Pigmentosa“. In: *Immunology and allergy clinics of North America* 24.2, S. 287–316, vii. ISSN: 0889-8561 (Print) 0889-8561 (Linking). DOI: 10.1016/j.iac.2004.01.002. PMID: 15120152.
- Brockow, K. (2013). „[Mast cell activation syndrome]“. In: *Der Hautarzt; Zeitschrift Fur Dermatologie, Venerologie, Und Verwandte Gebiete* 64.2, S. 102–106. ISSN: 1432-1173. DOI: 10.1007/s00105-012-2452-6. pmid: 23385621.
- Brockow, K. (2014). „Epidemiology, Prognosis, and Risk Factors in Mastocytosis“. In: *Immunology and allergy clinics of North America* 34.2, S. 283–295. ISSN: 1557-8607 (Electronic) 0889-8561 (Linking). DOI: 10.1016/j.iac.2014.01.003. PMID: 24745674.
- Brockow, K., C. Jofer, H. Behrendt und J. Ring (2008). „Anaphylaxis in Patients with Mastocytosis: A Study on History, Clinical Features and Risk Factors in 120 Patients“. In: *Allergy* 63.2, S. 226–232. ISSN: 1398-9995. DOI: 10.1111/j.1398-9995.2007.01569.x. pmid: 18186813.
- Brockow, K. und D. D. Metcalfe (2010). „Mastocytosis“. In: *Chemical Immunology and Allergy* 95, S. 110–124. ISSN: 1662-2898 (Electronic) 0079-6034 (Linking). DOI: 10.1159/000315946. PMID: 20519885.
- Brockow, K. und J. Ring (2011). „Update on Diagnosis and Treatment of Mastocytosis“. In: *Current allergy and asthma reports* 11.4, S. 292–299. ISSN: 1534-6315 (Electronic) 1529-7322 (Linking). DOI: 10.1007/s11882-011-0199-2. PMID: 21523372.
- Brockow, K. (2012). „Mastzellen: Effektorzellen IgE-vermittelter Allergien: Serie "Das kleine 1 x 1 der Immunologie — Teil 4“. In: *Allergo Journal* 21.8, S. 468–469. ISSN: 0941-8849, 2195-6405. DOI: 10.1007/s15007-012-0442-8. URL: <http://link.springer.com/10.1007/s15007-012-0442-8> (besucht am 04.05.2020).
- Brockow, K., C. Akin, M. Huber, L. M. Scott, L. B. Schwartz und D. D. Metcalfe (2002). „Levels of Mast-Cell Growth Factors in Plasma and in Suction Skin Blister Fluid in Adults with Mastocytosis: Correlation with Dermal Mast-Cell Numbers and Mast-Cell Tryptase“. In: *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 109.1, S. 82–88. ISSN: 0091-6749. DOI: 10.1067/mai.2002.120524. pmid: 11799370.
- Burd, P. R., H. W. Rogers, J. R. Gordon, C. A. Martin, S. Jayaraman, S. D. Wilson, A. M. Dvorak, S. J. Galli und M. E. Dorf (1989). „Interleukin 3-Dependent and -Independent

- Mast Cells Stimulated with IgE and Antigen Express Multiple Cytokines“. In: *Journal of Experimental Medicine* 170.1, S. 245–257. ISSN: 0022-1007 (Print) 0022-1007 (Linking). DOI: 10.1084/jem.170.1.245. PMID: 2473161.
- Buttner, C., B. M. Henz, P. Welker, N. T. Sepp und J. Grabbe (1998). „Identification of Activating C-Kit Mutations in Adult-, but Not in Childhood-Onset Indolent Mastocytosis: A Possible Explanation for Divergent Clinical Behavior“. In: *Journal of Investigative Dermatology* 111.6, S. 1227–1231. ISSN: 0022-202X (Print) 0022-202X (Linking). DOI: 10.1046/j.1523-1747.1998.00414.x. PMID: 9856847.
- Cerroni, L., C. Garbe, D. Metze, H. Kutzner und H. Kerl, Hrsg. (2016). *Histopathologie der Haut*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. ISBN: 978-3-662-45132-8. DOI: 10.1007/978-3-662-45133-5. URL: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-662-45133-5> (besucht am 10.04.2020).
- Chisholm, K. M., J. D. Merker, J. R. Gotlib, G. Gitana, M. Lefterova, J. L. Zehnder, T. I. George, D. A. Arber und R. S. Ohgami (2015). „Mast Cells in Systemic Mastocytosis Have Distinctly Brighter CD45 Expression by Flow Cytometry“. In: *American Journal of Clinical Pathology* 143.4, S. 527–534. ISSN: 1943-7722 (Electronic) 0002-9173 (Linking). DOI: 10.1309/AJCPZ3J4GEEYIRRA. PMID: 25780004.
- Cho, S. H., C. H. Woo, S. B. Yoon und J. H. Kim (2004). „Protein Kinase Cdelta Functions Downstream of Ca<sup>2+</sup> Mobilization in FcεRI Signaling to Degranulation in Mast Cells“. In: *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 114.5, S. 1085–1092. ISSN: 0091-6749 (Print) 0091-6749 (Linking). DOI: 10.1016/j.jaci.2004.07.035. PMID: 15536414.
- Cohen, S. S., S. Skovbo, H. Vestergaard, T. Kristensen, M. Moller, C. Bindselev-Jensen, J. P. Fryzek und S. Broesby-Olsen (2014). „Epidemiology of Systemic Mastocytosis in Denmark“. In: *British Journal of Haematology* 166.4, S. 521–528. ISSN: 1365-2141 (Electronic) 0007-1048 (Linking). DOI: 10.1111/bjh.12916. PMID: 24761987.
- Da Silva, E. Z., M. C. Jamur und C. Oliver (2014). „Mast Cell Function: A New Vision of an Old Cell“. In: *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 62.10, S. 698–738. ISSN: 1551-5044 (Electronic) 0022-1554 (Linking). DOI: 10.1369/0022155414545334. PMID: 25062998.
- Dawicki, W. und J. S. Marshall (2007). „New and Emerging Roles for Mast Cells in Host Defence“. In: *Current Opinion in Immunology* 19.1, S. 31–38. ISSN: 0952-7915 (Print) 0952-7915 (Linking). DOI: 10.1016/j.coi.2006.11.006. PMID: 17126541.
- Dougherty, R. H., S. S. Sidhu, K. Raman, M. Solon, O. D. Solberg, G. H. Caughey, P. G. Woodruff und J. V. Fahy (2010). „Accumulation of Intraepithelial Mast Cells with a Unique Protease Phenotype in T(H)2-High Asthma“. In: *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 125.5, 1046–1053 e1048. ISSN: 1097-6825 (Electronic) 0091-6749 (Linking). DOI: 10.1016/j.jaci.2010.03.003. PMID: 20451039.

- Dvorak, A. M., R. P. Schleimer und L. M. Lichtenstein (1987). „Morphologic Mast Cell Cycles“. In: *Cellular Immunology* 105.1, S. 199–204. ISSN: 0008-8749 (Print) 0008-8749 (Linking). PMID: 2434250.
- Ehrlich, P. (1879). „Beiträge Zur Kenntniss Der Granulirten Bindegewebszellen Und Der Eosinophilen Leukocythen.“ In: *Verhandlungen der Berliner physiologischen Gesellschaft*, S. 166–169.
- Escribano, L., I. Alvarez-Twose, L. Sanchez-Munoz, A. Garcia-Montero, R. Nunez, J. Almeida, M. Jara-Acevedo, C. Teodosio, M. Garcia-Cosio, C. Bellas und A. Orfao (2009). „Prognosis in Adult Indolent Systemic Mastocytosis: A Long-Term Study of the Spanish Network on Mastocytosis in a Series of 145 Patients“. In: *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 124.3, S. 514–521. ISSN: 1097-6825 (Electronic) 0091-6749 (Linking). DOI: 10.1016/j.jaci.2009.05.003. PMID: 19541349.
- Escribano, L., A. Orfao, B. Diaz-Agustin, J. Villarrubia, C. Cervero, A. Lopez, M. A. Marcos, C. Bellas, S. Fernandez-Canadas, M. Cuevas, A. Sanchez, J. L. Velasco, J. L. Navarro und J. F. Miguel (1998). „Indolent Systemic Mast Cell Disease in Adults: Immunophenotypic Characterization of Bone Marrow Mast Cells and Its Diagnostic Implications“. In: *Blood* 91.8, S. 2731–2736. ISSN: 0006-4971 (Print) 0006-4971 (Linking). PMID: 9531582.
- Fodinger, M., G. Fritsch, K. Winkler, W. Emminger, G. Mitterbauer, H. Gadner, P. Valent und C. Mannhalter (1994). „Origin of Human Mast Cells: Development from Transplanted Hematopoietic Stem Cells after Allogeneic Bone Marrow Transplantation“. In: *Blood* 84.9, S. 2954–2959. ISSN: 0006-4971 (Print) 0006-4971 (Linking). PMID: 7949167.
- Galli, S. J., J. Kalesnikoff, M. A. Grimbaldston, A. M. Piliponsky, C. M. Williams und M. Tsai (2005). „Mast Cells as Tunable Effector and Immunoregulatory Cells: Recent Advances“. In: *Annual Review of Immunology, Vol 29* 23, S. 749–786. ISSN: 0732-0582 (Print) 0732-0582 (Linking). DOI: 10.1146/annurev.immunol.21.120601.141025. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15771585> <http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.immunol.21.120601.141025>.
- Galli, S. J., S. Nakae und M. Tsai (2005). „Mast Cells in the Development of Adaptive Immune Responses“. In: *Nature Immunology* 6.2, S. 135–142. ISSN: 1529-2908 (Print) 1529-2908 (Linking). DOI: 10.1038/ni1158. PMID: 15662442.
- Garcia-Montero, A. C., M. Jara-Acevedo, C. Teodosio, M. L. Sanchez, R. Nunez, A. Prados, I. Aldanondo, L. Sanchez, M. Dominguez, L. M. Botana, F. Sanchez-Jimenez, K. Sotlar, J. Almeida, L. Escribano und A. Orfao (2006). „KIT Mutation in Mast Cells and Other Bone Marrow Hematopoietic Cell Lineages in Systemic Mast Cell Disorders: A Prospective Study of the Spanish Network on Mastocytosis (REMA) in a Series of 113 Patients“. In: *Blood* 108.7, S. 2366–2372. ISSN: 0006-4971 (Print) 0006-4971 (Linking). DOI: 10.1182/blood-2006-04-015545. PMID: 16741248.
- Garriga, M. M., M. M. Friedman und D. D. Metcalfe (1988). „A Survey of the Number and Distribution of Mast Cells in the Skin of Patients with Mast Cell Disorders“. In: *Journal of*

- Allergy and Clinical Immunology* 82 (3 Pt 1), S. 425–432. ISSN: 0091-6749 (Print) 0091-6749 (Linking). PMID: 3170991.
- Gilfillan, A. M., R. D. Peavy und D. D. Metcalfe (2009). „Amplification Mechanisms for the Enhancement of Antigen-Mediated Mast Cell Activation“. In: *Immunologic Research* 43.1-3, S. 15–24. ISSN: 0257-277X (Print) 0257-277X (Linking). DOI: 10.1007/s12026-008-8046-9. PMID: 18827981.
- Goodarzi, K., M. Goodarzi, A. M. Tager, A. D. Luster und U. H. von Andrian (2003). „Leukotriene B4 and BLT1 Control Cytotoxic Effector T Cell Recruitment to Inflamed Tissues“. In: *Nature Immunology* 4.10, S. 965–973. ISSN: 1529-2908 (Print) 1529-2908 (Linking). DOI: 10.1038/ni972. PMID: 12949533.
- Gurish, M. F., P. J. Bryce, H. Tao, A. B. Kisselgof, E. M. Thornton, H. R. Miller, D. S. Friend und H. C. Oettgen (2004). „IgE Enhances Parasite Clearance and Regulates Mast Cell Responses in Mice Infected with *Trichinella Spiralis*“. In: *Journal of Immunology* 172.2, S. 1139–1145. ISSN: 0022-1767 (Print) 0022-1767 (Linking). DOI: 10.4049/jimmunol.172.2.1139. PMID: 14707089.
- Hallgren, J. und M. F. Gurish (2007). „Pathways of Murine Mast Cell Development and Trafficking: Tracking the Roots and Routes of the Mast Cell“. In: *Immunological Reviews* 217, S. 8–18. ISSN: 0105-2896 (Print) 0105-2896 (Linking). DOI: 10.1111/j.1600-065X.2007.00502.x. PMID: 17498048.
- Hantschke, M. (2016). „Immunhistologische Techniken“. In: *Histopathologie der Haut: mit 773 Abbildungen und 84 Tabellen*. Hrsg. von L. Cerroni, C. Garbe, D. Metzger, H. Kutzner und H. Kerl. 2. Auflage. Springer Reference Medizin. Berlin Heidelberg: Springer, S.26–33. ISBN: 978-3-662-45132-8 978-3-662-45134-2 978-3-662-45133-5.
- Hartmann, K., L. Escribano, C. Grattan, K. Brockow, M. C. Carter, I. Alvarez-Twose, A. Matito, S. Broesby-Olsen, F. Siebenhaar, M. Lange, M. Niedoszytko, M. Castells, J. N. G. Oude Elberink, P. Bonadonna, R. Zanotti, J. L. Hornick, A. Torrelo, J. Grabbe, A. Rabenhorst, B. Nedoszytko, J. H. Butterfield, J. Gotlib, A. Reiter, D. Radia, O. Hermine, K. Sotlar, T. I. George, T. K. Kristensen, H. C. Kluijn-Nelemans, S. Yavuz, H. Hagglund, W. R. Sperr, L. B. Schwartz, M. Triggiani, M. Maurer, G. Nilsson, H. P. Horny, M. Arock, A. Orfao, D. D. Metcalfe, C. Akin und P. Valent (2016). „Cutaneous Manifestations in Patients with Mastocytosis: Consensus Report of the European Competence Network on Mastocytosis; the American Academy of Allergy, Asthma & Immunology; and the European Academy of Allergology and Clinical Immunology“. In: *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 137.1, S. 35–45. ISSN: 1097-6825 (Electronic) 0091-6749 (Linking). DOI: 10.1016/j.jaci.2015.08.034. PMID: 26476479.
- Hill, P. B., A. J. MacDonald, E. M. Thornton, G. F. Newlands, S. J. Galli und H. R. Miller (1996). „Stem Cell Factor Enhances Immunoglobulin E-Dependent Mediator Release from Cultured Rat Bone Marrow-Derived Mast Cells: Activation of Previously Unresponsive Cells Demonstrated by a Novel ELISPOT Assay“. In: *Immunology* 87.2, S. 326–333. ISSN: 0019-

- 2805 (Print) 0019-2805 (Linking). DOI: 10.1046/j.1365-2567.1996.455545.x. PMID: 8698398.
- Hollmann, T. J., T. Brenn und J. L. Hornick (2008). „CD25 Expression on Cutaneous Mast Cells from Adult Patients Presenting with Urticaria Pigmentosa Is Predictive of Systemic Mastocytosis“. In: *American Journal of Surgical Pathology* 32.1, S. 139–145. ISSN: 0147-5185 (Print) 0147-5185 (Linking). DOI: 10.1097/PAS.0b013e3180ca9a02. PMID: 18162781.
- Holmgren H., W. O. (1937). „Beitrag Zur Kenntnis Der Chemie Und Funktion Der Ehrlichschen Mastzellen“. In: *Z. Mikrosk. Anat. Forsch* 42, S. 242–278.
- Horan, R. F. und K. F. Austen (1991). „Systemic Mastocytosis: Retrospective Review of a Decade’s Clinical Experience at the Brigham and Women’s Hospital“. In: *Journal of Investigative Dermatology* 96 (3 Suppl), 5S–13S, 5S–13S, 60S–65S. ISSN: 1523-1747 (Electronic) 0022-202X (Linking). DOI: 10.1111/1523-1747.ep12468899. PMID: 16799602.
- Huang, A., N. Fiadorchanka, K. Brar, J. L. Balderacchi und S. A. Glick (2017). „In Utero Presentation of Aggressive Systemic Mastocytosis in a Neonate“. In: *British Journal of Dermatology* 177.5, S. 1439–1441. ISSN: 1365-2133 (Electronic) 0007-0963 (Linking). DOI: 10.1111/bjd.15506. PMID: 28369700.
- Human Protein Atlas (2019a). *CD117 Molecule*. URL: <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000157404-KIT> (besucht am 28.05.2019).
- Human Protein Atlas (2019b). *CD14 Molecule*. URL: <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000170458-CD14> (besucht am 28.05.2019).
- Human Protein Atlas (2019c). *CD2 Molecule*. URL: <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000116824-CD2> (besucht am 28.05.2019).
- Human Protein Atlas (2019d). *CD20 Molecule*. URL: <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000156738-MS4A1> (besucht am 28.05.2019).
- Human Protein Atlas (2019e). *CD25 Molecule*. URL: <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000134460-IL2RA> (besucht am 28.05.2019).
- Human Protein Atlas (2019f). *CD3 Molecule*. URL: <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000167286-CD3D> (besucht am 28.05.2019).
- Human Protein Atlas (2019g). *CD30 Molecule*. URL: <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000120949-TNFRSF8> (besucht am 28.05.2019).
- Human Protein Atlas (2019h). *CD4 Molecule*. URL: <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000010610-CD4> (besucht am 28.05.2019).
- Human Protein Atlas (2019i). *CD45 Molecule*. URL: <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000081237-PTPRC> (besucht am 28.05.2019).
- Human Protein Atlas (2019j). *CD68 Molecule*. URL: <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000129226-CD68> (besucht am 28.05.2019).

- Human Protein Atlas (2019k). *CD79a Molecule*. URL: <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000105369-CD79A> (besucht am 28.05.2019).
- Human Protein Atlas (2019l). *CD8 Molecule*. URL: <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000153563-CD8A> (besucht am 28.05.2019).
- Human Protein Atlas (2019m). *Tryptase Alpha/Beta 1*. URL: <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000172236-TPSAB1> (besucht am 28.05.2019).
- Hundley, T. R., A. M. Gilfillan, C. Tkaczyk, M. V. Andrade, D. D. Metcalfe und M. A. Beaven (2004). „Kit and FcepsilonRI Mediate Unique and Convergent Signals for Release of Inflammatory Mediators from Human Mast Cells“. In: *Blood* 104.8, S. 2410–2417. ISSN: 0006-4971 (Print) 0006-4971 (Linking). DOI: 10.1182/blood-2004-02-0631. PMID: 15217825.
- Irani, A. A., M. M. Garriga, D. D. Metcalfe und L. B. Schwartz (1990). „Mast Cells in Cutaneous Mastocytosis: Accumulation of the MCTC Type“. In: *Clinical and Experimental Allergy* 20.1, S. 53–58. ISSN: 0954-7894 (Print) 0954-7894 (Linking). DOI: 10.1111/j.1365-2222.1990.tb02775.x. PMID: 2310982.
- Irani, A. A., N. M. Schechter, S. S. Craig, G. DeBlois und L. B. Schwartz (1986). „Two Types of Human Mast Cells That Have Distinct Neutral Protease Compositions“. In: *Proceedings of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America* 83.12, S. 4464–4468. ISSN: 0027-8424 (Print) 0027-8424 (Linking). DOI: 10.1073/pnas.83.12.4464. PMID: 3520574.
- Irani, A. M., S. S. Craig, G. DeBlois, C. O. Elson, N. M. Schechter und L. B. Schwartz (1987). „Deficiency of the Tryptase-Positive, Chymase-Negative Mast Cell Type in Gastrointestinal Mucosa of Patients with Defective T Lymphocyte Function“. In: *Journal of Immunology* 138.12, S. 4381–4386. ISSN: 0022-1767 (Print) 0022-1767 (Linking). PMID: 3295046.
- Ishizaka, K. und T. Ishizaka (1967). „Identification of Gamma-E-Antibodies as a Carrier of Reaginic Activity“. In: *Journal of Immunology* 99.6, S. 1187–1198. ISSN: 0022-1767 (Print) 0022-1767 (Linking). PMID: 4168663.
- Ishizaka, T., R. De Bernardo, H. Tomioka, L. M. Lichtenstein und K. Ishizaka (1972). „Identification of Basophil Granulocytes as a Site of Allergic Histamine Release“. In: *Journal of Immunology* 108.4, S. 1000–1008. ISSN: 0022-1767 (Print) 0022-1767 (Linking). PMID: 4112412.
- Ishizaka, T., K. Ishizaka, S. G. Johansson und H. Bennich (1969). „Histamine Release from Human Leukocytes by Anti-Gamma E Antibodies“. In: *Journal of Immunology* 102.4, S. 884–892. ISSN: 0022-1767 (Print) 0022-1767 (Linking). PMID: 4181251.
- Ishizaka, T., K. Ishizaka und H. Tomioka (1972). „Release of Histamine and Slow Reacting Substance of Anaphylaxis (SRS-A) by IgE-Anti-IgE Reactions on Monkey Mast Cells“. In: *Journal of Immunology* 108.2, S. 513–520. ISSN: 0022-1767 (Print) 0022-1767 (Linking). PMID: 4114955.

- Ishizaka, T., A. R. Sterk und K. Ishizaka (1979). „Demonstration of Fcγ Receptors on Human Basophil Granulocytes“. In: *Journal of Immunology* 123.2, S. 578–583. ISSN: 0022-1767 (Print) 0022-1767 (Linking). PMID: 88477.
- Ishizaka, T., H. Tomioka und K. Ishizaka (1971). „Degranulation of Human Basophil Leukocytes by Anti-Gamma E Antibody“. In: *Journal of Immunology* 106.3, S. 705–710. ISSN: 0022-1767 (Print) 0022-1767 (Linking). PMID: 4100689.
- Jamur, M. C., A. N. Moreno, L. F. Mello, D. A. Souza Junior, M. R. Campos, M. V. Pastor, A. C. Grodzki, D. C. Silva und C. Oliver (2010). „Mast Cell Repopulation of the Peritoneal Cavity: Contribution of Mast Cell Progenitors versus Bone Marrow Derived Committed Mast Cell Precursors“. In: *BMC immunology* 11, S. 32. ISSN: 1471-2172 (Electronic) 1471-2172 (Linking). DOI: 10.1186/1471-2172-11-32. PMID: 20576124.
- Jamur, M. C. und I. Vugman (1988). „Rat Peritoneal Mast Cell Regranulation and Acid Phosphatase and Trimetaphosphatase Activity Induced after Stimulation by 48/80. A Fluorescence, Ultrastructural, and Cytochemical Study“. In: *Cellular and Molecular Biology* 34.3, S. 231–237. PMID: 2850107.
- Johansson, S. G. und H. Bennich (1967). „Immunological Studies of an Atypical (Myeloma) Immunoglobulin“. In: *Immunology* 13.4, S. 381–394. ISSN: 0019-2805 (Print) 0019-2805 (Linking). PMID: 4168094.
- Kettelhut, B. V. und D. D. Metcalfe (1994). „Pediatric Mastocytosis“. In: *Annals of Allergy* 73.3, S. 197–202, 197–202. ISSN: 0003-4738 (Print) 0003-4738 (Linking). PMID: 8092552.
- Kiernan, J. A. (1979). „Production and Life Span of Cutaneous Mast Cells in Young Rats“. In: *Journal of Anatomy* 128 (Pt 2), S. 225–238. ISSN: 0021-8782 (Print) 0021-8782 (Linking). PMID: 438085.
- Kitamura, Y. (1989). „Heterogeneity of Mast Cells and Phenotypic Change between Subpopulations“. In: *Annual Review of Immunology, Vol 29* 7, S. 59–76. ISSN: 0732-0582 (Print) 0732-0582 (Linking). DOI: 10.1146/annurev.iy.07.040189.000423. PMID: 2653378.
- Kitamura, Y., T. Kasugai, N. Arizono und H. Matsuda (1993). „Development of Mast Cells and Basophils: Processes and Regulation Mechanisms“. In: *American Journal of The Medical Sciences* 306.3, S. 185–191. ISSN: 0002-9629 (Print) 0002-9629 (Linking). PMID: 8128982.
- Kitamura, Y., M. Shimada, K. Hatanaka und Y. Miyano (1977). „Development of Mast Cells from Grafted Bone Marrow Cells in Irradiated Mice“. In: *Nature* 268.5619, S. 442–443. ISSN: 0028-0836 (Print) 0028-0836 (Linking). PMID: 331117.
- Kitamura, Y., T. Sonoda, T. Nakano, C. Hayashi und H. Asai (1985). „Differentiation Processes of Connective Tissue Mast Cells in Living Mice“. In: *International archives of allergy and applied immunology* 77.1-2, S. 144–150. ISSN: 0020-5915 (Print) 0020-5915 (Linking). PMID: 3891630.

- Kitamura, Y., M. Yokoyama, H. Matsuda, T. Ohno und K. J. Mori (1981). „Spleen Colony-Forming Cell as Common Precursor for Tissue Mast Cells and Granulocytes“. In: *Nature* 291.5811, S. 159–160. ISSN: 0028-0836 (Print) 0028-0836 (Linking). PMID: 6112711.
- Kovarova, M., P. Tolar, R. Arudchandran, L. Draberova, J. Rivera und P. Draber (2001). „Structure-Function Analysis of Lyn Kinase Association with Lipid Rafts and Initiation of Early Signaling Events after Fcepsilon Receptor I Aggregation“. In: *Molecular and Cellular Biology* 21.24, S. 8318–8328. ISSN: 0270-7306 (Print) 0270-7306 (Linking). DOI: 10.1128/MCB.21.24.8318-8328.2001. PMID: 11713268.
- Kramer, H. und G. M. Windrum (1955). „The Metachromatic Staining Reaction“. In: *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 3.3, S. 227–237. ISSN: 0022-1554 (Print) 0022-1554 (Linking). DOI: 10.1177/3.3.227. PMID: 14381610.
- Kristensen, T., S. Broesby-Olsen, H. Vestergaard, C. Bindslev-Jensen und M. B. Moller (2013). „KIT D816V Mutation-Positive Cell Fractions in Lesional Skin Biopsies from Adults with Systemic Mastocytosis“. In: *Dermatology* 226.3, S. 233–237. ISSN: 1421-9832 (Electronic) 1018-8665 (Linking). DOI: 10.1159/000349986. PMID: 23774045.
- Kristensen, T., H. Vestergaard und M. B. Moller (2011). „Improved Detection of the KIT D816V Mutation in Patients with Systemic Mastocytosis Using a Quantitative and Highly Sensitive Real-Time qPCR Assay“. In: *Journal of Molecular Diagnostics* 13.2, S. 180–188. ISSN: 1943-7811 (Electronic) 1525-1578 (Linking). DOI: 10.1016/j.jmoldx.2010.10.004. PMID: 21354053.
- Kuint, J., B. Bielorai, D. Gilat, E. Birenbaum, N. Amariglio und G. Rechavi (1999). „C-Kit Activating Mutation in a Neonate with in-Utero Presentation of Systemic Mastocytosis Associated with Myeloproliferative Disorder“. In: *British Journal of Haematology* 106.3, S. 838–839. ISSN: 0007-1048 (Print) 0007-1048 (Linking). PMID: 10468886.
- Lachapelle, J., B. Moroz und V. H. Nguyen (2012). „Cutaneous Mastocytosis with Atypical Mast Cells and Giant Cytoplasmic Granules“. In: *Journal of Cutaneous Pathology* 39.8, S. 773–776. ISSN: 1600-0560 (Electronic) 0303-6987 (Linking). DOI: 10.1111/j.1600-0560.2012.01905.x. PMID: 22725660.
- Lange, M., A. Zawrocki, B. Nedoszytko, B. Wasag, M. Nedoszytko, E. Jassem, R. Nowicki, M. A. Zmijewski und W. Biernat (2014). „Does the Aberrant Expression of CD2 and CD25 by Skin Mast Cells Truly Correlate with Systemic Involvement in Patients Presenting with Mastocytosis in the Skin?“ In: *International Archives of Allergy and Immunology* 165.2, S. 104–110. ISSN: 1423-0097 (Electronic) 1018-2438 (Linking). DOI: 10.1159/000368799. PMID: 25402852.
- Li, C. Y. (2001). „Diagnosis of Mastocytosis: Value of Cytochemistry and Immunohistochemistry“. In: *Leukemia Research* 25.7, S. 537–541. ISSN: 0145-2126 (Print) 0145-2126 (Linking). PMID: 11377678.

- Li, W. V., S. B. Kapadia, E. Sonmez-Alpan und S. H. Swerdlow (1996). „Immunohistochemical Characterization of Mast Cell Disease in Paraffin Sections Using Tryptase, CD68, Myeloperoxidase, Lysozyme, and CD20 Antibodies“. In: *Modern Pathology* 9.10, S. 982–988. ISSN: 0893-3952 (Print) 0893-3952 (Linking). PMID: 8902835.
- Liaw, A. und M. Wiener (2002). „Classification and Regression by randomForest“. In: *R News* 2.3, S. 18–22. URL: <https://CRAN.R-project.org/doc/Rnews/>.
- Longley B. J., J., D. D. Metcalfe, M. Tharp, X. Wang, L. Tyrrell, S. Z. Lu, D. Heitjan und Y. Ma (1999). „Activating and Dominant Inactivating C-KIT Catalytic Domain Mutations in Distinct Clinical Forms of Human Mastocytosis“. In: *Proceedings of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America* 96.4, S. 1609–1614. ISSN: 0027-8424 (Print) 0027-8424 (Linking). DOI: 10.1073/pnas.96.4.1609. PMID: 9990072.
- Lorentz, A. und S. C. Bischoff (2001). „Regulation of Human Intestinal Mast Cells by Stem Cell Factor and IL-4“. In: *Immunological Reviews* 179, S. 57–60. ISSN: 0105-2896 (Print) 0105-2896 (Linking). PMID: 11292028.
- Ludolph-Hauser, D., F. Ruëff, C. P. Sommerhoff und B. Przybilla (1999). „[Tryptase, a marker for the activation and localization of mast cells]“. In: *Der Hautarzt; Zeitschrift Fur Dermatologie, Venerologie, Und Verwandte Gebiete* 50.8, S. 556–561. ISSN: 0017-8470. DOI: 10.1007/s001050050958. pmid: 10460298.
- Lundequist, A. und G. Pejler (2011). „Biological Implications of Preformed Mast Cell Mediators“. In: *Cellular and Molecular Life Sciences* 68.6, S. 965–975. ISSN: 1420-9071 (Electronic) 1420-682X (Linking). DOI: 10.1007/s00018-010-0587-0. PMID: 21069421.
- Marrero Aleman, G., C. El Habr, D. Islas Norris, T. Montenegro Damaso, L. Borrego und O. P. Sanguenza (2017). „Cutaneous Mastocytosis with Atypical Mast Cells in a 7-Year-Old Girl“. In: *American Journal of Dermatopathology* 39.4, S. 310–312. ISSN: 1533-0311 (Electronic) 0193-1091 (Linking). DOI: 10.1097/DAD.0000000000000768. PMID: 28328617.
- Marshall, J. S. (2004). „Mast-Cell Responses to Pathogens“. In: *Nature Reviews Immunology* 4.10, S. 787–799. ISSN: 1474-1733 (Print) 1474-1733 (Linking). DOI: 10.1038/nri1460. PMID: 15459670.
- McNeil, B. D., P. Pundir, S. Meeker, L. Han, B. J. Udem, M. Kulka und X. Dong (2015). „Identification of a Mast-Cell-Specific Receptor Crucial for Pseudo-Allergic Drug Reactions“. In: *Nature* 519.7542, S. 237–241. ISSN: 1476-4687. DOI: 10.1038/nature14022. pmid: 25517090.
- Meni, C., J. Bruneau, S. Georgin-Lavialle, L. Le Sache de Peuffeilhoux, G. Damaj, S. Hadj-Rabia, S. Fraitag, P. Dubreuil, O. Hermine und C. Bodemer (2015). „Paediatric Mastocytosis: A Systematic Review of 1747 Cases“. In: *British Journal of Dermatology* 172.3, S. 642–651. ISSN: 1365-2133 (Electronic) 0007-0963 (Linking). DOI: 10.1111/bjd.13567. PMID: 25662299.

- Metcalf, D. D. (2008). „Mast Cells and Mastocytosis“. In: *Blood* 112.4, S. 946–956. ISSN: 1528-0020 (Electronic) 0006-4971 (Linking). DOI: 10.1182/blood-2007-11-078097. PMID: 18684881.
- Metcalf, D. D., D. Baram und Y. A. Mekori (1997). „Mast Cells“. In: *Physiological Reviews* 77.4, S. 1033–1079. ISSN: 0031-9333 (Print) 0031-9333 (Linking). DOI: 10.1152/physrev.1997.77.4.1033. PMID: 9354811.
- Metcalf, D. D. und J. A. Boyce (2006). „Mast Cell Biology in Evolution“. In: *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 117.6, S. 1227–1229. ISSN: 0091-6749 (Print) 0091-6749 (Linking). DOI: 10.1016/j.jaci.2006.03.031. PMID: 16750978.
- Metzger, H. (1992). „The Receptor with High Affinity for IgE“. In: *Immunological Reviews* 125, S. 37–48. ISSN: 0105-2896 (Print) 0105-2896 (Linking). PMID: 1532373.
- Mihm, M. C., W. H. Clark, R. J. Reed und M. G. Caruso (1973). „Mast Cell Infiltrates of the Skin and the Mastocytosis Syndrome“. In: *Human Pathology* 4.2, S. 231–239. ISSN: 0046-8177 (Print) 0046-8177 (Linking). DOI: 10.1016/s0046-8177(73)80010-3. PMID: 4196238.
- Milborrow, S. (2018). *Rpart.Plot: Plot 'rpart' Models: An Enhanced Version of 'Plot.Rpart'*. URL: <https://CRAN.R-project.org/package=rpart.plot>.
- Monnier, J., S. Georgin-Lavialle, D. Canioni, L. Lhermitte, M. Soussan, M. Arock, J. Bruneau, P. Dubreuil, C. Bodemer, M.-O. Chandesris, O. Lortholary, O. Hermine und G. Damaj (2016). „Mast Cell Sarcoma: New Cases and Literature Review“. In: *Oncotarget* 7.40, S. 66299–66309. ISSN: 1949-2553. DOI: 10.18632/oncotarget.11812. pmid: 27602777.
- Morgado, J., L. Sánchez-Muñoz, A. Matito, M. Mollejo, L. Escribano und I. Alvarez-Twose (2014). „Patterns of Expression of CD25 and CD30 on Skin Mast Cells in Pediatric Mastocytosis“. In: *Journal of Contemporary Immunology* 1, S. 46–56. DOI: 10.7726/jci.2014.1006.
- Nagata, H., A. S. Worobec, C. K. Oh, B. A. Chowdhury, S. Tannenbaum, Y. Suzuki und D. D. Metcalfe (1995). „Identification of a Point Mutation in the Catalytic Domain of the Protooncogene C-Kit in Peripheral Blood Mononuclear Cells of Patients Who Have Mastocytosis with an Associated Hematologic Disorder“. In: *Proceedings of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America* 92.23, S. 10560–10564. ISSN: 0027-8424 (Print) 0027-8424 (Linking). DOI: 10.1073/pnas.92.23.10560. PMID: 7479840.
- Oliver, J., F. Bloom und C. Mangieri (1947). „On the Origin of Heparin : An Examination of the Heparin Content and the Specific Cytoplasmic Particles of Neoplastic Mast Cells“. In: *Journal of Experimental Medicine* 86.2, S. 107–116. ISSN: 0022-1007 (Print) 0022-1007 (Linking). DOI: 10.1084/jem.86.2.107. PMID: 19871658.
- Orfao, A., A. C. Garcia-Montero, L. Sanchez, L. Escribano und Rema (2007). „Recent Advances in the Understanding of Mastocytosis: The Role of KIT Mutations“. In: *British Journal of Haematology* 138.1, S. 12–30. ISSN: 0007-1048 (Print) 0007-1048 (Linking). DOI: 10.1111/j.1365-2141.2007.06619.x. PMID: 17555444.

- Orpha.net (2019). *Mastozytose (ORPHA:98292)*. URL: [https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/Disease\\_Search.php?lng=DE&data\\_id=13309&Disease\\_Disease\\_Search\\_diseaseGroup=mastozytose&Disease\\_Disease\\_Search\\_diseaseType=Pat&Krankheite\(n\)/Krankheitsgruppe=Mastozytose&title=Mastozytose&search=Disease\\_Search\\_Simple](https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/Disease_Search.php?lng=DE&data_id=13309&Disease_Disease_Search_diseaseGroup=mastozytose&Disease_Disease_Search_diseaseType=Pat&Krankheite(n)/Krankheitsgruppe=Mastozytose&title=Mastozytose&search=Disease_Search_Simple).
- Pardanani, A. (2015). „Systemic Mastocytosis in Adults: 2015 Update on Diagnosis, Risk Stratification, and Management“. In: *American Journal of Hematology* 90.3, S. 250–262. ISSN: 1096-8652 (Electronic) 0361-8609 (Linking). DOI: 10.1002/ajh.23931. PMID: 25688753.
- Prichard, J. W. (2014). „Overview of Automated Immunohistochemistry“. In: *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* 138.12, S. 1578–1582. ISSN: 1543-2165 (Electronic) 0003-9985 (Linking). DOI: 10.5858/arpa.2014-0083-RA. PMID: 25427039.
- Rao, K. N. und M. A. Brown (2008). „Mast Cells: Multifaceted Immune Cells with Diverse Roles in Health and Disease“. In: *Annals of The New York Academy Of Sciences* 1143, S. 83–104. ISSN: 1749-6632 (Electronic) 0077-8923 (Linking). DOI: 10.1196/annals.1443.023. PMID: 19076346.
- Ribatti, D. (2018). „The Staining of Mast Cells: A Historical Overview“. In: *International Archives of Allergy and Immunology* 176.1, S. 55–60. ISSN: 1423-0097 (Electronic) 1018-2438 (Linking). DOI: 10.1159/000487538. PMID: 29597213.
- Riley, J. F. und G. B. West (1953). „The Presence of Histamine in Tissue Mast Cells“. In: *The Journal of physiology* 120.4, S. 528–537. ISSN: 0022-3751 (Print) 0022-3751 (Linking). PMID: 13070225.
- Rocha e Silva, M., A. E. Scroggie und e. al. (1947). „Liberation of Histamine and Heparin by Peptone from the Isolated Dog's Liver“. In: *Proceedings of The Society For Experimental Biology and Medicine* 64.2, S. 141–146. ISSN: 0037-9727 (Print) 0037-9727 (Linking). PMID: 20287359.
- Rothe, M. J., M. Nowak und F. A. Kerdel (1990). „The Mast Cell in Health and Disease“. In: *Journal of the American Academy of Dermatology* 23 (4 Pt 1), S. 615–624. ISSN: 0190-9622. DOI: 10.1016/0190-9622(90)70264-i. pmid: 1699980.
- Russano de Paiva Silva, G., E. Tournier, L. O. Sarian, C. Bulai-Livideanu, G. Delsol, L. Lamant, J. Vassallo, P. Brousset und C. Laurent (2018). „Prevalence of CD30 Immunostaining in Neoplastic Mast Cells: A Retrospective Immunohistochemical Study“. In: *Medicine* 97.21, e10642. ISSN: 1536-5964 (Electronic) 0025-7974 (Linking). DOI: 10.1097/MD.0000000000010642. PMID: 29794740.
- Ryan, J. J., M. Kashyap, D. Bailey, S. Kennedy, K. Speiran, J. Brenzovich, B. Barnstein, C. Oskeritzian und G. Gomez (2007). „Mast Cell Homeostasis: A Fundamental Aspect of Allergic Disease“. In: *Critical Reviews in Immunology* 27.1, S. 15–32. ISSN: 1040-8401 (Print) 1040-8401 (Linking). PMID: 17430094.

- Schwartz, L. B. (2006). „Analysis of MC(T) and MC(TC) Mast Cells in Tissue“. In: *Yeast Genetic Networks: Methods and Protocols* 315, S. 53–62. ISSN: 1064-3745 (Print) 1064-3745 (Linking). PMID: 16110148.
- Siefert, G. und T. Stöckl (1983). „Die Entdeckung Der Mastzellen Durch Den Freiburger Medizinstudenten Paul Ehrlich“. In: *Medizinhistorisches Journal* 18.3, S. 227–237. ISSN: 00258431. URL: <http://www.jstor.org.eaccess.ub.tum.de/stable/25803747>.
- Sillaber, C., H. Strobl, D. Bevec, L. K. Ashman, J. H. Butterfield, K. Lechner, D. Maurer, P. Bettelheim und P. Valent (1991). „IL-4 Regulates c-Kit Proto-Oncogene Product Expression in Human Mast and Myeloid Progenitor Cells“. In: *Journal of Immunology* 147.12, S. 4224–4228. ISSN: 0022-1767 (Print) 0022-1767 (Linking). PMID: 1721642.
- Siraganian, R. P. (2003). „Mast Cell Signal Transduction from the High-Affinity IgE Receptor“. In: *Current Opinion in Immunology* 15.6, S. 639–646. ISSN: 0952-7915 (Print) 0952-7915 (Linking). PMID: 14630197.
- Sotlar, K., S. Cerny-Reiterer, K. Petat-Dutter, H. Hessel, S. Berezowska, L. Mullauer, P. Valent und H. P. Horny (2011). „Aberrant Expression of CD30 in Neoplastic Mast Cells in High-Grade Mastocytosis“. In: *Modern Pathology* 24.4, S. 585–595. ISSN: 1530-0285 (Electronic) 0893-3952 (Linking). DOI: 10.1038/modpathol.2010.224. PMID: 21186345.
- Tefferi, A., S. Shah, K. K. Reichard, C. A. Hanson und A. Pardanani (2019). „Smoldering Mastocytosis: Survival Comparisons with Indolent and Aggressive Mastocytosis“. In: *American Journal of Hematology* 94.1, E1–E2. ISSN: 1096-8652. DOI: 10.1002/ajh.25302. pmid: 30281840.
- Tharp, M. D., M. J. Glass und J. Seelig L. L. (1988). „Ultrastructural Morphometric Analysis of Lesional Skin: Mast Cells from Patients with Systemic and Nonsystemic Mastocytosis“. In: *Journal of The American Academy of Dermatology* 18 (2 Pt 1), S. 298–306. ISSN: 0190-9622 (Print) 0190-9622 (Linking). DOI: 10.1016/s0190-9622(88)70043-2. PMID: 3346414.
- Theoharides, T. C., P. Valent und C. Akin (2015). „Mast Cells, Mastocytosis, and Related Disorders“. In: *New England Journal of Medicine* 373.2, S. 163–172. ISSN: 1533-4406 (Electronic) 0028-4793 (Linking). DOI: 10.1056/NEJMra1409760. PMID: 26154789.
- Therneau, T. und B. Atkinson (2018). *Rpart: Recursive Partitioning and Regression Trees*. URL: <https://CRAN.R-project.org/package=rpart>.
- Tomioka, H. und K. Ishizaka (1971). „Mechanisms of Passive Sensitization. II. Presence of Receptors for IgE on Monkey Mast Cells“. In: *Journal of Immunology* 107.4, S. 971–978. ISSN: 0022-1767 (Print) 0022-1767 (Linking). PMID: 4999262.
- Tomita, Y., K. Maeda und H. Tagami (1993). „Histamine Stimulates Normal Human Melanocytes in Vitro: One of the Possible Inducers of Hyperpigmentation in Urticaria Pigmentosa“. In: *Journal of Dermatological Science* 6.2, S. 146–154. ISSN: 0923-1811 (Print) 0923-1811 (Linking). PMID: 8274460.

- Toru, H., M. Eguchi, R. Matsumoto, M. Yanagida, J. Yata und T. Nakahata (1998). „Interleukin-4 Promotes the Development of Tryptase and Chymase Double-Positive Human Mast Cells Accompanied by Cell Maturation“. In: *Blood* 91.1, S. 187–195. ISSN: 0006-4971 (Print) 0006-4971 (Linking). PMID: 9414284.
- Toru, H., C. Ra, S. Nonoyama, K. Suzuki, J. Yata und T. Nakahata (1996). „Induction of the High-Affinity IgE Receptor (Fc Epsilon RI) on Human Mast Cells by IL-4“. In: *International Immunology* 8.9, S. 1367–1373. ISSN: 0953-8178 (Print) 0953-8178 (Linking). DOI: 10.1093/intimm/8.9.1367. PMID: 8921414.
- Travis, W. D., C. Y. Li, E. J. Bergstralh, L. T. Yam und R. G. Swee (1988). „Systemic Mast Cell Disease. Analysis of 58 Cases and Literature Review“. In: *Medicine* 67.6, S. 345–368. ISSN: 0025-7974 (Print) 0025-7974 (Linking). PMID: 3054417.
- Uhlen, M., L. Fagerberg, B. M. Hallstrom, C. Lindskog, P. Oksvold, A. Mardinoglu, A. Sivertsson, C. Kampf, E. Sjostedt, A. Asplund, I. Olsson, K. Edlund, E. Lundberg, S. Navani, C. A. Szgyarto, J. Odeberg, D. Djureinovic, J. O. Takanen, S. Hober, T. Alm, P. H. Edqvist, H. Berling, H. Tegel, J. Mulder, J. Rockberg, P. Nilsson, J. M. Schwenk, M. Hamsten, K. von Feilitzen, M. Forsberg, L. Persson, F. Johansson, M. Zwahlen, G. von Heijne, J. Nielsen und F. Ponten (2015). „Proteomics. Tissue-Based Map of the Human Proteome“. In: *Science* 347.6220, S. 1260419. ISSN: 1095-9203 (Electronic) 0036-8075 (Linking). DOI: 10.1126/science.1260419. PMID: 25613900.
- Uzzaman, A., I. Maric, P. Noel, B. V. Kettelhut, D. D. Metcalfe und M. C. Carter (2009). „Pediatric-Onset Mastocytosis: A Long Term Clinical Follow-up and Correlation with Bone Marrow Histopathology“. In: *Pediatric Blood & Cancer* 53.4, S. 629–634. ISSN: 1545-5017 (Electronic) 1545-5009 (Linking). DOI: 10.1002/pbc.22125. PMID: 19526526.
- Valent, P., C. Akin, L. Escribano, M. Fodinger, K. Hartmann, K. Brockow, M. Castells, W. R. Sperr, H. C. Kluin-Nelemans, N. A. Hamdy, O. Lortholary, J. Robyn, J. van Doormaal, K. Sotlar, A. W. Hauswirth, M. Arock, O. Hermine, A. Hellmann, M. Triggiani, M. Nieves-Szytko, L. B. Schwartz, A. Orfao, H. P. Horny und D. D. Metcalfe (2007). „Standards and Standardization in Mastocytosis: Consensus Statements on Diagnostics, Treatment Recommendations and Response Criteria“. In: *European Journal of Clinical Investigation* 37.6, S. 435–453. ISSN: 0014-2972 (Print) 0014-2972 (Linking). DOI: 10.1111/j.1365-2362.2007.01807.x. PMID: 17537151.
- Valent, P., C. Akin und D. D. Metcalfe (2017). „Mastocytosis: 2016 Updated WHO Classification and Novel Emerging Treatment Concepts“. In: *Blood* 129.11, S. 1420–1427. ISSN: 1528-0020 (Electronic) 0006-4971 (Linking). DOI: 10.1182/blood-2016-09-731893. PMID: 28031180.
- Van Doormaal, J. J., S. Arends, K. L. Brunekreeft, V. B. van der Wal, J. Sietsma, P. C. van Voorst Vader, J. N. Oude Elberink, J. C. Kluin-Nelemans, E. van der Veer und J. G. de Monchy (2013). „Prevalence of Indolent Systemic Mastocytosis in a Dutch Region“. In:

- Journal of Allergy and Clinical Immunology* 131.5, 1429–1431 e1421. ISSN: 1097-6825 (Electronic) 0091-6749 (Linking). DOI: 10.1016/j.jaci.2012.10.015. PMID: 23219169.
- Weller, C. L., S. J. Collington, T. Williams und J. R. Lamb (2011). „Mast Cells in Health and Disease“. In: *Clinical science (London, England : 1979)* 120.11, S. 473–484. ISSN: 1470-8736 (Electronic) 0143-5221 (Linking). DOI: 10.1042/CS20100459. PMID: 21320076.
- Wilkinson, B., A. Jones und S. Kossard (1992). „Mast Cell Quantitation by Image Analysis in Adult Mastocytosis and Inflammatory Skin Disorders“. In: *Journal of Cutaneous Pathology* 19.5, S. 366–370. ISSN: 0303-6987 (Print) 0303-6987 (Linking). DOI: 10.1111/j.1600-0560.1992.tb00607.x. PMID: 1282134.
- Williams, G. J. (2011). *Data Mining with Rattle and R: The Art of Excavating Data for Knowledge Discovery*. Use r! Springer. URL: [http://www.amazon.com/gp/product/1441998896/ref=as\\_li\\_qf\\_sp\\_asin\\_tl?ie=UTF8&tag=togaware-20&linkCode=as2&camp=217145&creative=399373&creativeASIN=1441998896](http://www.amazon.com/gp/product/1441998896/ref=as_li_qf_sp_asin_tl?ie=UTF8&tag=togaware-20&linkCode=as2&camp=217145&creative=399373&creativeASIN=1441998896).
- Wing, M. K. C. f. J., S. Weston, A. Williams, C. Keefer, A. Engelhardt, T. Cooper, Z. Mayer, B. Kenkel, t. R. C. Team, M. Benesty, R. Lescarbeau, A. Ziem, L. Scrucca, Y. Tang, C. Candan und T. Hunt. (2018). *Caret: Classification and Regression Training. R Package Version 6.0-80*. URL: <https://CRAN.R-project.org/package=caret>.
- Wolff, K., M. Komar und P. Petzelbauer (2001). „Clinical and Histopathological Aspects of Cutaneous Mastocytosis“. In: *Leukemia Research* 25.7, S. 519–528. ISSN: 0145-2126 (Print) 0145-2126 (Linking). PMID: 11377676.
- Woolhiser, M. R., K. Brockow und D. D. Metcalfe (2004). „Activation of Human Mast Cells by Aggregated IgG through FcγRI: Additive Effects of C3a“. In: *Clinical Immunology (Orlando, Fla.)* 110.2, S. 172–180. ISSN: 1521-6616. DOI: 10.1016/j.clim.2003.11.007. PMID: 15003814.
- Xiang, Z., M. Block, C. Lofman und G. Nilsson (2001). „IgE-Mediated Mast Cell Degranulation and Recovery Monitored by Time-Lapse Photography“. In: *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 108.1, S. 116–121. ISSN: 0091-6749 (Print) 0091-6749 (Linking). DOI: 10.1067/mai.2001.116124. PMID: 11447391.
- Yanagida, M., H. Fukamachi, K. Ohgami, T. Kuwaki, H. Ishii, H. Uzumaki, K. Amano, T. Tokiwa, H. Mitsui, H. Saito, Y. Iikura, T. Ishizaka und T. Nakahata (1995). „Effects of T-Helper 2-Type Cytokines, Interleukin-3 (IL-3), IL-4, IL-5, and IL-6 on the Survival of Cultured Human Mast Cells“. In: *Blood* 86.10, S. 3705–3714. ISSN: 0006-4971 (Print) 0006-4971 (Linking). PMID: 7579337.
- Zanotti, R., P. Bonadonna, M. Bonifacio, A. Artuso, D. Schena, M. Rossini, O. Perbellini, S. Colarossi, M. Chilosi und G. Pizzolo (2011). „Isolated Bone Marrow Mastocytosis: An Underestimated Subvariant of Indolent Systemic Mastocytosis“. In: *Haematologica* 96.3, S. 482–484. ISSN: 1592-8721 (Electronic) 0390-6078 (Linking). DOI: 10.3324/haematol.2010.034553. PMID: 21193416.

Zhang, D., A. Spielmann, L. Wang, G. Ding, F. Huang, Q. Gu und W. Schwarz (2012). „Mast-Cell Degranulation Induced by Physical Stimuli Involves the Activation of Transient-Receptor-Potential Channel TRPV2“. In: *Physiological Research* 61.1, S. 113–124. ISSN: 1802-9973 (Electronic) 0862-8408 (Linking). PMID: 21574765.

Zhang, H. G., Q. Liu und Y. Ye (2017). „[A New Somatic Mosaicism for a KIT D816F Mutation Results in Congenital Diffuse Cutaneous Mastocytosis: A Rare Monozygotic Twins]“. In: *Zhonghua er ke za zhi. Chinese journal of pediatrics* 55.9, S. 706–707. ISSN: 0578-1310 (Print) 0578-1310 (Linking). DOI: 10.3760/cma.j.issn.0578-1310.2017.09.017. PMID: 28881520.

## B. Präsentationen

### B.1. Posterpräsentationen

- **T-Lymphozyten assoziiert mit Mastzellen und Hyperpigmentierung bei kutaner Mastozytose:** Winkler J. K., Zink A., Biedermann T., Brockow K., *Jahrestagung der deutschen Gesellschaft für Dermatologie (DDG)*  
(Berlin, 29.04.2017)
- **Histopathological criteria for mastocytosis in the skin:** Winkler J.K., Biedermann T., Zink A., Brockow K., *European Academy of Allergy and Clinical Immunology (EAACI) Congress 2019*  
(Lissabon, 02.06.2019)

### B.2. Vorträge

- **Dermatohistopathologie der Haut-Mastozytose:** Winkler, J. K., *Isinger Allergie-Roundtable*  
(Fürstenfeldbruck, 19.07.2019)
- **Dermatohistological Criteria for Mastocytosis in the Skin:** Winkler, J. K., Horny, H.P., Kristensen, T., Brockow, K., *17th Meeting of the European Competence Network on Mastocytosis (ECNM)*  
(Salzburg, 05.10.2019)

## C. Danksagung

Zuerst möchte ich meinem Doktorvater, Prof. Dr. Knut Brockow, herzlich dafür danken, dass er mir die Möglichkeit gegeben hat, an diesem spannenden Projekt zu arbeiten. Ohne seine exzellente fachliche, aber auch menschliche Unterstützung wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Er war und ist für mich stets ein zuverlässiger Ansprechpartner, dessen besonderes Engagement ich nie für selbstverständlich genommen habe. Außerdem möchte ich meinem Mentor PD. Dr. Dr. Alexander Zink für seine fachliche und praktische Hilfe während der Studienkonzeption und Datensammlung sowie für seine fortwährende Motivation danken. Weiterhin gilt mein Dank den vielen Mitarbeiter\*innen in der Klinik und Poliklinik für Dermatologie am Biederstein, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Insbesondere möchte ich nennen: Susanne Bogner aus dem immunhistologischen Labor, Dr. Alexander Böhner, der maßgeblich zur Rekrutierung der Patient\*innen beigetragen hat, Dr. Andrea Baczacko, die die Hautproben aus dem dermatologischen OP zur Verfügung gestellt hat und Frau Dr. Regina Franz, die zu Beginn der Auswertung ihre histologische Expertise bereitgestellt hat. Diese Studie wäre ohne die Kooperation mit herausragenden Experten auf dem Gebiet der Mastozytose nicht möglich gewesen. Ich möchte daher Prof. Dr. Hans-Peter Horny (Emeritus des pathologischen Instituts der Ludwigs-Maximilians-Universität München) für seine ausgesprochen geschätzte Hilfe bei der Studienkonzeption, der histologischen Auswertung und für die Bereitstellung einiger Hautproben herzlich danken. Gleichmaßen gilt mein Dank Prof. Dr. Sigurd Broesby-Olsen und Dr. Thomas Kielsgaard Kristensen (PhD) (Universitätsklinikum Odense, Dänemark), die die KIT D816V Mutationsanalysen für diese Arbeit durchgeführt haben. Vor allem danke ich aber meinem Mann Christian Gebhard, der mich mit unerschöpflicher Geduld im Entstehen dieser Arbeit unterstützt hat. Ich bin unendlich dankbar für sein fachliches Feedback, den technischen Support und die vielen motivierenden Worte, die mich auch durch die schwierigen und anstrengenden Phasen getragen haben. Nicht zuletzt gilt meinen Eltern Karin und Roland Winkler mein Dank dafür, dass sie es mir immer ermöglicht haben, meinen Weg zu gehen und mir stets auch das Gefühl vermittelt haben, meine Ziele erreichen zu können.