

**MASTOCITOSIS SISTÉMICA Y MUTACIÓN
DE *KIT*: FRECUENCIA, GRADO DE
AFECTACIÓN DE LA HEMATOPOYESIS Y
COMPORTAMIENTO CLÍNICO Y
BIOLÓGICO DE LA ENFERMEDAD**

MSc. María Jara Acevedo

Directores:

Dr. Alberto Orfão

Dr. Andrés C. García Montero



**VNiVERSIDAD
D SALAMANCA**

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL

Salamanca, 2016



**VNIVERSIDAD
D SALAMANCA**

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL

Departamento de Medicina

D. Alberto Orfão De Matos Correia e Vale, Doctor en Medicina y Cirugía y Catedrático del Departamento de Medicina de la Universidad de Salamanca

CERTIFICA:

Que el trabajo doctoral realizado bajo mi dirección por Dña. María Jara Acevedo titulado *"MASTOCITOSIS SISTÉMICA Y MUTACIÓN DE KIT: FRECUENCIA, GRADO DE AFECTACIÓN DE LA HEMATOPOYESIS Y COMPORTAMIENTO CLÍNICO Y BIOLÓGICO DE LA ENFERMEDAD"*, reúne las condiciones de originalidad requeridas para optar al grado de Doctor en Medicina por la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste, firmo la presente certificación en Salamanca a 2de diciembre del año 2015.

Fdo: Dr. Alberto Orfão de Matos

D. Andrés Celestino García Montero, Doctor en Biología y profesor asociado del Departamento de Medicina de la Universidad de Salamanca

CERTIFICA:

Que el trabajo doctoral realizado bajo mi dirección por Dña. María Jara Acevedo titulado *"MASTOCITOSIS SISTÉMICA Y MUTACIÓN DE KIT: FRECUENCIA, GRADO DE AFECTACIÓN DE LA HEMATOPOYESIS Y COMPORTAMIENTO CLÍNICO Y BIOLÓGICO DE LA ENFERMEDAD"*, reúne las condiciones de originalidad requeridas para optar al grado de Doctor en Medicina por la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste, firmo la presente certificación en Salamanca a 1 de diciembre del año 2015.



Fdo: Dr. Andrés C. García Montero

La presente tesis doctoral incluye tres trabajos originales publicados en revistas científicas indexadas en el Science Citation Reports, los cuales se detallan a continuación:

1. *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.

Jara-Acevedo M¹, Garcia-Montero AC¹, Teodosio C¹, Sanchez ML², Nunez R², Prados A², Aldanondo I³, Sanchez L², Dominguez M³, Botana LM⁴, Sanchez-Jimenez F⁵, Sotlar K⁶, Almeida J¹, Escribano L², Orfao A¹.
A.C.G.-M. and M.J.-A. have contributed equally to this work. L.E. and A.O. have also contributed equally to this work.
Blood. 2006 Oct 1;108(7):2366-72. doi:10.1182/blood-2006-04-015545

2. Detection of the *KIT* D816V mutation in peripheral blood of systemic mastocytosis: diagnostic implications.

Jara-Acevedo M¹, Teodosio C⁷, Sanchez-Muñoz L⁸, Álvarez-Twose I⁸, Mayado A¹, Caldas C¹, Matito A⁸, Morgado JM⁸, Muñoz-González JI¹, Escribano L¹, Garcia-Montero AC¹, Orfao A¹.
A.C.G.-M. and A.O. have contributed equally to this work
Mod Pathol. 2015 Aug;28(8):1138-49. doi: 10.1038/modpathol.2015.72.

3. *KIT* D816V mutated bone marrow mesenchymal stem cells in indolent systemic mastocytosis are associated with disease progression.

Jara-Acevedo M¹, Garcia-Montero AC¹, Álvarez-Twose I⁸, Teodosio C⁸, Sanchez-Muñoz L⁸, Muñoz C¹, Muñoz-González JI¹, Mayado A¹, Matito A⁸, Caldas C¹, Morgado JM⁸, Escribano L¹, Orfao A¹.
A.C.G.-M. and M.J.-A. have contributed equally to this work
Blood. 2015. doi: 10.1182/blood-2015-07-655100

⁽¹⁾Servicio General de Citometría-NUCLEUS, Departamento de Medicina; Centro de Investigación del Cáncer (IBMCC-CSIC/USAL) e IBSAL, Universidad de Salamanca; ⁽²⁾Unidad de Mastocitosis, Hospital Ramón y Cajal, Madrid; ⁽³⁾Servicio de Inmunología, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Madrid; ⁽⁴⁾Departamento de Farmacología, Facultad de Veterinaria, Universidad de Santiago de Compostela (USC), Lugo; ⁽⁵⁾Departamento de Biología Molecular y Bioquímica, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga; ⁽⁶⁾Institute for Pathology, University of Tübingen, Germany; ⁽⁷⁾Department of Immunology, Erasmus MC, University Medical Center Rotterdam, Rotterdam, The Netherlands; ⁽⁸⁾Centro de Estudios de Mastocitosis de Castilla La Mancha (CLMast), Hospital Virgen del Valle, Toledo.

AGRADECIMIENTOS

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL

GLOSARIO DE ABREVIATURAS	1
INTRODUCCIÓN	9
1. EL MASTOCITO	11
1.1. El origen de las células hematopoyéticas	12
1.2. El precursor del mastocito	14
1.3. Funciones del mastocito	20
2. KIT	24
2.1. Estructura del receptor KIT	24
2.2. Unión de SCF a KIT	26
2.3. Rutas de transducción de señal mediadas por la unión de SCF a KIT	28
2.4. Mutaciones de <i>KIT</i>	31
2.4.1 Mutaciones asociadas a pérdida de función de <i>KIT</i>	32
2.4.2 Mutaciones activantes de <i>KIT</i>	33
2.4.3 Localización de las mutaciones activantes de <i>KIT</i> y enfermedad	34
2.4.4 Mutación D816V de <i>KIT</i>	38
2.4.1.1 Mecanismo de acción de la mutación D816V de <i>KIT</i>	38
2.4.1.2 Efecto patogénico de la mutación D816V de <i>KIT</i>	39
2.4.1.3 Métodos de detección de la mutación D816V de <i>KIT</i>	40
3. MASTOCITOSIS	44
3.1. Diagnóstico de mastocitosis	45
3.2. Clasificación de las mastocitosis	48
3.2.1. Mastocitosis cutánea (CM)	49
3.2.2. Mastocitosis sistémica (MS)	50
3.2.2.1. Mastocitosis sistémica indolente (MSI)	51
3.2.2.2. Mastocitosis sistémica agresiva (MSA)	53
3.2.2.3. Mastocitosis sistémica asociada a otra hemopatía (MS-AHNMD)	53
3.2.2.4. Leucemia de mastocitos (MCL)	54

3.2.2.5. <i>Mastocitosis sistémica bien diferenciada (MSBD)</i>	54
3.2.3. Sarcoma de mastocitos	55
3.2.4. Mastocitoma extracutáneo.....	56
3.3. Pronóstico y tratamiento de la mastocitosis	56
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	61
MATERIAL, MÉTODOS Y RESULTADOS	65
ARTÍCULO 1	67
ARTÍCULO 2	77
ARTÍCULO 3	91
DISCUSIÓN	127
CONCLUSIONES	143
BIBLIOGRAFÍA	147

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

A

A: alanina

ACB: del inglés "allele specific competitive blocker"

ADN: ácido desoxirribonucleico

AHNMD: hemopatía asociada de línea no mastocítica

Akt: serina/treonina proteína quinasa

APJ: receptor de apelina

ASO: del inglés "allele specific oligonucleotide"

ATP: adenosin tri-fosfato

B

Bad: proteína de muerte celular antagonista de Bcl-2

BCR: receptor célula B

Bim: proteína 11 de la familia Bcl-2

C

(2-)CdA: cladribina

C: cisteína

C/EBP α : del inglés "CCAAT/enhancer-binding protein α "

cADN: ADN complementario

CCL: ligando de quimiocina CC

CD: "cluster" de diferenciación

CM: mastocitosis cutánea

CPH: célula progenitora hematopoyética

CPM: célula precursora del mastocito

CSF1: factor estimulante de colonias de masacrófago

D

D: ácido aspártico

DAG: diacilglicerol

del: deleción

dup: duplicación

E

E: ácido glutámico

ECNM: red europea de mastocitosis

ERK: quinasas reguladoras de seÑales

ESMA: secuenciación tras enriquecimiento del alelo mutado

F

F: fenilalanina

FcRε1: receptor de alta afinidad para inmunoglobulina E

FGF2: factor de crecimiento fibroblástico tipo 2

FLI1: del inglés "friend leukemia virus integration 1)

FOXO3a: "Forkhead box" clase O3A

G

G: glicina

gADN: ADN genómico

GATA: factor de transcripción con capacidad de unión al ADN

GDP: guanosin di-fosfato

GIST: tumor del estroma gastrointestinal

GM-CSF: factor estimulador de colonias granulocíticas/monocíticas

Grb2: factor de crecimiento de unión a proteína 2

GTP: guanosin tri-fosfato

H

H: histidina

HLA: del inglés "Human leukocyte antigen)

HMC-1: línea celular derivada de mastocito humano

I

I: isoleucina

Ig: inmunoglobulina

IL: interleucina

INF- γ : Interferón gamma

ins: inserción

J

JAK: quinasa Janus

JM: Juxtamembrana

JNK: quinasa c-Jun

K

K: lisina

kb: kilobases

kDa: kiloDaltons

KIT: receptor para el factor de crecimiento del mastocito

L

L: leucina

LMA: leucemia mieloide aguda

LT: leucotrieno

M

M: metionina

MAPK: quinasas activadoras de mitosis

MCL: leucemia de mastocitos

MCMP: mastocitosis cutánea maculopapular

MC_T: mastocito con contenido de triptasa

MC_{TC}: mastocito con contenido de triptasa y otras proteasas

MHC: complejo mayor de histocompatibilidad

MITF: factor de transcripción asociado a microftalmia

MMAE: monometil auristatina E

MO: médula ósea

MS: mastocitosis sistémica

MS-AHNMD: MS asociada a otra hemopatía

MSA: MS agresiva

MSBD: MS bien diferenciada

MSC: célula mesenquimal

MSI: MS indolente

MSI⁺: MSI con lesión cutánea

MSI⁻: MSI sin lesión cutánea y asociada a anafilaxia

MSS: MS quiescente o “smouldering”

N

N: asparagina

NGF: factor de crecimiento neural

NGS: del inglés “next generation sequencing”

NK: del inglés “natural killer”

NMP: neoplasia mieloproliferativa

O

OMS: organización mundial de la salud

P

P: prolina

PBa: precursor de granulocito basófilo

PBaMc: precursor común mastocito/basófilo

PCL: precursor común linfoide

PCM: precursor común mieloide

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

PDGFR: receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas

PGM: precursor común granulocítico y monocítico

PI3K: fosfoinositol 3 quinasa

PI3P: inositol-1,4,5-trifosfato

PIP2: fosfatidilinositol-4,5-bifosfato

PKC: proteína quinasa C

PKC412: Midostaurina

PLCγ: fosfolipasa c gamma

PME: precursor común megacariocítico y eritroide

PMP: progenitor multipotencial

PNA: ácido peptidonucleico

Pro-B: precursor linfocito B

Pro-T: precursor linfocito T

PU.1: factor de transcripción con capacidad de unión a secuencia rica en purinas

Q

Q: glutamina

R

R: arginina

RA: ácido retinoico

Ras: proteína G monomérica quinasa

REMA: red española de mastocitosis

RFLP: análisis de polimorfismos en longitud de fragmentos de restricción

RTK: receptor tirosin

S

S: serina

SCF: del inglés “stem cell factor”

SH2: dominios homólogos a Scr2

SHP-2: tirosin fosfatasa tipo 11

SMD: síndrome mielodisplásico

Sos: factor intercambiador de nucleotidos

SP: sangre periférica

Src: TK src homóloga de v-Src del sarcoma de Rous

STAT: traductor de señal y activador de transcripción

T

t: traslocación

T: treonina

TCR: receptor célula T

TGF-β: factor de crecimiento trasformante beta

TK: tirosin quinasa

TKRI: inhibidor de receptor TK

TLR: del inglés “toll like receptor”

TNF- α : factor de necrosis tumoral alfa

TPO: trombopoyetina

U

UP: urticaria pigmentosa

V

V: valina

VEGF: factor de crecimiento endotelial vascular

W

W: triptófano

Y

Y: tirosina

INTRODUCCIÓN

1. EL MASTOCITO

La primera referencia histórica sobre el mastocito la encontramos en la tesis doctoral de Paul Ehrlich en 1878. En ella se describen unas células del tejido conectivo con citoplasma amplio, lleno de gránulos basófilos, que reaccionan con la tinción con anilinas, los mastocitos (del alemán: “Mastzelle”). En esta primera referencia se describe que estas células tienen tendencia a agruparse y que frecuentemente se localizan cerca de los vasos sanguíneos, aunque sus propiedades biológicas no estén relacionadas con funciones microvasculares. Además, Paul Ehrlich propone la hipótesis de que el posible origen del mastocito resida en una célula derivada de células mesenquimales (MSC) indiferenciadas del tejido conectivo ¹.

No es hasta 100 años después, en la década de 1970, cuando Kitamura *et al.*² demostraron el origen hematopoyético del mastocito, a partir de experimentos “in vivo” con ratones deficientes en mastocitos, que se “curaban” tras un trasplante de médula ósea (MO)². Estudios posteriores relacionados con la ontogenia del mastocito se han centrado en la identificación del precursor del mastocito y las relaciones que pudieran existir entre éste y el resto de células hematopoyéticas.

Actualmente, se considera que el mastocito es una célula hematopoyética derivada de un precursor CD34⁺ de MO, que abandona la MO como una célula mononucleada indiferenciada, pero comprometida a línea de mastocito, que podemos denominar “célula precursora del mastocito” (CPM); a través de la circulación sanguínea, esta célula se dirige a diferentes tejidos del organismo donde termina su diferenciación a mastocito, y en los cuales, éste último llevará a cabo su función. La maduración a mastocito maduro y funcional a nivel tisular está bajo el control de citoquinas, factores de crecimiento y otros mediadores producidos localmente.

En términos generales, el mastocito se localiza en prácticamente todos los órganos y tejidos vascularizados del organismo, particularmente en la proximidad

de estructuras vasculares o nerviosas, principalmente en zonas cercanas a las superficies corporales que están en contacto directo con el ambiente que rodea al organismo, como la piel y las mucosas del tracto gastrointestinal o del sistema respiratorio³. En el hombre, se han identificado dos tipos principales de mastocitos, que difieren en función de su contenido en proteasas⁴: i) mastocitos ricos en triptasa (MC_T), que no expresan quimasa, y se encuentran preferentemente localizados en mucosas como la mucosa intestinal o la pared de los alveolos pulmonares, y; ii) los mastocitos que tienen gránulos ricos en quimasa, carboxipeptidasa y otras proteasas, además de expresar triptasa (MC_{Tc}), localizados de forma predominante en la piel y el tejido conectivo.

Hoy día, se considera que el mastocito participa en la inducción y amplificación de la respuesta inmune primaria/innata y en el control de la respuesta inmune adaptativa⁵, desarrollando un papel clave en la interacción del sistema inmune con el ambiente en el que vivimos. Así, dentro de sus funciones efectoras, el mastocito desarrolla también un papel fundamental en enfermedades como la alergia, especialmente la asociada a respuesta inmune mediada por la interacción de anticuerpos de tipo IgE y del receptor de alta afinidad para inmunoglobulina E (FcRε1)⁶ presente en cantidades elevadas en la superficie del mastocito.

1.1. El origen de las células hematopoyéticas

La hematopoyesis es el proceso responsable de generar y producir las células hematopoyéticas. Se inicia durante el desarrollo embrionario a nivel del saco vitelino, en etapas fetales se traslada al hígado y posteriormente a la MO, donde continua a lo largo de la vida.

Según algunos autores^{7,8}, en el hombre, al igual que en los demás vertebrados, la hematopoyesis pasa en las primeras etapas de la vida por dos fases: una primera fase de “oleada” transitoria y una segunda fase definitiva. En la primera oleada (primitiva), que ocurriría durante las primeras fases del desarrollo embrionario (hasta ≈10º día de gestación), se generan

fundamentalmente eritrocitos y macrófagos. Su objetivo es la producción de eritrocitos para facilitar la oxigenación de los tejidos del embrión y el crecimiento del mismo. Las células producidas en esta primera fase de la hematopoyesis no son capaces de auto-renovarse y carecen de capacidad de diferenciación a otras líneas celulares, siendo por ello esta primera fase de la hematopoyesis una fase transitoria⁸.

La segunda fase de la hematopoyesis tiene un inicio posterior durante el desarrollo embrionario; en ella se generan las verdaderas células progenitoras hematopoyéticas (CPH) capaces de dar lugar a (todos) los diferentes tipos de células hematopoyéticas del adulto. Aunque el lugar exacto en el que ocurre la producción de estas CPH en el embrión no se ha podido restringir a una única ubicación, se consideran fundamentalmente dos localizaciones (revisado en Jagannathan *et al.*⁸ y Ratajczak *et al.*⁹). Así, su origen se cree estaría a nivel del mesodermo extraembrionario, en las denominadas islas sanguíneas del saco vitelino; posteriormente las CPH migrarían al hígado fetal donde permanecerían de forma transitoria, hasta que se establecen de modo definitivo en la MO. Tradicionalmente esta CPH se ha denominado hemangioblasto y constituiría un precursor común de células hematopoyéticas y células endoteliales^{8,9}. Por otra parte, se considera también que la CPH podría originarse en la región aorta-gónada-mesonefros, en particular en la aorta dorsal; igual que la CPH originada en el saco vitelino, esta CPH posteriormente migraría también al hígado fetal y finalmente, a la MO. En este caso, la producción de todos los tipos celulares hematopoyéticos se debería a CPH derivadas del endotelio vascular^{8,9}.

En la MO, junto con la CPH se localizaría también la MSC mesodérmica, la cual tiene capacidad de diferenciarse a varios tipos de tejidos mesodérmicos distintos¹⁰ como el cartílago, el tejido adiposo, hueso y el estroma de MO, contribuyendo así al mantenimiento del microambiente medular. Ambas células (CPH y MSC) comparten un precursor común con potencial para generar uno u otro tipo de precursores en función de los factores que se expresen en su entorno^{11,12}. Dicho precursor común estaría constituido por una célula de origen mesodérmico que expresa el receptor de la apelina (APJ) y que sería dependiente

del factor de crecimiento fibroblástico tipo 2 (FGF2), capaz de generar mesenquimoangioblastos y hemangioblastos en función del patrón de expresión de los genes VEGF, CD202b, CD144, CD31, FLI1, CD62e y CD102 (elevada en la diferenciación a precursor mesenquimal y baja en la diferenciación selectiva hacia hemangioblasto)¹¹.

1.2. El precursor del mastocito

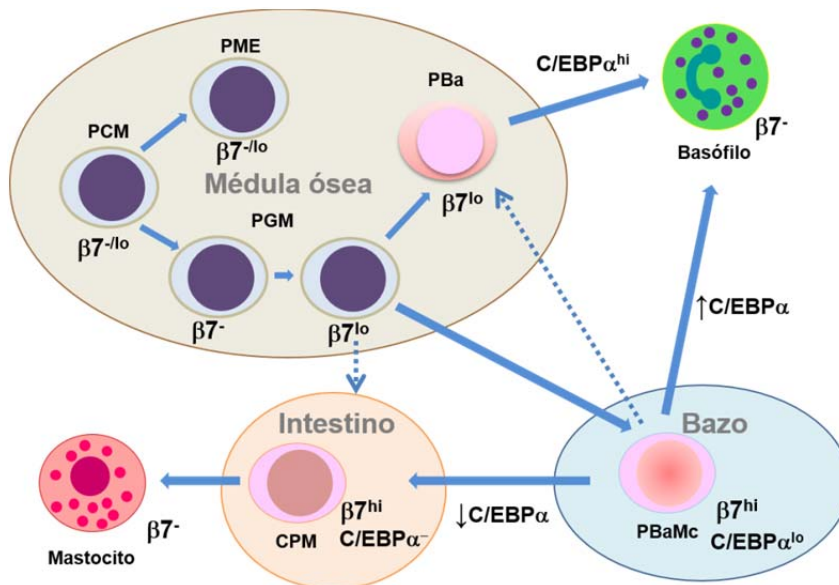
Desde que Kitamura *et al.*² demostraron el origen hematopoyético del mastocito, muchos estudios han intentado identificar la CPM. Así, en 1991, Kirshenbaum *et al.* demostraron que la CPM es un precursor mononucleado CD34⁺ de MO relativamente indiferenciado; dicho precursor abandonaría la MO y maduraría en los tejidos bajo la influencia local de las células del tejido conectivo y sus productos^{13,14}. En 1991, Kirshenbaum *et al.*, mediante estimulación “*in vitro*” de células CD34⁺ con IL-3 (tras co-cultivo con fibroblastos), fueron capaces de generar por primera vez en cultivo mastocitos maduros¹³. Un año antes (1990), se había identificado un nuevo factor de crecimiento hematopoyético, el “stem cell factor” (SCF)¹⁵, cuya producción se debe principalmente a las células del estroma. Estudios posteriores que relacionaban este factor con el crecimiento de los mastocitos¹⁶, han permitido demostrar que el SCF induce diferenciación de mastocitos humanos^{17,18}, explicando de este modo el efecto sobre la diferenciación de los CPH CD34⁺ a mastocito obtenido por Kirshenbaum *et al.*¹³, mediante co-cultivo de CPH CD34⁺ con células del estroma. En estudios posteriores se identificó un precursor CD34⁺/FcR ϵ I⁻ que también se encuentra en la sangre periférica (SP)¹⁹, lo cual apoyaba la hipótesis inicial de que la CPM abandonaría la MO como un precursor relativamente inmaduro, que sólo maduraría una vez haya llegado al tejido diana. Este patrón de comportamiento difiere del habitualmente observado para gran parte de las células hematopoyéticas, que solo salen a SP tras haber completado su maduración en la MO; por el contrario, se asemeja al de otras línea celulares como los linfocitos, monocitos y células dendríticas, que terminan su diferenciación fuera de la

médula ósea, a nivel de otros tejidos (p. ej. a nivel de los órganos linfoides secundarios).

En 1996, Rodewald *et al.* identificaron una CPM con fenotipo claramente diferente al de la mayoría de precursores CD34⁺ (CD34⁺ CD90^{lo} CD117^{hi}) que, tras estimulación con SCF e IL-3 se diferenciaba a mastocito inmaduro²⁰. En paralelo, Kirshenbaum *et al.*²¹ caracterizaron una CPM CD34⁺ CD117⁺ CD13⁺, distinta de los precursores indiferenciados que dan lugar al resto de líneas hematopoyéticas; además, estos autores comprobaron que este precursor daba lugar “*in vitro*” a mastocitos y a una subpoblación de monocitos, por lo cual sugirieron un origen común para el mastocito y (al menos) parte de los monocitos.

A pesar de los estudios antes mencionados y de muchos otros que a lo largo de las últimas dos décadas han demostrado que el origen del mastocito estaría en una CPM relativamente indiferenciada e independiente de otras líneas celulares^{13,17,22}, hasta hace aproximadamente 10 años algunos autores consideraban que el mastocito derivaba de un progenitor común a la línea de granulocito basófilo²⁰ (PBaMc). El origen común del mastocito y granulocito basófilo se sugirió en función de las similitudes fenotípicas existentes entre ambas células^{23,24} ya que ámbas expresan FcR ϵ 1, presentan un contenido enzimático en gran medida superponible y participan en procesos fisiológicos comunes, p. ej. en la respuesta inmune asociada a alergia. Este progenitor común a granulocito basófilo y mastocito derivaría de un precursor de MO que co-expresaría tanto la integrina α 4 β 7 (CD49d), implicada en la migración celular del mastocito a tejidos como el bazo o el intestino, como la proteína “CCAAT/enhancer-binding protein α ” (C/EBP α) habitualmente presente en el granulocito basófilo y que jugarían un papel fundamental en la diferenciación hacia una u otra línea^{25,26}, dependiendo de sus niveles de expresión y de las señales de maduración transmitidas a través de estas moléculas (Figura 1).

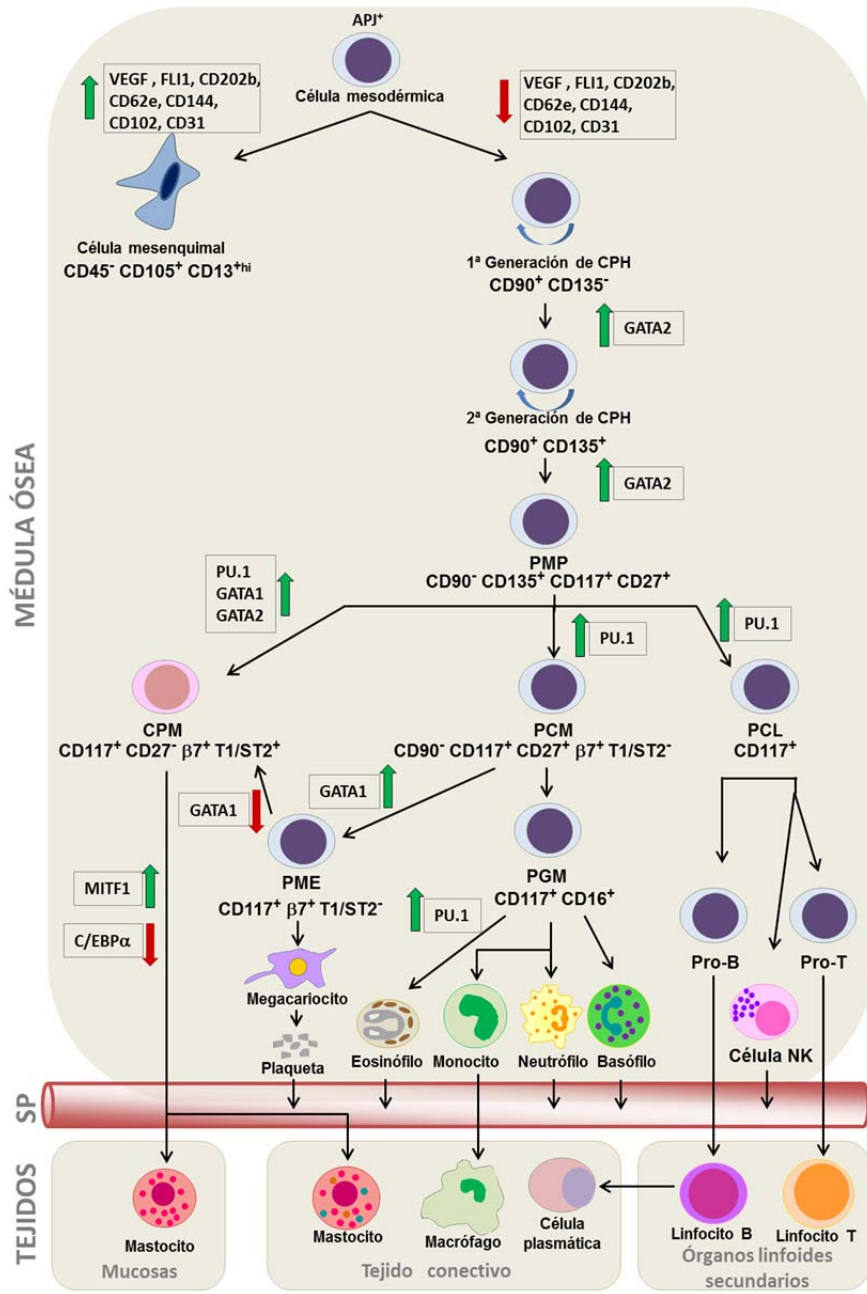
Figura 1: Representación esquemática del modelo de diferenciación del mastocito según la teoría que proponía la existencia de un precursor común a mastocito y granulocito basófilo (adaptado de Arinobu *et al.*²⁵ y de Gurish *et al.*²⁶).



PCM: precursor común mieloide; PME: precursor común megacariocítico y eritroide; PGM: precursor común granulocítico y monocítico; PBa: precursor del granulocito basófilo; PBaMc: precursor común a granulocito basófilo y mastocito; CPM: célula precursora del mastocito.

En contraposición con los trabajos anteriores, Chen *et al.* demuestran, en paralelo con lo observado por Rodewald *et al.*²⁰, que la CPM podría tener su origen en un precursor muy inmaduro de la MO, incluso antes de la generación de los precursores comunes de las líneas mieloide y linfoide, a nivel del progenitor común de todas las líneas mieloides. Este precursor expresaría CD117, la integrina $\alpha 4\beta 7$ (CD49d⁺ CD29⁺) y el receptor T1/ST2 (IL-33R), en ausencia de CD27²⁷⁻²⁹(Figura 2).

Figura 2: Representación esquemática del modelo de diferenciación del mastocito según la teoría del precursor único inmaduro, independiente de otras líneas celulares mieloides y linfoides (Chen *et al.*²⁷; Kitamura *et al.*³⁰), junto con los factores de transcripción implicados en la diferenciación del mastocito a partir de la CPM (Adaptado de Kitamura *et al.*²⁸ y de Takemoto *et al.*³¹).



CPH: célula progenitora hematopoyética; PMP: progenitor multipotencial; PCL: precursor común linfoide; Pro-B: precursor de linfocito B; Pro-T: precursor de linfocito T; PCM: precursor común mieloides; PGM: precursor común granulocítico y monocítico; PME: precursor común megacariocítico y eritroide; CPM: célula precursora del mastocito.

Independientemente de la relación ontogénica que mantiene el mastocito con otras líneas celulares hematopoyéticas a nivel de sus precursores, en la

diferenciación y maduración de la CPM intervienen un importante número de factores de crecimiento y citoquinas (Tabla 1), además de factores de transcripción.

Respecto a los factores de crecimiento, SCF es el factor que mayor impacto tiene sobre el desarrollo del mastocito. Son muchos los trabajos en los que se refleja el efecto directo que sobre la CPM y el mastocito tiene la estimulación con SCF^{18,32}, induciendo proliferación y maduración de CPM a mastocitos, además de activación del mastocito con liberación de mediadores mastocitarios.

En términos generales, los efectos de las citoquinas sobre la CPM y el mastocito son muy diversos, dependiendo del conjunto de citoquinas presentes en el entorno y de las interacciones existentes entre ellas; así, en el caso de la IL-4, el efecto de esta citoquina depende del resto de mediadores que colaboran en la señalización^{33,34,35}. Otras citoquinas tienen un efecto positivo en el desarrollo y proliferación de las CPM, como ocurre con la IL-3³⁶, IL-5, IL-9 e IL-15, citoquinas que ejercen de cofactores de proliferación del precursor del mastocito³⁷, con efectos sinérgicos al SCF^{21,37,38}, entre otras citoquinas; a su vez, la IL-33 promueve la acumulación de gránulos en el desarrollo del mastocito, además de favorecer la supervivencia y maduración de la CPM³⁹. Otro tipo de citoquinas como la trombopoyetina (TPO), también tienen un efecto positivo sobre la proliferación del mastocito, especialmente en los estadios iniciales de diferenciación⁴⁰. Algunas citoquinas por el contrario, muestran efectos contrapuestos con los de las citoquinas anteriormente citadas; tal es el caso del interferón gamma (IFN- γ)^{37,41}, que inhibe la proliferación del mastocito, o de la IL-6 que inhibe el crecimiento del mastocito en las últimas etapas del desarrollo⁴²; también ejercen un efecto negativo sobre la proliferación del mastocito el factor transformante del crecimiento beta (TGF- β) o el factor estimulador de colonias granulocíticas/monocíticas (GM-CSF)⁴³, aunque el efecto inhibitor de este último puede verse anulado por la presencia de IL-10¹⁸.

Tabla 1. Citoquinas que intervienen en la diferenciación, maduración y activación del mastocito. (adaptada de Liu *et al.*⁴⁴ y Okayama *et al.*¹⁴)

TIPO DE MOLECULA	MEDIADOR	EFEECTO SOBRE EL MASTOCITO
Citoquinas y factores de crecimiento	SCF	↑ Proliferación ↑ Maduración
	IL-3	↑ Proliferación de progenitores ↑ Supervivencia en el tejido conectivo
	IL-4	Depende del conjunto de citoquinas presentes: ↓ Diferenciación ↑ Proliferación
	IL-5	Cofactor de proliferación
	IL-6	↑ Proliferación ↓ Apoptosis ↑ Maduración
	IL-9	Cofactor de proliferación
	IL-10	↓ Expresión del receptor FcεRI ↑ Proliferación en colaboración con IL-3 y/o IL-4
	IL-13	↑ Proliferación
	IL-33	↑ Maduración ↑ Supervivencia
	NGF	↓ Apoptosis en colaboración con SCF ↑ Maduración
	IFN-γ	↓ Proliferación
	TGF-β	↓ Proliferación ↑ Apoptosis
	GM-CSF	↓ Proliferación
	TNF-α	Regulación de la migración
	TPO	↑ Desarrollo de mastocito
Otras moléculas	RA	↓ Diferenciación

SCF: "stem cell factor"; IL: interleucina; NGF: factor de crecimiento neural; INF-γ: interferón gamma; TGF-β: factor transformante del crecimiento beta; GM-CSF: factor estimulador de colonias granulocíticas/monocíticas; TNF-α: factor de necrosis tumoral alfa; TPO: trombopoyetina; RA: ácido retinoico.

Los precursores del mastocito también expresan un amplio espectro de receptores de quimiocinas. Así, los receptores CXCR2 y CXCR4 se expresan durante prácticamente toda la maduración de la CPM, mientras que CXCR1 desaparece en las primeras etapas del desarrollo⁴⁵. Estos receptores son capaces

de interaccionar con un gran número de quimiocinas (p. ej. CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL5, CXCL8 o CXCL12) que desempeñan un papel clave en el desarrollo y localización tisular del mastocito.

En la regulación del desarrollo y maduración del mastocito, los factores de crecimiento, citoquinas y quimiocinas antes citados ejercen sus efectos sobre el mastocito y/o sus precursores a través de vías de señalización que conllevan la síntesis y/o activación de un conjunto de factores de transcripción concretos. Estos factores de transcripción desarrollan un papel que es clave para la diferenciación de la CPM, la producción de mastocitos y su integridad funcional (Figura 2). Así, los factores de transcripción de la familia GATA (GATA1, GATA2 y GATA3) son claves en el mantenimiento de la diferenciación de la CPM y su maduración a mastocito^{46,47}. Aunque estos factores de transcripción desempeñan un papel clave, es importante también su efecto coordinado con otros factores de transcripción y las vías de señalización asociadas a los mismos. Así, el factor de transcripción PU.1, que juega un papel fundamental en el desarrollo de la mayoría de células mieloides y linfoides, coopera con GATA-2⁴⁸ en el desarrollo del mastocito. De forma similar, el factor de transcripción asociado a microftalmia (MITF), es un importante regulador de la expresión del receptor de SCF (KIT)⁴⁹, y de la diferenciación y supervivencia del mastocito, mediante el control de la expresión de diversas proteasas⁴⁹; además este factor de transcripción está implicado también en el desarrollo de melanocitos y osteoclastos. Recientemente se ha descrito la existencia de una regulación antagónica entre C/EBP α y MITF, que podría contribuir a determinar el perfil de expresión de factores de diferenciación a basófilo vs. mastocito, a nivel de precursores inmaduros^{50,51}; así, la sobreexpresión de C/EBP α inhibiría el efecto de MITF, induciendo con ello un bloqueo madurativo a mastocito, asociado a una diferenciación selectiva a granulocito basófilo.

1.3. Funciones del mastocito

El precursor del mastocito abandona la MO para dirigirse a los distintos tejidos del organismo donde va a concluir su diferenciación a mastocito maduro y

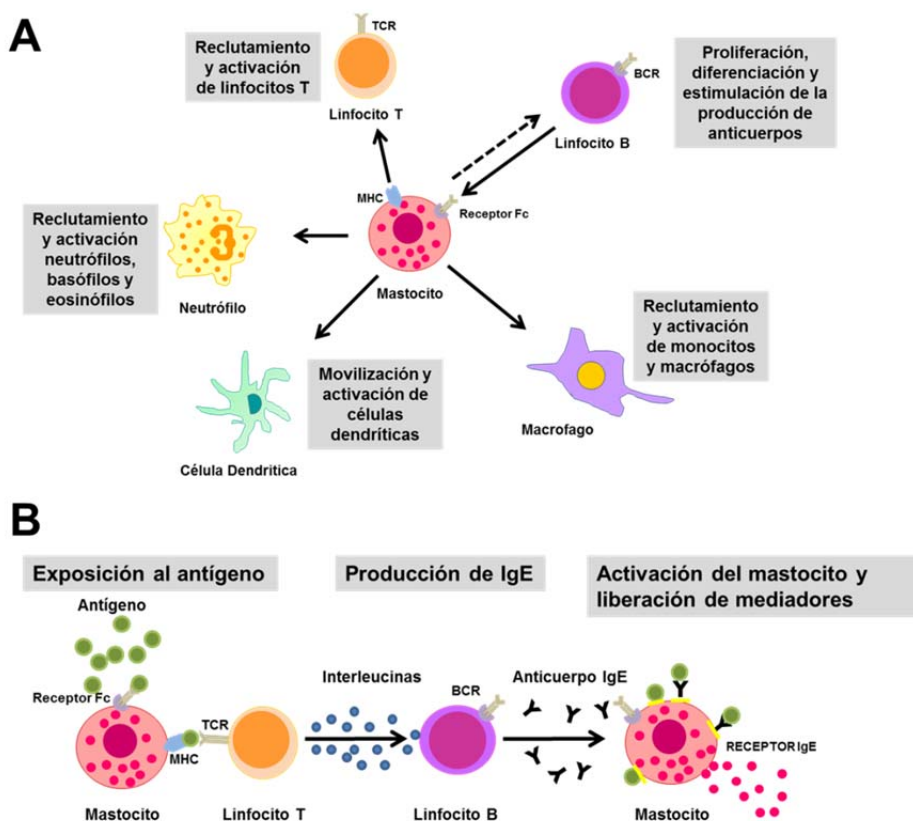
donde además, va a realizar finalmente su función en respuesta a un amplio abanico de estímulos diferentes⁵², como infecciones bacterianas, por parásitos y virus^{53,54}, además de estímulos físicos (p. ej. la temperatura o el roce) y químicos. Es habitual que, en condiciones normales, el mastocito predomine en aquellos tejidos en los que existe un contacto directo con el ambiente exterior, como la piel, el tracto gastrointestinal y el aparato respiratorio. Todo ello refleja que, habitualmente el mastocito está implicado en mecanismos de defensa innata y el reconocimiento de agentes externos presentes en el medioambiente^{55,56}. La descripción de la expresión de receptores de tipo “aduana” (TLR, del inglés “Toll like receptors”) en mastocitos, cuya unión a ligando provoca la producción y liberación de citoquinas^{57,58}, como TNF α e IL-1 y de leucotrienos, como el LT-B₄ y el LT-C₄, que contribuyen al reclutamiento de neutrófilos y células dendríticas para luchar contra la infección^{66,67}, viene a confirmar este papel clave del mastocito en la inmunidad innata, tanto como célula efectora (ya que el mastocito tiene actividad fagocítica y bactericida⁵⁹), como a través de la liberación de proteasas⁵⁴ y otros mediadores que juegan un papel fundamental en la regulación de la actividad de otras células implicadas en la respuesta inmune innata (Figura 3, panel A)^{60,61}. En conjunto, el mastocito es capaz de responder de forma constitutiva frente a una amplia variedad de patógenos entre los que se incluyen bacterias y parásitos⁶², mediante por ejemplo, la señalización a través de TLR1, TLR4 y TLR9, tras contacto con distintos componentes de este tipo de microorganismos; además, la liberación de mediadores mastocitarios favorece también el reclutamiento de otras células efectoras (p. ej. granulocitos neutrófilos) que pudiesen contribuir al control y/o eliminación del patógeno⁶³.

Por otro lado, el mastocito también participa de forma destacada en la inmunidad adquirida, estando implicado en distintas etapas de esta respuesta, desde la presentación de antígenos, hasta la migración de células efectoras al tejido diana. Así, el mastocito i) expresa moléculas HLA (Figura 4, panel a)⁶⁴⁻⁶⁶ pudiendo actuar como célula presentadora de antígenos (p. ej. mediante la internalización del complejo antígeno-IgE-Fc ϵ RI) y contribuir a la activación de los linfocitos T⁶⁷; ii) libera factores quimiotácticos como las quimiocinas CCL5 y CCL20 o LT B₄^{68,69}, capaces de promover la migración y de forma indirecta también, la

proliferación de los linfocitos T; y, iii) produce citoquinas como la IL-4, IL-5, IL-6 y la IL-13 que actúan induciendo la proliferación y diferenciación de linfocitos B (Figura 3, panel a)⁵⁶.

Además de su papel en la respuesta inmune, hoy sabemos que el mastocito también participa en otras funciones homeostáticas⁷⁰, entre ellas se incluyen el crecimiento y modelado de órganos como los huesos⁷¹ y los procesos asociados a la curación de heridas, desde la respuesta inflamatoria inicial, hasta la revascularización del tejido dañado^{71,72}.

Figura 3: Representación esquemática de las principales funciones del mastocito (Adaptado de Abraham *et al.*⁵² y Metz *et al.*⁷³)



MHC: complejo mayor de histocompatibilidad; BCR: receptor de célula B; TCR: receptor de célula T; IgE: inmunoglobulina E.

Además del papel del mastocito en la respuesta inmune y las funciones homeostáticas antes referidas, esta célula está involucrada también en la patogénesis de algunas enfermedades, especialmente en enfermedades alérgicas

e inflamatorias. Así, el mastocito, desempeña un importante papel fisiopatológico en las reacciones de hipersensibilidad tipo I⁷⁴, en enfermedades autoinmunes como la artritis reumatoide⁷⁵, o en el crecimiento de algunos tumores como el adenocarcinoma de mama y el melanoma⁷⁶. De todos estos procesos, aquel en el que más se ha estudiado el papel del mastocito es la alergia, especialmente en relación con las reacciones de hipersensibilidad mediadas por inmunoglobulina E (IgE) (Figura 3, panel B)⁷⁴. En gran medida, la participación del mastocito en las respuestas de hipersensibilidad mediadas por IgE se debe a que el mastocito expresa niveles elevados del receptor de alta afinidad para la región constante de la IgE (FcεRI) que, una vez unido a complejos IgE-antígeno provoca la activación del mastocito asociada a la producción y liberación de mediadores como la histamina, los leucotrienos y las prostaglandinas, de proteasas como la triptasa, de quimiocinas, y factores de crecimiento como el factor de crecimiento vascular endotelial tipo A (VEGF-A) o de citoquinas como el TNFα. Todos estos mediadores, una vez liberados localmente en el ambiente en el que se produce la activación del mastocito, son capaces de provocar un amplio espectro de síntomas relacionados con la alergia, entre los que se incluyen el aumento de la secreción glandular, prurito, respuesta inflamatoria e inflamación, y la aparición de broncoespasmos^{62,77}. Aunque la producción y liberación de estos mediadores provoque una respuesta de hipersensibilidad inmediata, la liberación continua y mantenida de citoquinas y quimiocinas juega un importante papel en las fases más tardías de la reacción alérgica (6 a 24 horas). Así, la liberación continua de mediadores provoca el reclutamiento y activación de otras células entre las que se incluyen los granulocitos neutrófilos, basófilos y eosinófilos, y el comienzo de la respuesta inmune adaptativa asociada a la liberación de mediadores mastocitarios como TNFα, IL-5, IL-8 y CCL2^{84,85}. Esta respuesta puede prolongarse en el tiempo, debido a una exposición prolongada y repetida frente a alérgenos, lo que conduciría a un proceso inflamatorio crónico, caracterizado por la presencia localizada de gran cantidad de células inmunes, pudiendo observarse incluso cambios a nivel tisular asociados a la generación de fibrosis⁸⁵.

2. *KIT*

El gen *KIT* es un proto-oncogén que codifica para un receptor de membrana (*KIT*) con actividad tirosina quinasa (TK), localizado en el brazo largo del cromosoma 4 humano⁷⁸. La primera referencia que encontramos al gen *KIT*, se remonta a 1986. En ese año, Besmer *et al.* identifican un nuevo gen (*v-kit*) en el sarcoma felino, gen que se demostró tiene una estructura similar a otros genes de la familia de las TK⁷⁹. Un año después, Yarden *et al.* identifican el gen humano homólogo de *v-kit* al que denominan *c-KIT*; además, estos autores sugieren que *c-KIT* podría codificar para un receptor transmembrana, cuyo ligando, en ese momento, seguía siendo desconocido, y que presentaba una elevada homología con otros receptores descritos previamente como el receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR) o el receptor para el factor estimulante de colonias de macrófago (CSF1); sugiriendo que *c-KIT* podría pertenecer a esa misma familia de receptores TK⁷⁸. No es hasta 1990, cuando Williams *et al.* identifican un nuevo factor de crecimiento a partir de sobrenadantes de una línea celular murina de células del estroma y relacionan la proliferación celular observada mediante el estímulo con este factor de crecimiento con la expresión del gen *Kit*. En otras palabras, identifican el ligando de *KIT*¹⁵ al que llamarán “mast cell growth factor” o factor de crecimiento del mastocito, posteriormente conocido como “stem cell factor” (SCF).

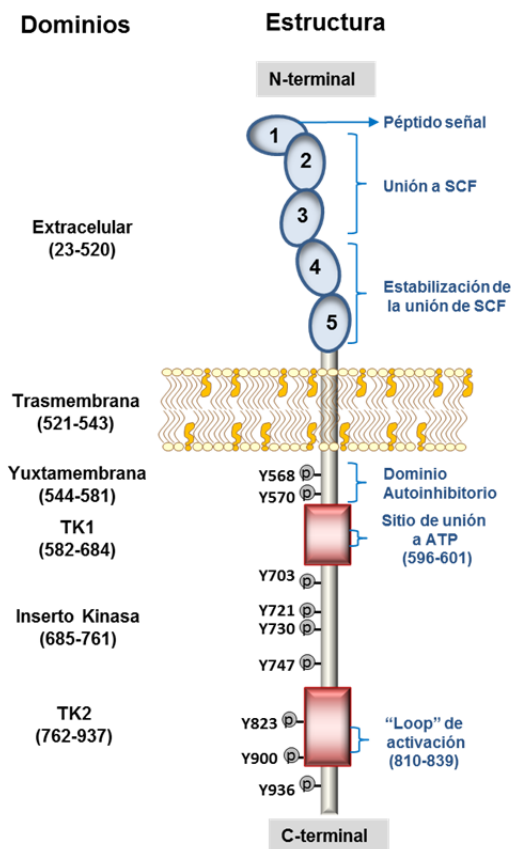
2.1. Estructura del receptor *KIT*

El gen *KIT* se localiza a nivel genómico en la posición 4q11-q12 del cromosoma 4 humano⁷⁸. Consta de aproximadamente 83 kb que contienen 21 exones (fuente Ensembl; <http://www.ensembl.org>) que codifican para un receptor TK de tipo III de aproximadamente 109 kDa; tras procesos postraduccionales, este gen genera una proteína madura de más de 145 kDa⁷⁸. Mediante “splicing” alternativo se generan fundamentalmente dos isoformas principales de *KIT* que

se conocen como las isoformas GNNK+ con 976 aminoácidos, y GNNK- con 972 aminoácidos. En la isoforma GNNK- se delecionan 4 aminoácidos en la porción terminal del exón 9 (del 510 a 513)⁸⁰ [fuente Uniprot; <http://www.uniprot.org>]. Los receptores TK de tipo III comparten entre si una estructura característica, compuesta por una zona extracelular de unión a ligando formada por 5 dominios de tipo inmunoglobulina (Ig), un dominio transmembrana y un dominio citoplasmático con actividad TK constituido por dos subunidades separadas por un inserto de 70-100 aminoácidos en el centro del dominio TK^{78,81}.

De forma específica, el receptor KIT (Figura 4) consta de 5 dominios tipo Ig extracelulares codificados a partir del exón 1 (donde también está codificado el péptido señal) hasta el exón 9. En los tres primeros dominios tipo Ig se produce la unión a ligando, un dímero de SCF, mientras que el cuarto y el quinto dominio serán los encargados de estabilizar esta unión KIT-SCF^{82,83}. A continuación, la zona transmembrana codificada por el exón 10, y la región autoinhibitoria yuxtamembrana codificada por el exón 11, bloquean de forma estérica el “loop” de activación de KIT y mantienen de forma inmóvil y compacta el dominio TK, ejerciendo un papel inhibitor sobre la función quinasa del receptor KIT^{84,85}. Ya en la fracción citoplasmática, el dominio TK lo componen 3 regiones: el dominio quinasa en posición N-terminal, que incluye el sitio de unión al ATP (TK1), el extremo C-terminal del dominio quinasa (TK2) que contiene la región de activación (“loop” de activación) y el inserto quinasa que consta de 80 aminoácidos⁸² y separa TK1 de TK2. El dominio TK1, el inserto quinasa y el dominio TK2 se codifican por los exones desde el 12 al 14, del 14 al 16 y del 16 al 21, respectivamente.

Figura 4: Representación esquemática de la estructura de *KIT* (adaptado de Roskoski *et al.*⁸¹ y de Orfao *et al.*⁸⁶)



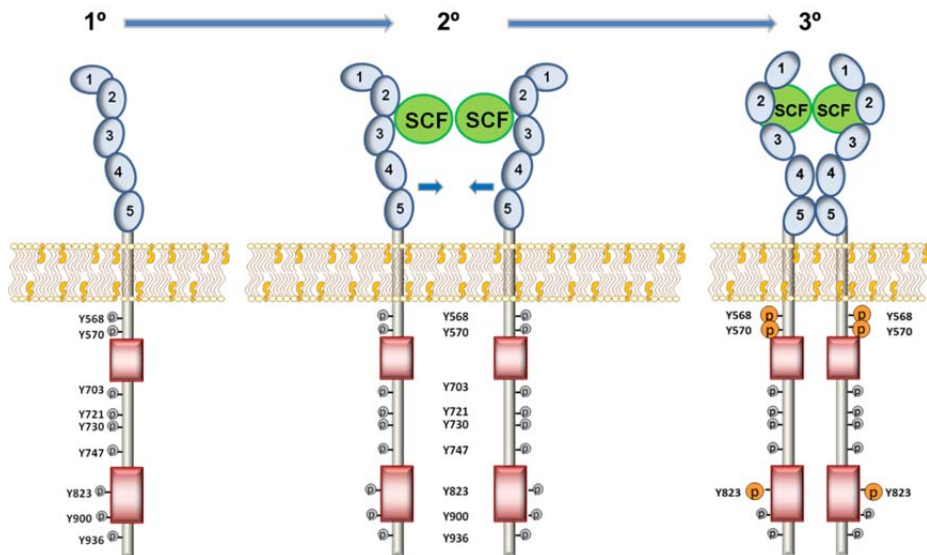
SCF: stem cell factor; ATP: adenosina tri fosfato; TK: tirosina quinasa

2.2. Unión de SCF a KIT

SCF, el ligando de *KIT*, está localizado a nivel genómico en el brazo largo del cromosoma 12, en la posición 12q22-q24. SCF se describió por primera vez en 1990 por Williams *et al.*¹⁵ y su forma biológicamente activa está formada por un homodímero de unión no covalente⁸³. SCF se puede encontrar tanto en forma soluble como unido a membrana, en función del "splicing" alternativo que haya sufrido la molécula durante su producción/síntesis^{80,87}. Ambas formas tienen actividad sobre *KIT*, aunque con efecto distinto. Así, mientras que la forma soluble de SCF tendría un efecto rápido y de corta duración de autofosforilación de *KIT*, la forma unida a membrana provocaría una autofosforilación prolongada y más persistente en el tiempo^{80,88}.

En la actualidad se cree que la unión del homodímero de SCF al receptor KIT (Figura 5) induce, simultáneamente, la dimerización del receptor. Así, la unión de SCF provocaría cambios conformacionales que estabilizarían la unión ligando-receptor y activarían KIT^{82,89}. La unión de SCF provoca la transfosforilación de los residuos de tirosina (Y568 y Y570), localizados en el dominio autoinhibitorio yuxtamembrana y, como resultado, el “loop” de activación del dominio TK2 puede cambiar de conformación y extenderse para pasar a un estado activo. Además, tras la transfosforilación del residuo Y823 se estabilizaría esta forma activa del receptor^{90,91} y se produciría la fosforilación del resto de residuos tirosina que sirven como puntos de “anclaje” para moléculas de transducción de señales con dominios SH2 (homólogo a Src 2) de unión a tirosinas fosforiladas. Esta unión a moléculas con dominios SH2 activaría finalmente la cascada de transducción de señal de KIT^{92,93}.

Figura 5: Representación esquemática de la estructura de la unión de SCF a KIT. En naranja están señalados los residuos que sufren transfosforilación tras la unión de SCF. (Adaptado de Orfao *et al.*⁸⁶, Lennartsson *et al.*⁹⁴ y Yuzawa *et al.*⁹⁵).



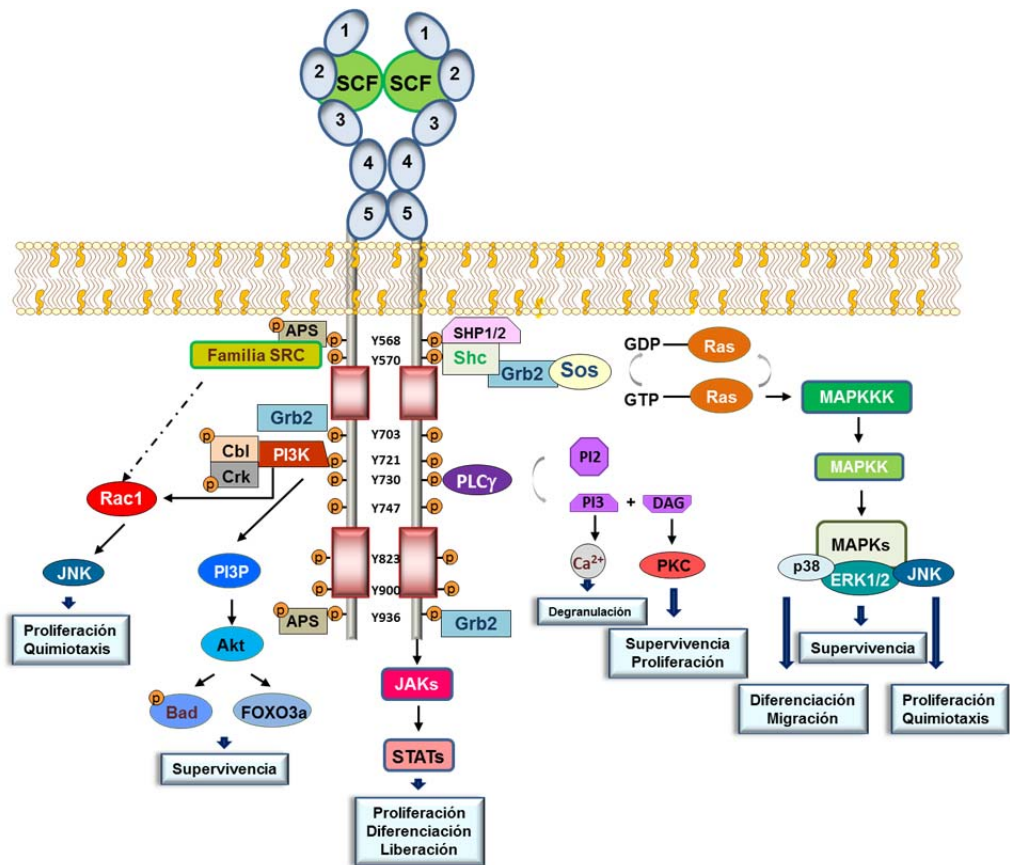
SCF: stem cell factor.

2.3. Rutas de transducción de señal mediadas por la unión de SCF a KIT

En condiciones fisiológicas la señalización mediada por KIT es fundamental en la hematopoyesis. KIT se expresa en la CPH y está implicado en su diferenciación a las líneas mieloide y linfoide^{93,96,97}, a la vez que SCF es un factor de supervivencia para la CPH⁹⁸. Con excepción de los mastocitos y una subpoblación de células NK, KIT no se expresa en la mayoría de las células hematopoyéticas diferenciadas/maduras⁹⁹. De hecho, esta vía SCF/KIT es fundamental en el mastocito, tanto en su diferenciación como en su supervivencia y activación en respuesta a distintos estímulos^{17,100}. Además de expresarse en células hematopoyéticas, KIT se expresa también en otros tipos celulares, tales como las células endoteliales vasculares¹⁰¹, los melanocitos¹⁰², las células seminales¹⁰³ y las células intersticiales de Cajal¹⁰⁴.

En condiciones fisiológicas, cuando se produce la unión del homodímero de SCF al receptor KIT, y la posterior dimerización y activación de este receptor, se inicia la vía de transducción de señales de KIT (Figura 6), la cual juega un papel fundamental en la diferenciación del mastocito y en procesos de supervivencia y proliferación celular, entre otros^{14,86}. La vía de transducción de señales de KIT influye directamente en otras rutas de señalización celular asociadas a estas funciones, como sucede con las rutas de las proteínas MAPK (quinasas activadoras de mitosis), y en concreto con la vía Ras/ERK¹⁰⁵. En este caso, tras la estimulación de KIT por SCF (Figura 6), el receptor del factor de crecimiento de unión a la proteína 2 (Grb2) puede unirse directamente a los residuos fosforilados de tirosina Y703 y Y936¹⁰⁶ de KIT, así como a la tirosina fosfatasa SHP-2¹⁰⁷. El factor Grb2 se encuentra formando un complejo con el factor intercambiador de nucleótidos de guanina Sos y este complejo sería capaz de interactuar con Ras, una proteína G pequeña que oscila entre su forma activa e inactiva¹⁰⁸. Esta interacción provocaría la activación de Ras y a continuación la de la ruta de las MAPK; esto conduciría a la activación de ERK1/2 que actúa como promotor de la supervivencia celular¹⁰⁹, así como de la quinasa N-terminal c-Jun (JNK)¹¹⁰ y otras quinasas implicadas en la diferenciación y migración del mastocito.

Figura 6: Representación esquemática de las principales rutas de transducción de señal activadas por KIT. (Adaptado de Rönnstrand *et al.*⁹³, Kitamura *et al.*¹¹¹ y Orfao *et al.*⁸⁶)



SCF: stem cell factor; GDP: guanosina di-fosfato; GTP: guanosina tri-fosfato

Entre las rutas que provocan un incremento de la proliferación y diferenciación del mastocito, también se encuentra la ruta de JAK/STAT (abreviado del inglés “Janus kinase y “Signal transducer and activator of transcription”) ^{102,103}. En este caso, debido a que la proteína JAK está asociada de forma constitutiva a KIT (Figura 6), la estimulación de KIT por SCF provoca una rápida fosforilación de JAK¹¹², que al activarse conduce a la fosforilación de la familia de traductores de señal y activadores de la transcripción (STAT), proteínas que juegan un papel fundamental en la diferenciación y proliferación del mastocito. En concreto, STAT5 se ha relacionado con la homeostasis del mastocito debido a su efecto sobre la proliferación y supervivencia del mastocito y la liberación de mediadores mastocitarios¹¹³.

Otra de las rutas principales que se activan a través de *KIT* es la ruta de PI3K (fosfoinositol 3 quinasa). Esta vía de transducción de señal está directamente relacionada con la división, diferenciación y supervivencia celular, la reorganización del citoesqueleto de actina y la motilidad celular^{114,115}. La activación de PI3K (Figura 6) es una consecuencia de la interacción de esta proteína con la tirosina Y721 de *KIT*, la cual provoca a su vez la activación de Akt¹¹⁵, con efecto directo sobre la supervivencia de los mastocitos, tanto por la inactivación de la proteína FOXO3a y su diana Bim¹¹⁶, como por la inactivación del factor pro-apoptótico Bad¹¹⁴. Además, PI3K también influye en la proliferación del mastocito mediante la activación de la ruta Rac1/JNK¹¹⁷. En esta vía de señalización de PI3K convergen otra serie de rutas como las vías de señalización de la familia SRC. Dentro de las proteínas que forman parte de esta familia SRC encontramos las proteínas Src, Tec y Lyn^{118,119}. Las proteínas de la familia SRC se asocian a las tirosinas fosforiladas Y568 y Y570 del dominio yuxtamembrana de *KIT* (Figura 6)¹²⁰. Esta activación de proteínas de la familia SRC converge con la ruta de PI3K a nivel de la activación de Rac1 y JNK y, como consecuencia, promueve la proliferación celular¹¹⁷. Otro ejemplo de convergencia con PI3K lo encontramos en la vía de la PLC γ (fosfolipasa C γ). En este caso, el efecto de la activación por unión con SCF viene determinado por el tipo de SCF. Así, en su forma soluble, SCF no tendría efecto sobre la fosforilación de PLC γ ¹²¹, mientras que PLC γ sí tendría un papel central en la supervivencia y proliferación mediada por SCF unido a la membrana citoplasmática^{94,122}, así como en la protección frente a la muerte celular por apoptosis inducida por distintos agentes^{123,124}. La PLC γ se asocia al residuo Y730 de *KIT* (Figura 6)¹²². Esta enzima es capaz de hidrolizar fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PIP2) en diacilglicerol (DAG) e inositol-1,4,5-trifosfato (PI3P). DAG se une y activa a la proteína quinasa C (PKC) que regula la actividad quinasa de *KIT*¹¹⁸ mientras que PI3P se une específicamente a receptores del retículo endoplásmico produciendo la liberación del ion calcio (Ca²⁺) de los depósitos celulares, lo que conlleva un amplio abanico de efectos sobre diversas funciones celulares⁹⁴.

No podemos olvidar que las vías de transducción de señales están muy relacionadas entre ellas, y que en la amplificación e integración de las rutas de

señales que activa KIT (Figura 6) juegan un papel fundamental una serie de proteínas adaptadoras que contribuyen a la activación de otras proteínas que no entran en contacto de forma directa con KIT. Dentro de estas proteínas adaptadoras destacan: i) Grb2 y la proteína adaptadora ShcA que, como hemos explicado anteriormente, participan en la activación de la ruta de Ras/ERK¹²⁵ y; ii) la proteína adaptadora APS que se fosforila en respuesta a la estimulación mediada por SCF y puede unirse a los residuos Y568 y Y936¹²⁶ de KIT y a otra proteína adaptadora como Cbl, la cual puede interactuar a su vez con PI3K¹²⁷ y otros RTK.

2.4. Mutaciones de KIT

Como hemos referido anteriormente, el gen *KIT* está implicado en la proliferación y desarrollo normal de varios tipos celulares, fundamentalmente de células progenitoras (p. ej.: hematopoyéticas), y de algunas células maduras como los mastocitos, las células intersticiales de Cajal, los melanocitos y las células seminales. Por esta razón, cualquier mutación puntual, delección o inserción en el gen *KIT*, puede causar una alteración que haga de KIT una oncoproteína capaz de inducir transformación neoplásica de la(s) célula(s) afectada(s)¹¹¹. Hasta la fecha, se han descrito más de 700 mutaciones somáticas de *KIT* en el hombre (fuente Ensembl; <http://www.ensembl.org>). Aunque la mayoría de estas mutaciones se han identificado en pacientes con una determinada enfermedad, sin embargo, éstas no se han clasificado como el evento clave, causante de esa enfermedad.

La primera descripción de una mutación activante de *KIT* se debe al estudio que llevaron a cabo en 1993 Furitsu *et al.*¹²⁸, sobre la línea celular de mastocitos humanos HMC-1. En este estudio, se identificaron dos mutaciones distintas: la mutación V560G localizada en el dominio extramembrana, en concreto en el exón 11, y la mutación D816V del exón 17, localizada en el “loop” de activación del dominio TK2. Ambas mutaciones constituyen mutaciones activantes de *KIT* en ausencia de ligando (SCF); por este motivo, Furitsu *et al.* sugirieron que estas

mutaciones de *KIT* podrían ser mutaciones productoras de tumores. A partir de ese momento, son muchas las mutaciones de *KIT* que se han descrito asociadas a distintas enfermedades, desde el piebaldismo hasta los tumores del estroma gastrointestinal (GIST) y la mastocitosis. En términos generales, dentro de las mutaciones que afectan a *KIT* se identifican dos grandes grupos, las mutaciones que dan lugar a una pérdida de función y las mutaciones activantes de *KIT*.

2.4.1 Mutaciones asociadas a pérdida de función de *KIT*

Generalmente, las mutaciones que provocan pérdida de función de *KIT* están asociadas al piebaldismo, una enfermedad autosómica dominante que afecta a la migración de los melanocitos desde la cresta neural embrionaria¹²⁹; los enfermos que la padecen se caracterizan por presentar áreas blancas tanto en la piel como en el pelo, debido a la ausencia de melanocitos en estas zonas. Aunque se han descrito muchas mutaciones en sujetos con piebaldismo (Tabla 2) afectando muchas de ellas a los dominios extramembrana y yuxtamembrana¹³⁰⁻¹³², pero también a los dominios TK de *KIT*¹³³⁻¹³⁵.

Tabla 2. Listado resumido de las mutaciones de *KIT* con pérdida de función encontradas en el piebaldismo.

REGIÓN DE <i>KIT</i> ALTERADA	EXON AFECTADO	MUTACION DE <i>KIT</i>				
EXTRACELULAR	3	C136R				
		A178T				
	6	M318G Q347X				
YUXTAMEMBRANA	11	W557X E583K F584C F584L G592A				
		TK1	12	G601R L611F T619A V620A A621T		
				13	H650P G664R	
					TK2	17
				18		
19	P869S Y870C					

(Información recopilada de Spritz *et al.*¹²⁹, Longley *et al.*¹³⁶, He *et al.*¹³⁰, Wasag *et al.*¹³¹, Lee *et al.*¹³², Jia *et al.*¹³³ y Wen *et al.*¹³⁵).

2.4.2 Mutaciones activantes de *KIT*

Las mutaciones activantes de *KIT* se asocian a una mayor supervivencia, proliferación y tasa de transformación neoplásica de aquellas células del organismo que en condiciones normales expresan *KIT*, entre las que se incluyen los precursores hematopoyéticos y los mastocitos^{111,137}. Hasta la fecha, se han identificado muchas mutaciones activantes de *KIT* a lo largo de toda su secuencia, y en pacientes con distintos tipos de enfermedades (Tabla 3). Estos hallazgos sugieren que el lugar donde ocurre la mutación, así como la célula donde aparece, tienen una gran importancia en determinar el tipo de enfermedad que acaba por desarrollarse.

En 2001, Longley *et al.* propusieron una primera clasificación para los distintos tipos de mutaciones activantes de *KIT* basada en la localización y el

mecanismo de acción de la mutación¹³⁸. Así, según estos autores, las mutaciones activantes de *KIT* podrían subdividirse en mutaciones activantes reguladoras y mutaciones activantes enzimáticas. Las mutaciones activantes reguladoras se encuentran frecuentemente en el dominio yuxtamembrana autoinhibitorio (exón 11). Estas mutaciones en el dominio yuxtamembrana provocarían un cambio conformacional¹³⁹, que causa la activación del receptor debido a la pérdida de bloqueo que ejercía el dominio autoinhibitorio sobre el dominio TK, permitiendo así la unión de otras moléculas implicadas en las rutas de transducción de señales y/o la inducción de dimerización del receptor en ausencia de ligando¹³⁸. La mayoría de estas mutaciones de *KIT* se han descrito en tumores de tipo GIST (Tabla 3)^{140,141} y, aunque mayoritariamente son cambios puntuales de la secuencia, también pueden producirse deleciones o inserciones de varios pares de bases, así como duplicaciones de secuencia. Por otro lado, las mutaciones activantes de tipo enzimático afectarían al dominio TK2 y en concreto al “loop” de activación (exón 17, codones 810-839), siendo capaces de inducir la activación de *KIT* en ausencia de ligando y sin necesidad de dimerización del receptor. Entre este grupo de mutaciones de *KIT* se encuentra la mutación D816V, que está presente en la gran mayoría de los pacientes con mastocitosis^{136,142}, junto con otras variantes D816 (p. ej. D816Y/H) presentes con relativa frecuencia en leucemia mieloblástica aguda (LMA) y neoplasias mieloproliferativas/síndromes mielodisplásicos (NMP/SMD)^{143,144}(Tabla 3).

2.4.3 Localización de las mutaciones activantes de *KIT* y enfermedad

Las mutaciones de *KIT* se extienden a lo largo de toda la secuencia del gen, aunque existen dos regiones concretas donde el número de mutaciones descritas es, en términos absolutos y relativos, más elevado. Estas dos regiones o “puntos calientes” de *KIT* (del inglés “hot spot”) están localizados en el dominio yuxtamembrana y en el “loop” de activación de *KIT*^{86,145}. El punto donde se encuentra la mutación, junto con el tipo de célula en la cual ésta se produce, tiene un impacto fundamental en el desarrollo de un tipo u otro de enfermedad¹⁴⁶. Así, los tumores de tipo GIST se caracterizan por presentar

mutaciones en el dominio yuxtamembrana, mientras que en los pacientes con mastocitosis son mucho más frecuentes las mutaciones que afectan al dominio TK2.

Las mutaciones que involucran el dominio extracelular de *KIT* afectan fundamentalmente a los exones 8 y 9 (Tabla 3) y se han identificado principalmente en hemopatías malignas como la LMA y las NMP, si bien pueden estar presentes también en otras enfermedades. De estas mutaciones, merece destacar la delección del codón D419¹⁴⁷, presente tanto en pacientes con GIST como con mastocitosis¹⁴⁸; lo mismo ocurre con algunas otras mutaciones que afectan al exón 9, como la mutación germinal K509I asociada a mastocitosis familiar¹⁴⁹, y las mutaciones C451S¹⁵⁰ y S476I¹⁵¹ identificadas en pacientes con leucemia de mastocitos.

En el dominio transmembrana (exón 10) se han identificado 3 mutaciones distintas (Tabla 3); dos de ellas, la mutación F522C¹⁵² y la mutación A533D¹⁵³, en mastocitosis y la tercera (V530I) en LMA¹⁴⁷. A su vez, la mayoría de las mutaciones que afectan a la región yuxtamembrana autoinhibitoria están relacionadas con los GIST¹³⁸, tal como hemos señalado anteriormente, aunque también se ha descrito este tipo de mutaciones en otras enfermedades como el seminoma¹⁵⁴, el melanoma¹⁵⁵, la LMA¹⁵⁶, y algunas variantes familiares/germinales de mastocitosis^{157,158} (Tabla 3).

Finalmente, las mutaciones localizadas en el dominio TK de *KIT* se detectan frecuentemente en mastocitosis^{142,159,160}, pero también en LMA¹⁶¹, seminoma¹⁶² y linfoma extraganglionar T/NK tipo nasal¹⁶³ (Tabla 3). De todas las mutaciones del dominio TK, la más frecuente es la mutación activante D816V, que se encuentra de forma mayoritaria en pacientes con mastocitosis. No obstante, existen otras variantes de mutación en este mismo codón, como pueden ser las mutaciones D816Y y D816H, que además de estar presentes en pacientes de mastocitosis, se han descrito en pacientes con LMA habitualmente asociadas a alteraciones cromosómicas recurrentes típicas de esta enfermedad como la inv(16) o la t(8;21)¹⁶¹.

Tabla 3. Listado resumido de las mutaciones de *KIT* asociadas a ganancia de función.

ENFERMEDAD	DOMINIO DE KIT AFECTADO	EXON ALTERADO	MUTACIÓN DE KIT	FRECUENCIA
MASTOCITOSIS	EXTRACELULAR	8	del D419	<0.1%
			ins FF419	<0.1%
			T417_delD419	<0.1%
			insY	<0.1%
			C451S	<0.1%
		S476I	<0.1%	
		9	dup S501_A502	<0.1%
			dup S501_A503	<0.1%
			dup N505_F508	<0.1%
			K509I	<5%
	TRANSMEMBRANA		10	F522C
		A533D		<1%
	YUXTAMEMBRANA	11	V559I	<0.1%
			V560G	<1%
			A572A	<0.1%
	TK1	13	R634W	<0.1%
			V654A	<0.1%
	TK2	17	L799F	<0.1%
			R815K	<0.1%
			D816A	<1%
D816Y			<5%	
D816H			<5%	
D816F			<5%	
D816I			<1%	
D816V	>90			
D820G	<0.1%			
N822I	<0.1%			

Tabla 3. (continuación)

ENFERMEDAD	DOMINIO DE KIT AFECTADO	EXON ALTERADO	MUTACIÓN DE KIT	FRECUENCIA	
NMP/SMD/LMA	EXTRACELULAR	2	D52N	≈10%	
		8	del D419	<15%	
			del_ins 416-419	<10%	
	TRANSMEMBRANA	10	V530I	≈10%	
	YUXTAMEMBRANA	11	G565V	<5%	
	INSERTO KINASA	14	D696G	<5%	
		15	K735M	<5%	
	TK2	16	T753A	<5%	
			D816Y/H/V	≈35%	
		17	D820G	<5%	
			N822K	<5%	
			D825I	<5%	
		18	L859P	<5%	
		19	S868G	<5%	
20	K918E	<5%			
	K925G	<5%			
	21	V950A	<5%		
LINFOMA EXTRAGANGLIONAR T/NK TIPO NASAL	YUXTAMEMBRANA	11	V559I	<5%	
			E561K	<10%	
	TK2		del D579	<5%	
		17	D816N	<5%	
GIST	EXTRACELULAR	8	del D419	<5%	
		9	ins A502_Y503	<5%	
	YUXTAMEMBRANA		del K550_E561	>25%	
			T553C	<5%	
			K558X	<5%	
		11	V559D	>15%	
			V560D	≈40%	
			N567Y	<5%	
	TK1		del D579	<5%	
		13	K642E/T	<5%	
	INSERTO KINASA	14	del K704_N705	<10%	
		15	del S715	>50%	
	SEMINOMA	YUXTAMEMBRANA	11	W557C/R	<5%
				L576P	<5%
TK2			D816Y/H/E/V	<10%	
		17	D820H/V	<5%	
			N822Y/K	>5%	
	Y823C/D/N	<5%			
MELANOMA	EXTRACELULAR	8	V473M	<5%	
		9	N505I	<5%	
	YUXTAMEMBRANA		P577S	<5%	
		11	V559G	<5%	
		L576P	<5%		
TK1		S628N	<5%		
	13	K642E	<5%		

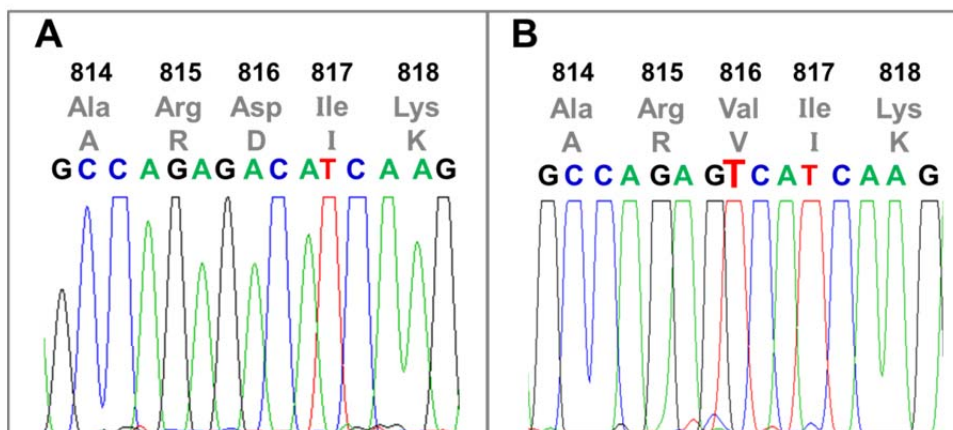
NMP: neoplasia mieloproliferativa; SMD: síndrome mielodisplásico; LMA: leukemia mieloide aguda; GIST: tumor del estroma gastrointestinal.

(Información recopilada de Orfao *et al.*⁸⁶, Nakai *et al.*¹⁶⁴, Spector *et al.*¹⁶⁵, Lavielle *et al.*¹⁶⁶, Yamanoi *et al.*¹⁶⁷, Alyuruk *et al.*¹⁶⁸, Calibasi *et al.*¹⁶⁸, Lim *et al.*¹⁶⁹, Wang *et al.*¹⁵⁰, Kim *et al.*¹⁷⁰, Vita *et al.*¹⁷¹, Allegra *et al.*¹⁷², Nieto *et al.*¹⁵⁶, Pollar *et al.*¹⁷³, Valent *et al.*¹⁵¹ y Yilmaz *et al.*¹⁷⁴).

2.4.4 Mutación D816V de *KIT*

La mutación D816V de *KIT* fue descrita por primera vez por Furitsu *et al.* en 1993, en la línea celular de origen humano HMC-1¹²⁸. La mutación D816V es una mutación activante de tipo enzimático¹³⁸. Se localiza en el “loop” de activación del dominio TK2 de *KIT*^{78,81}, concretamente, en el codón 816 situado en el exón 17 de *KIT*. La mutación D816V se produce por la sustitución de una adenina por una timina (GAC por GTC), provocando el cambio del aminoácido aspartato por valina (Figura 7). Esta mutación es la alteración genética más frecuentemente encontrada en pacientes con mastocitosis (>90% de los casos)¹⁴² siendo además, prácticamente específica de esta enfermedad. Por esta razón, la mutación D816V de *KIT* se incluye dentro de los criterios (menores) de la Organización Mundial de la Salud (OMS) para el diagnóstico de MS¹⁷⁵.

Figura 7: Representación mediante electroferograma de la secuencia de *KIT* desde el aminoácido 814 hasta el aminoácido 818. En el panel A se muestra la secuencia silvestre de *KIT*, mientras que en el panel B se representa la secuencia mutada D816V de *KIT*.



2.4.1.1 Mecanismo de acción de la mutación D816V de *KIT*

La mutación D816V de *KIT* provoca la activación constitutiva de *KIT*, en ausencia tanto de ligando¹²⁸ como de dimerización del receptor^{176,177}, a diferencia de lo que sucede, por ejemplo, en las mutaciones del dominio yuxtamembrana de *KIT*. La mutación D816V mantiene activado *KIT* de forma constitutiva, lo cual provoca entre otros efectos, un incremento de la proliferación celular,

inhibición/resistencia a la apoptosis¹¹⁴ y/o cambios en la capacidad de migración de las células^{136,178} que expresan la proteína mutada, debido a la activación de las rutas de transducción de señal PI3K^{98,99}, Ras/ERK^{105,109,110} y JAK/STAT^{102,103,113}, en las que está implicado KIT (Figura 6).

A pesar de los años transcurridos desde la identificación de esta mutación de *KIT*, seguimos sin conocer qué cambios conformacionales concretos provoca la presencia de la mutación, debido a que por el momento no se ha podido cristalizar la proteína mutada. Sin embargo, estudios realizados “*in silico*”¹⁷⁹ han propuesto que uno de los efectos que tiene la mutación D816V de *KIT* sobre la estructura del receptor, consistiría en un cambio en la organización estructural del dominio autoinhibitorio y, como consecuencia, la liberación del dominio TK⁹⁰; esto a su vez, constituiría el primer paso para la activación del receptor que, junto con el desdoblamiento de una pequeña zona del “loop” de activación entre los aminoácidos 817-819, debido a la rotura de los puentes de hidrógeno que mantienen estable la α -hélice, permitiría que *KIT* adquiriera su actividad enzimática. A pesar de que el dominio autoinhibitorio yuxtamembrana se desorganiza, los residuos Y568 y Y570 siguen ejerciendo un control negativo sobre el “loop” de activación del dominio TK¹⁸⁰. Esto último podría explicar por qué el efecto oncogénico de la mutación D816V es relativamente reducido, y por ello, la mayoría de los casos de mastocitosis sistémica conservan un curso clínico indolente.

2.4.1.2 Efecto patogénico de la mutación D816V de *KIT*

En 1995, Nagata *et al.* detectaron la mutación D816V de *KIT* en células mononucleadas de pacientes con mastocitosis. En concreto, estos autores identificaron esta mutación de *KIT* en pacientes con mastocitosis sistémica asociada a otra hemopatía, y no en otros tipos de mastocitosis de comportamiento más indolente¹⁵⁹, sugiriendo que la mutación D816V de *KIT* tendría un efecto directo en la génesis de la mastocitosis sistémica. Este efecto sobre la patogénesis de la mastocitosis lo corroborarían Longley *et al.* en 1996¹⁶⁰ con la demostración de la presencia de la mutación D816V de *KIT* en dos pacientes con distintos subtipos de mastocitosis. Sin embargo, estos autores

únicamente detectaron la presencia de la mutación en los mastocitos, y no en otras células hematológicas o epiteliales de los pacientes. Uno de los pacientes presentaba una mastocitosis de comportamiento agresivo, mientras que el otro tenía una mastocitosis indolente sin evidencia de afectación sistémica o de otra hemopatía. Posteriormente, Akin *et al.* demostraron por primera vez la presencia de la mutación D816V de *KIT* en precursores hematopoyéticos CD34⁺ de MO de pacientes con mastocitosis¹⁸¹. Estos hallazgos permitieron la caracterización de la mutación D816V como una mutación somática cuyo efecto patogénico quedaría restringido a la alteración de los mastocitos¹⁸² de pacientes con mastocitosis¹⁶⁰, incluso cuando se detecta la presencia de la mutación en otros linajes celulares hematopoyéticos.

A pesar de que se han descrito varias mutaciones de *KIT* en pacientes con mastocitosis, la mutación D816V es, de todas ellas y de lejos, la más frecuente (Tabla 3), siendo especialmente frecuente en pacientes con mastocitosis sistémica con inicio de la enfermedad en la edad adulta¹³⁶. Estos hallazgos sugieren que la mutación D816V de *KIT* podría constituir un requisito indispensable para la manifestación y la persistencia de la mastocitosis a lo largo del tiempo¹⁵⁷. Así, en los últimos años, la determinación de la mutación D816V se ha revelado como un hallazgo de especial importancia tanto para el diagnóstico¹⁸³, como para la estratificación pronóstica de los pacientes con mastocitosis¹⁸⁴, debido a esta relación (aparentemente) directa entre presencia de la mutación y enfermedad.

2.4.1.3 Métodos de detección de la mutación D816V de *KIT*

Con el objetivo de detectar la posible presencia de la mutación D816V de *KIT*, o de otras mutaciones que afectan al gen *KIT*, a lo largo de los años se han desarrollado y aplicado distintas estrategias y métodos moleculares. En conjunto, las técnicas desarrolladas pueden subdividirse en tres grandes grupos en función del método de detección empleado. Así, disponemos de: 1) técnicas basadas en secuenciación de la muestra, 2) métodos que utilizan el análisis del tamaño de fragmentos de restricción (RFLP) para la detección de la mutación y 3) estrategias

que emplean métodos basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Tabla 4).

Dentro de las técnicas de secuenciación, pueden emplearse métodos de secuenciación directa tipo “Sanger”¹⁸⁵, en las cuales se realiza una amplificación mediante PCR de la zona del gen que queremos analizar, haciendo posteriormente migrar el producto amplificado en la PCR en una electroforesis capilar, con el fin de obtener la secuencia completa de nucleótidos de esa región. Esta técnica, que en principio podría emplearse para rastrear mutaciones a lo largo de todo el gen *KIT*, tiene una sensibilidad bastante baja, requiriendo que al menos el 25% del material genético analizado tenga la mutación para poder detectarla (Tabla 4). Alternativamente, pueden emplearse aproximaciones de secuenciación masiva o NGS (del inglés “Next Generation Sequencing”). Esta tecnología (Tabla 4) permite la detección de mutaciones de *KIT* con mayor sensibilidad (0.2%)¹⁸⁶, y podría emplearse también para rastrear mutaciones a lo largo de todo el gen; no obstante, tiene el inconveniente del elevado coste económico asociado.

Respecto a las técnicas que emplean RFLP para la detección de la mutación, en ellas se utiliza una digestión dirigida (mediante enzimas de restricción específicas) de la región genética que se quiera analizar y que ha sido amplificada previamente de forma selectiva mediante PCR; con posterioridad se analiza el tamaño de los fragmentos de restricción obtenidos (*Hinf I* y *Hae III*)¹⁸¹. Cabe señalar que, esta aproximación metodológica puede emplearse también en ausencia de amplificación previa; tal es el caso de la técnica de análisis RFLP tras digestión con la enzima *Hinf I*¹⁵⁹ (Tabla 4). Además, también se ha desarrollado y propuesto un método que combina el análisis RFLP, con la digestión mediante la enzima *BsmAI*, seguido de la amplificación del material genético y secuenciación mediante “Sanger” de los fragmentos obtenidos¹⁸⁷; con ello, habitualmente se mejora notablemente la sensibilidad de detección de la mutación (1%), respecto a las demás variantes técnicas del método RFLP antes referidas (Tabla 4).

Tabla 4. Listado de métodos disponibles para la identificación de mutaciones del gen *KIT*.

MÉTODO DE DETECCIÓN	LÍMITE DE DETECCIÓN	TIPO DE DETECCIÓN (cuantitativa/cualitativa)	TIPO DE MUESTRA	REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA
Secuenciación tipo "SANGER"	25%	Electroforesis en gel (cualitativa)	gADN/cADN	Sanger <i>et al.</i> ¹⁸⁶ PNAS, 1977
Secuenciación masiva (NGS)	0.2%	Ion Reporter v4.2 (Ion Torrent™)	gADN/cADN	Kristensen <i>et al.</i> ¹⁸⁷ Eur J Haematol, 2015
RT-PCR, digestión mediante enzimas de restricción (<i>Hae III</i> y <i>Hinf I</i>) y análisis de fragmentos RFLP	>5%	RFLP (cualitativa)	cADN	Akin <i>et al.</i> ¹⁸⁸ Exp Hematol, 2000
Digestión mediante enzimas de restricción (<i>Hinf I</i>) y análisis RFLP	>10%	RFLP (cualitativa)	cADN	Nagata <i>et al.</i> ¹⁷² PNAS, 1995
Digestión mediante enzimas de restricción (<i>BsmAI</i>) y enriquecimiento de alelos mutados (ESMA)	1%	RFLP y PCR+secuenciación (cualitativa)	gADN	Tan <i>et al.</i> ¹⁸⁹ Clin Chem, 2006
qPCR con sondas no coincidentes (del inglés "mismatch")	1%	Sondas tipo TaqMan (cuantitativa)	cADN	Lawley <i>et al.</i> ¹⁹² Mut Reserch, 2005
PCR con bloqueo "específico de alelo" (ACB-PCR)	0.3-0.1%	Análisis en gel de agarosa (cualitativa)	gADN	Tan <i>et al.</i> ¹⁸⁹ Clin Chem, 2006
PCR con bloqueo de ADN silvestre (PNA-PCR)	1-5%*	Sondas de hibridación (cualitativa)	gADN	Sotlar <i>et al.</i> ¹⁹³ Am J Pathol, 2003
qPCR (digital) específica de alelo	0.01%	Sondas tipo TaqMan (cuantitativa)	gADN	White <i>et al.</i> ¹⁹¹ AMMM, 2009
qPCR específica de alelo (ASO-qPCR)	0.003%	Sondas tipo TaqMan (cualitativa y cuantitativa)	gADN	Kristensen <i>et al.</i> ¹⁹⁰ J Mol Diagnos, 2011

* Límite de detección alcanzado por la técnica en el control de calidad de la Red Europea de Mastocitosis (ECNM) en el año 2005. gADN: ADN genómico; cADN: ADN complementario; NGS: next generation sequencing; RFLP: análisis de polimorfismos en la longitud de fragmentos de restricción (del inglés "Restriction fragment length polymorphism"); ESMA: secuenciación tras enriquecimiento del alelo mutado (del inglés "enriched sequencing of mutant alleles"); ACB: (del inglés "allele-specific competitive blocker"); PNA: ácido peptidonucleico; AMMM: "Accuracy in Molecular Measurement Meeting"; ASO: (del inglés "allele specific oligonucleotide).

El tercer grupo de métodos descritos para la identificación de la mutación D816V de *KIT* se basa en la detección directa de la misma mediante métodos de PCR, basados en la amplificación previa del ADN/ARN diana. En términos generales, este grupo de técnicas presentan una mayor sensibilidad que las técnicas anteriores (rango de sensibilidad del 5% al 0.003%). En conjunto, este grupo de técnicas comparten el proceso de amplificación del material genético mediante PCR convencional (o a tiempo real) y difieren entre sí, en cuanto al

diseño de los cebadores empleados para la amplificación del ADN diana, al tipo y/o diseño de sondas empleadas para la detección de la secuencia mutada y, al tipo de material genético de partida empleado (gADN vs. cADN) para su detección (Tabla 4).

Respecto al tipo de cebadores empleados, cabe señalar que para la mayoría (4/5) de las técnicas de PCR descritas, es necesario disponer de cebadores específicos del alelo de interés (ASO, del inglés “allele specific oligonucleotide”)¹⁸⁸⁻¹⁹⁰. Esto es debido a que solo de esta forma lograremos la amplificación selectiva del material genético portador de la mutación; a su vez, esto tiene como inconveniente el que solo sería posible la identificación de la mutación que estuviésemos buscando (p. ej. D816V) en el ensayo. No obstante, dentro de este grupo de técnicas basadas en ASO-PCR, merece destacar además, el método ACB-PCR en el que mediante PCR convencional se amplifica de forma selectiva el ADN portador de la mutación, bloqueando la amplificación del ADN silvestre (ACB-PCR)¹⁸⁷, para posteriormente comprobar el resultado mediante una electroforesis en agarosa. Esta técnica tiene una sensibilidad de alrededor del 0.1% (Tabla 4) y con un diseño adecuado de los cebadores, puede emplearse para la detección de mutaciones a lo largo de todo el gen *KIT*. Así mismo, cabe señalar también que debido a su altísima sensibilidad, con el método de ASO-qPCR descrito por Kristensen *et al.*¹⁸⁸ podemos detectar y cuantificar la mutación D816V de *KIT* de forma específica, incluso cuando el ADN mutado corresponde a tan solo el 0.003% del material genético presente en la muestra (Tabla 4). Desde la descripción por Sotlar *et al.*, la técnica basada en la amplificación selectiva del ADN mutado mediante PCR a tiempo real y bloqueo simultáneo de la amplificación del ADN silvestre por la interacción con un oligonucleótido de N-acetil-glucosamina (PNA), o técnica de PNA-PCR¹⁹¹, se ha convertido en la técnica de referencia para la detección de la mutación D816V de *KIT*. Esto se debe en gran medida a su sensibilidad relativamente alta con respecto a los métodos anteriores (permite la detección de la mutación con la presencia de un 1-5% de ADN mutado en la muestra) y a que además, permite detectar mutaciones en el dominio TK2 de *KIT* desde el codón 814 hasta el codón 819.

3. MASTOCITOSIS

La primera referencia que encontramos en la literatura a la mastocitosis se recoge en un artículo publicado en la revista *British Medical Journal*¹⁹² en 1869. En este estudio, los autores describían una enfermedad cutánea rara, caracterizada por lesiones con tendencia a la pigmentación que se distribuían por todo el cuerpo. Sin embargo, en ese momento no se conocía la célula causante de esas lesiones ya que no fue hasta casi una década después cuando Paul Ehrlich describió el mastocito, en 1878¹⁹³; según las observaciones iniciales de Paul Ehrlich, el mastocito era una célula granulada del tejido conectivo que se teñía de color rojo-púrpura¹. En ese mismo año, Sangster¹⁹⁴ estableció el término “urticaria pigmentosa” (UP) para referirse a la enfermedad que presentaba el tipo de lesiones descritas por Nettleship & Tay¹⁹². Sin embargo, no fue hasta 1887, cuando Unna *et al.*¹⁹⁵ demostraron que las lesiones cutáneas que se observaban en pacientes con urticaria pigmentosa contenían agregados de mastocitos.

A pesar de que inicialmente la mastocitosis se describió como una enfermedad asociada a manifestaciones cutáneas, actualmente se sabe que puede involucrar a distintos órganos y tejidos, siendo por ello muy variadas sus manifestaciones clínicas que oscilan desde un curso clínico indolente a agresivo¹⁷⁵, asociado a una sintomatología habitualmente relacionada con la liberación de mediadores y/o infiltración de distintos órganos y tejidos por mastocitos patológicos.

Según la OMS, la mastocitosis es una enfermedad clonal caracterizada por la proliferación de mastocitos neoplásicos y por su acumulación en diferentes localizaciones, que habitualmente incluyen más de un tejido u órgano¹⁷⁵. La clasificación actual de la OMS incluye 7 subtipos distintos de la enfermedad¹⁷⁵; además, recientemente se han descrito otras variantes de la enfermedad con características particulares, como son las mastocitosis sistémicas quiescentes o “smouldering” (MSS)¹⁹⁶, las mastocitosis sistémicas bien diferenciadas

(MSBD)^{152,197} y las mastocitosis sistémicas indolentes sin lesión cutánea asociadas a anafilaxia (MSIs)¹⁹⁸.

Con respecto a la prevalencia de la enfermedad, se sabe que puede aparecer en cualquier edad, aunque determinados subtipos, como la mastocitosis cutánea, son más frecuentes en niños y las mastocitosis sistémicas suelen presentarse a partir de la segunda década de la vida¹⁷⁵. Actualmente, la prevalencia exacta de la mastocitosis sigue siendo desconocida, pero se estima que afectaría aproximadamente a una persona de cada 10.000 individuos^{199(www.orpha.net)}, por lo que según la OMS, se considera una enfermedad rara (<5:10.000).

3.1. Diagnóstico de mastocitosis

La mastocitosis incluye un grupo muy heterogéneo de enfermedades caracterizadas por la presencia a nivel tisular de agregados compactos y multifocales de mastocitos clonales, morfológica y fenotípicamente aberrantes¹⁷⁵. La localización de estos agregados, así como las manifestaciones clínicas de la enfermedad, permiten subdividir la mastocitosis en dos subtipos principales: i) la mastocitosis cutánea (CM), más frecuente en niños y caracterizada por la presencia de lesiones cutáneas debidas a agregados de mastocitos, en ausencia de enfermedad extracutánea, y; ii) la mastocitosis sistémica (MS), diagnosticada principalmente en adultos que presentan infiltración por mastocitos patológicos de dos o más órganos o tejidos, habitualmente la MO y la piel. A su vez, ambos subtipos de mastocitosis pueden subdividirse en otros subtipos en función del tipo y grado de afectación tisular y de los hallazgos de laboratorio¹⁷⁵.

La CM presenta lesiones cutáneas asociadas a eritema y edema inducidos por contacto físico (Signo de Darier), acumulo a nivel intraepidérmico de melanocitos/melanina e infiltrado de mastocitos detectable a nivel histológico. Un requisito para el diagnóstico de CM radica en la ausencia de infiltración de otros tejidos (además de la piel) según los criterios diagnósticos de la OMS¹⁷⁵.

A su vez, la MS se caracteriza por la infiltración de dos o más tejidos, siendo la piel y la MO los tejidos habitualmente más afectados. Los criterios de la OMS para diagnóstico de la MS¹⁷⁵ (Tabla 5) incluyen: presencia de agregados densos y multifocales de más de 15 mastocitos en MO y/u otros tejidos extracutáneos (criterio mayor); una morfología alterada de los mastocitos que forman (o no) los agregados (mastocitos alargados, con núcleo excéntrico, prolongaciones citoplasmáticas y/o hipogranulación)²⁰⁰; expresión aberrante de los marcadores CD25 (cadena α del receptor de la interleucina 2) y/o CD2 en los mastocitos²⁰¹; incremento de los niveles basales de triptasa sérica²⁰² y; presencia de mutaciones en el codón 816 de *KIT*. Estos cuatro últimos hallazgos son considerados por la OMS como criterios diagnósticos menores (Tabla 5). Según la misma clasificación de la OMS, para poder establecer el diagnóstico de MS son necesarios la presencia del criterio mayor y al menos uno de los cuatro criterios menores o, en ausencia del criterio mayor, la presencia simultánea de como mínimo tres criterios menores.

Desde el punto de vista etiopatogénico, tanto el criterio mayor como los criterios menores requeridos por la OMS para el diagnóstico de MS, están directamente relacionados con la mutación de *KIT*¹³⁷. Así, como consecuencia de la misma, y de la activación de las vías de señalización referidas anteriormente en esta introducción, los mastocitos expresan CD25 y en menor medida también CD2, remodelan su citoesqueleto²⁰³, adquiriendo un aspecto morfológico alterado asociado a degranulación e incremento de la liberación de mediadores como la triptasa sérica. Así mismo, el aumento del número de mastocitos está también relacionado con el efecto de *KIT* sobre la proliferación celular; al incrementarse el número de mastocitos se forman agregados mastocitarios en la MO y lesiones en la piel. Por todo lo anteriormente expuesto, resulta fácil entender porque en los últimos años las mutaciones en el codón 816 de *KIT*, y en especial la mutación D816V que está presente en la mayoría de los pacientes con MS¹⁴², han adquirido gran relevancia en el diagnóstico de la mastocitosis^{183,204}. Asimismo, se ha comprobado la mayor fiabilidad diagnóstica de la expresión aberrante de CD25 (presente en los mastocitos de MO de la práctica totalidad de las MS) respecto a CD2 (con frecuencia ausente en las formas agresivas de la

enfermedad)²⁰⁵, especialmente cuando la expresión de CD25 se estudia por citometría de flujo²⁰⁰.

Tabla 5. Criterios definidos por la OMS para el diagnóstico de MS.

CRITERIO MAYOR

- Presencia de infiltrados densos multifocales de mastocitos (agregados de ≥ 15 mastocitos) en médula ósea y/o en otros tejidos extracutáneos.

CRITERIOS MENORES

- Morfología atípica en más del 25% de los mastocitos de los agregados multifocales o, en ausencia de agregados, morfología atípica o inmadura en más del 25% de los mastocitos de médula ósea.
- Presencia de la mutación en el codón 816 del gen *KIT*.
- Expresión aberrante de los marcadores CD25 y/o CD2.
- Niveles basales de triptasa sérica aumentados de forma persistente ($>20\text{ng/mL}$)¹

Diagnóstico de MS si:

CRITERIO MAYOR + ≥ 1 CRITERIO MENOR

O

≥ 3 CRITERIOS MENORES EN AUSENCIA DEL CRITERIO MAYOR

¹Este criterio no sería valorable en presencia de neoplasia mieloide asociada. (adaptado de Horny *et al.*¹⁷⁵)

Además, la OMS ha definido una serie de hallazgos que van a permitir subclasificar las MS (Tabla 6) en función de que están presentes o ausentes en el paciente en el momento del diagnóstico (o aparezcan posteriormente a lo largo de la evolución) de la enfermedad. Estos hallazgos se agrupan en dos categorías, los hallazgos de tipo B, o hallazgos que delimitan el curso benigno de la enfermedad, y los hallazgos de tipo C, o hallazgos que implican necesidad de tratamiento citoreductor o quimioterápico¹⁷⁵. A modo de resumen, podemos decir que la presencia de un tipo u otro de hallazgos (B o C) contribuye a clasificar las MS entre variantes de comportamiento indolente y variantes más agresivas. Así, la presencia de los hallazgos de tipo B se relaciona con formas indolentes que estarían en fases iniciales de progresión (agravamiento) a formas agresivas. Por el contrario, la presencia de hallazgos de tipo C es característico de pacientes en los cuales el comportamiento clínico de la enfermedad es más agresivo pudiendo

llegar a comprometer y acortar la vida del paciente, en ausencia de tratamiento citoreductor.

Tabla 6. Hallazgos definidos por la OMS como relevantes a la hora de definir formas indolentes vs. agresivas de MS.

HALLAZGOS DE TIPO B

1. Infiltración de MO por > 30% de mastocitos y/o niveles de triptasa sérica aumentados (>20ng/mL)
2. Presencia de síntomas de displasia/mieloproliferación en líneas celulares hematopoyéticas distintas de la línea mastocitaria (pero insuficientes para diagnóstico de otra hemopatía) asociados a recuentos sanguíneos normales.
3. Hepatomegalía sin daño funcional hepático, esplenomegalia sin hiperesplenismo o linfadenopatías detectables por palpación o mediante técnicas de imagen.

HALLAZGOS DE TIPO C

1. Presencia de citopenias que evidencien un mal funcionamiento medular.
2. Hepatomegalia con disfunción funcional del hígado.
3. Evidencia de afectación ósea debido a la presencia de lesiones osteolíticas o de fracturas patológicas.
4. Esplenomegalia con hiperesplenismo.
5. Malabsorción con pérdida de peso.

(adaptado de Horny *et al.*¹⁷⁵)

3.2. Clasificación de las mastocitosis

De acuerdo a lo anteriormente expuesto, resulta evidente que bajo el término “mastocitosis” se incluye un grupo heterogéneo de enfermedades asociadas a manifestaciones biológicas y a comportamientos clínicos variables. En este espectro se incluyen según la OMS, además de los dos grupos principales antes referidos (CM y MS con sus formas indolentes y agresivas) otras variantes más raras de la enfermedad como el sarcoma de mastocitos y el mastocitoma extracutáneo hasta un total de 7 subtipos diferentes de mastocitosis.

3.2.1. Mastocitosis cutánea (CM)

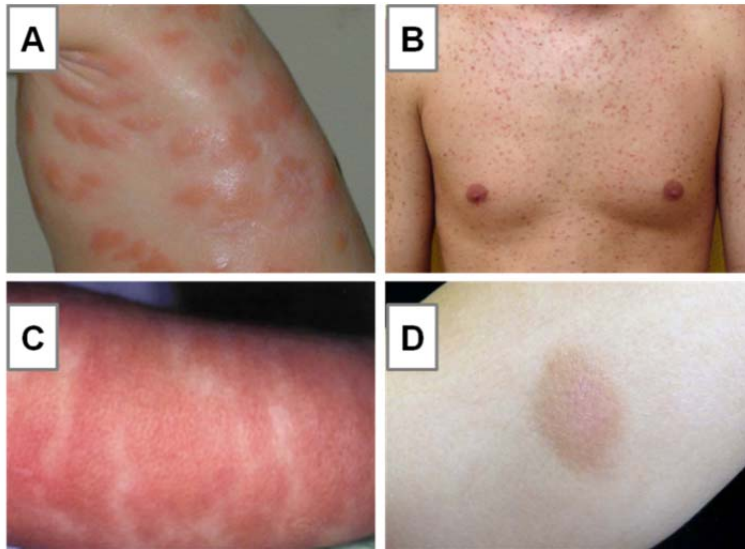
La CM es una enfermedad que suele aparecer habitualmente en la infancia y que en muchos casos desaparece de forma espontánea en la pubertad²⁰⁶, pese a que aproximadamente el 70% de los casos presentan mutación de *KIT*²⁰⁷. En los casos en los que la enfermedad persiste en la edad adulta se debe a la afectación sistémica de la enfermedad, asociada con relativa frecuencia ($\approx 35\%$ de los casos) a mutaciones activantes en el codón 816 de *KIT*¹⁵⁷.

Dentro de las mastocitosis cutáneas se identifican 3 subtipos clínicos principales: la UP y/o mastocitosis cutánea maculopapular (MCMP); la mastocitosis cutánea difusa y; el mastocitoma cutáneo solitario (Figura 8). De todos ellos la UP/MCMP es la forma más habitual, caracterizada en los niños que la padecen por lesiones papulares grandes pero de diferentes tamaños (polimórficas)²⁰⁸, mientras que en adultos este tipo de mastocitosis es más sutil asociándose a lesiones más pequeñas (Figura 9). Habitualmente se considera que los niños que presentan este tipo de lesiones tienen una CM pura y que un gran número de ellos se curará en la adolescencia. En contraposición con este grupo de CM, existe un pequeño porcentaje de niños que muestran CM asociada a pequeñas lesiones, más homogéneas en tamaño (monomórficas), parecidas a las que podemos encontrar en adultos²⁰⁸. Estos pacientes suelen tener afectación sistémica y en ellos, la enfermedad suele persistir en la edad adulta. Los mastocitos que forman ambos tipos de lesiones habitualmente presentan una morfología anormal y están distribuidos en “sábana” por las distintas capas de la dermis (papilar y reticular), frecuentemente con localización perivascular.

La CM difusa y el mastocitoma cutáneo son variantes de CM que se presentan de forma exclusiva en niños²⁰⁸. Los pacientes con CM difusa suelen mostrar una piel engrosada, en ocasiones con apariencia de “piel de naranja”, sin lesiones bien delimitadas. En este subtipo de lesiones cutáneas, los infiltrados se localizan a modo de banda en la dermis papilar y supraretilar. A su vez, el mastocitoma cutáneo habitualmente se caracteriza por la presencia de una única lesión formada por mastocitos maduros dispuestos en forma de “sábana”; el mastocitoma cutáneo suele localizarse en la dermis papilar y reticular pero puede

extenderse a capas más profundas de la dermis, e incluso afectar al tejido adiposo subcutáneo.

Figura 8: Imágenes ilustrativas de los distintos subtipos de lesiones cutáneas observadas en pacientes con mastocitosis. En los paneles A y B, las imágenes mostradas ilustran los dos tipos de lesiones típicas de la mastocitosis cutánea: UP de tipo papular (panel A) y UP de tipo macular (panel B). La imagen del panel C corresponde a un paciente con mastocitosis cutánea difusa y, por último, en el panel D se recoge una imagen de un mastocitoma cutáneo solitario.



(Adaptado de Horny *et al.*¹⁷⁵ y Yanagiohi *et al.*²⁰⁹)

3.2.2. Mastocitosis sistémica (MS)

La MS habitualmente se presenta con lesiones cutáneas de tipo UP/MCMP asociadas de forma sistemática a afectación extracutánea, principalmente a nivel de MO. Aunque los pacientes con MS comparten características que permiten agrupar bajo este epígrafe a un grupo amplio de pacientes con variantes clínicas de una enfermedad relativamente homogénea, las MS se subdividen en distintos subtipos dependiendo de sus características clínico-biológicas y de la presencia/ausencia de hallazgos de tipo B y C, según lo descrito previamente (Tabla 5). Con el objetivo de facilitar la estandarización de la clasificación diagnóstica de las MS, la Red Europea de Mastocitosis (ECNM) ha propuesto una serie de algoritmos que, aplicados junto con los criterios de la OMS, facilitan la clasificación diagnóstica (diferencial) de estos subtipos de

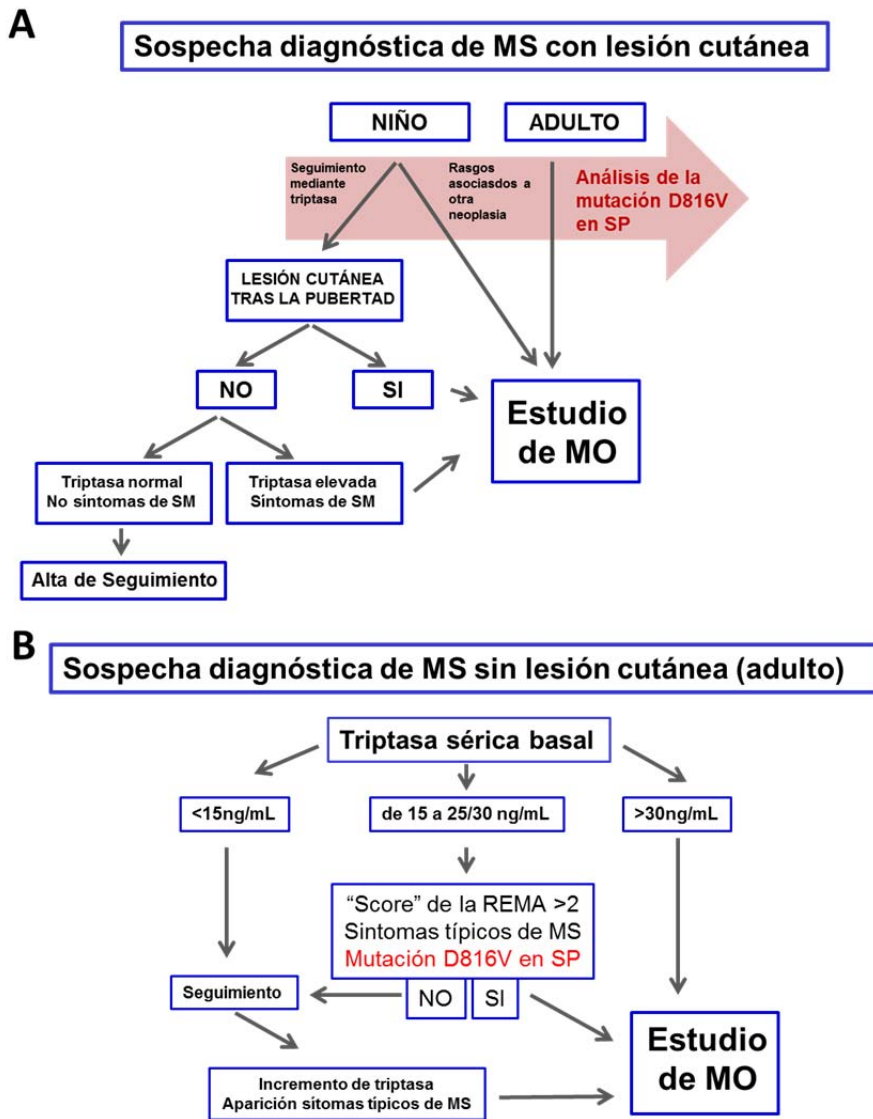
mastocitosis sistémica^{204,210}. En estos algoritmos se recomienda la monitorización del curso de la enfermedad mediante la medición regular de los niveles basales de triptasa sérica, así como el análisis de la presencia de la mutación D816V en SP, como fases previas al estudio de MO (Figura 9), especialmente en niños o pacientes con enfermedad indolente clínicamente asintomática.

3.2.2.1. Mastocitosis sistémica indolente (MSI)

La MS indolente (MSI) es el subtipo más frecuente de MS^{200,211} y se caracteriza por la presencia de agregados de mastocitos en la MO, cumpliendo de este modo el criterio mayor de la OMS. Además, es frecuente la presencia de mastocitos con morfología atípica y expresión aberrante de las moléculas CD25 y/o CD2. Por otra parte, la gran mayoría de estos pacientes (75%) presentan niveles basales de triptasa sérica superiores a 20ng/mL²⁰⁰ y se detecta la presencia de la mutación D816V en más del 70% de los casos²⁰⁰. La MSI puede a su vez subdividirse en tres categorías, en función de las características clínicas que presentan.

De estos subtipos de MSI, el más frecuente es la MSI con lesión cutánea (MSIs⁺); en él, la mutación D816V de *KIT* se detecta en los mastocitos en la práctica totalidad de los pacientes, afectando a otras líneas hematopoyéticas distintas del mastocito en aproximadamente un tercio de los casos^{184,200}. En la MSIs⁺ típica no se observan hallazgos B o C, ni rasgos que sugieran la presencia de otra hemopatía asociada.

Figura 9: Representación esquemática del algoritmo diagnóstico propuesto por la ECNM para el diagnóstico de MS, tanto en pacientes que presentan lesiones cutáneas (panel A) como en los que estas no se observan (panel B).



(adaptado de Valent *et al.*²⁰⁴).

El segundo subtipo de MSI identificado por la OMS es la mastocitosis de MO, también denominada MSI sin lesión cutánea (MSI⁻)¹⁷⁵. En este subgrupo se incluyen sobre todo varones que suelen presentar niveles de triptasa sérica más bajos que la MSI⁺, con manifestaciones clínicas asociadas frecuentemente a síntomas de liberación y/o anafilaxia mediada por himenópteros^{198,212}. La

frecuencia de la mutación D816V de *KIT* en la MSI⁻ es ligeramente más baja que en la MSI⁺, y rara vez se encuentra afectación por la mutación de otras líneas hematopoyéticas distintas del mastocito^{175,200}.

Finalmente, el tercer subtipo de MSI corresponde a un subgrupo de pacientes con MSI que muestran un porcentaje más elevado de mastocitos en MO, asociado a 2 o más características definidas como hallazgos de tipo B; se trata de la MS quiescente o “smouldering” (MSS)^{202,213}. Estos pacientes, aunque con frecuencia presentan síntomas constitucionales como fatiga crónica o pérdida de peso, no reúnen los criterios requeridos para ser clasificados como MS agresiva (MSA) (*i.e.* no presentan hallazgos de tipo C). No obstante, de forma similar a la MSA, en la MSS la mutación D816V de *KIT* suele estar presente tanto en los mastocitos como en células de otras líneas hematopoyéticas mieloides (e incluso linfoides) de MO.

3.2.2.2. Mastocitosis sistémica agresiva (MSA)

La MSA representa algo más del 10% de todas las MS²¹¹. Los pacientes con MSA, además de cumplir los criterios diagnósticos requeridos por la clasificación de la OMS para definir esta entidad, suelen presentar valores de triptasa sérica basal superiores a 200ng/mL, asociados a un cuadro clínico más severo que el de la MSI y que habitualmente incluye la presencia de organomegalias y afectación ósea^{200,210,214} (p. ej. esclerosis ósea o lesiones líticas) entre otras lesiones, características clínico-biológicas definidas como hallazgos de tipo C¹⁷⁵. En estos pacientes, la mutación D816V de *KIT* suele afectar a toda la hematopoyesis, detectándose su presencia tanto en las líneas mieloides como en las líneas linfoides B y/o T.

3.2.2.3. Mastocitosis sistémica asociada a otra hemopatía (MS-AHNMD)

La MS-AHNMD constituye un subgrupo heterogéneo de MS. Esta heterogeneidad viene dada tanto por el tipo de mastocitosis, como por la hemopatía de línea no mastocitaria (componente AHNMD) concreta que se

asocia a la MS^{175,200}. Así, la mastocitosis puede ser tanto MSI como MSA, mientras que la hemopatía más frecuentemente asociada a esta entidad suelen ser una hemopatía maligna de línea mieloide (síndrome mielodisplásico, neoplasia mieloproliferativa o LMA) o menos frecuentemente, de línea linfoide²⁰⁰. En este sentido, merece destacar que las MS-AHNMD en las que la MS se asocia a una hemopatía de línea mieloide, suele existir afectación de múltiples líneas celulares hematopoyéticas (multilineal) para la mutación D816V de *KIT* (MS multilineal), mientras que aquellas MS-AHNMD que presentan una hemopatía linfoide asociada suelen mostrar mutación D816V de *KIT* restringida al compartimento mastocitario (MS restringida a mastocito)²¹⁵.

3.2.2.4. Leucemia de mastocitos (MCL)

La leucemia de mastocitos, es de todas las variantes de MS, la más agresiva y la que tiene peor pronóstico; afortunadamente, es también la variante menos frecuente de MS (<2% de todos los pacientes). Los pacientes con MCL muestran infiltración de la MO, por mastocitos, superior al 20% de la celularidad global; estos mastocitos suelen mostrar un fenotipo inmaduro y/o incluso presentarse en forma de blastos metacromáticos^{175,200,210}. Los pacientes con MCL habitualmente presentan organomegalias con pérdida de función del órgano afectado²¹³. Aun así, este grupo de pacientes sigue presentando también una alta heterogeneidad en cuanto a los criterios definidos por la OMS para el diagnóstico de MS. Así, pueden presentar o no lesión cutánea, expresión aberrante de CD25 y/o CD2, en presencia o ausencia de mutaciones en el codón 816 de *KIT*. Con el fin de clasificar mejor estos pacientes, la ECNM ha propuesto recientemente una clasificación para la MCL, similar a la de otros tipos de leucemias²¹⁶. En esta clasificación, además de la variante aleucémica, que correspondería a los pacientes con infiltración en SP inferior a 10%, se distingue entre MCL “*de novo*” vs. MCL secundaria, y MCL crónica vs. MCL aguda²¹⁶.

3.2.2.5. Mastocitosis sistémica bien diferenciada (MSBD)

A pesar de que en la clasificación actual de MS de la OMS sigue sin reconocerse la MSBD como un subtipo específico de MS, son cada vez más los

estudios en los que se hace referencia a este subtipo de la enfermedad. Así, hoy se sabe que la MSBD representaría aproximadamente un 5% de los pacientes con mastocitosis²⁰⁰. De forma característica, los pacientes con MSBD presentan agregados de mastocitos en MO con morfología típica de mastocito maduro, sin expresión (o con expresión débil) de los marcadores CD25 y/o CD2, asociada a niveles elevados de expresión de enzimas intracitoplasmáticas (como carboxipeptidasa A) en ausencia, en la mayor parte de los pacientes, de mutaciones en el codón D816 de *KIT*¹⁹⁷. Estas características hacen que un elevado porcentaje de pacientes con MSBD (aproximadamente el 40%) no cumplan de forma estricta los criterios diagnósticos de la OMS para MS²⁰⁰, pese a presentar enfermedad clínicamente manifiesta. Por este motivo, se han propuesto criterios diagnósticos complementarios que ayudarían a definir con mayor precisión este subgrupo de MS¹⁹⁷. En esta propuesta, se define como criterio principal la presencia de agregados compactos de mastocitos en MO; a su vez, como criterios menores adicionales se incluirían: i) expresión aberrante de CD30 y/o sobreexpresión de carboxipeptidasa A y/o triptasa, detectada por citometría de flujo, y ii) existencia de mastocitos clonales con o sin mutación en el gen *KIT*. De forma característica, la MSBD suelen presentarse además en mujeres adultas con mastocitosis de inicio pediátrico o de tipo familiar¹⁹⁷.

3.2.3. Sarcoma de mastocitos

El sarcoma de mastocitos se caracteriza por ser un tumor de crecimiento local pero destructivo, compuesto por mastocitos atípicos. Se trata de una enfermedad extremadamente rara y su diagnóstico se realiza tras la identificación de la presencia en la lesión tumoral de mastocitos mediante marcadores inmunohistoquímicos habituales como CD117 (*KIT*) y/o triptasa. Habitualmente, esta enfermedad no presenta afectación sistémica, si exceptuamos las crisis anafilácticas, frecuentes en algunos pacientes. Aunque habitualmente se trata de lesiones tumorales localizadas, en algunos casos la enfermedad puede progresar con diseminación leucémica en fases avanzadas (terminales) de la misma^{175,210}. El estudio de las mutaciones del gen *KIT* que pueden presentarse en este subtipo de mastocitosis no está bien documentado

en la literatura, probablemente debido a que se trata de una enfermedad muy poco frecuente. A pesar de ello, recientemente se ha publicado una revisión sobre las formas de presentación clínica de la enfermedad donde se reflejan en los resultados del análisis de mutaciones de *KIT* en 7 de los 20 pacientes estudiados²¹⁷. En 4 de estos 7 pacientes se identificaron mutaciones de *KIT*: en 3 la mutación afectaba al dominio TK2 (L799F¹⁷⁰, D816V²¹⁸ y N822K²¹⁹) y en el cuarto paciente se detectó una mutación en el dominio yuxtamembrana (V560G)²²⁰.

3.2.4. Mastocitoma extracutáneo

El mastocitoma extracutáneo es otra de las variantes extremadamente raras de mastocitosis. Actualmente se considera que el mastocitoma extracutáneo es un tumor localizado, con un comportamiento benigno, derivado de la acumulación de mastocitos patológicos en un tejido extracutáneo, frecuentemente el pulmón. Este subtipo de mastocitosis no suele progresar a forma leucémica o sistémica¹⁷⁵. Debido probablemente a que el mastocitoma extracutáneo es de las variantes más raras de mastocitosis no existe información sobre la incidencia de mutaciones de *KIT* en este subtipo diagnóstico de mastocitosis.

3.3. Pronóstico y tratamiento de la mastocitosis

Debido a su heterogeneidad clínica y biológica, la mastocitosis presenta también un pronóstico variable dependiendo en gran medida del subtipo de mastocitosis concreto de que se trate y, dentro de este, de los rasgos clínicos asociados. Así, los pacientes con variantes más indolentes suelen tener una esperanza de vida similar a la de la población general^{177,187}, mientras que las variantes más agresivas, como la MCL, pueden provocar el fallecimiento del paciente en pocos meses^{175,184,211}. En este sentido, la CM suele presentar un pronóstico favorable, observándose incluso remisiones espontáneas de la enfermedad tras la pubertad¹⁷⁵, en un porcentaje significativo de los niños que presentan este subtipo de mastocitosis. Sin embargo, es frecuente también que

los pacientes con CM presenten sintomatología asociada a síndrome de activación mastocitaria y liberación de mediadores mastocíticos por lo que requieren con alguna frecuencia, tratamiento urgente y hospitalización²²¹ (p. ej. por episodios severos de anafilaxia). En contraposición con la CM, las formas más agresivas de MS, como la MCL o la MSA, muestran medianas de supervivencia claramente acortadas (mediana de 2 y de 41 meses, respectivamente) respecto a la de los pacientes con MSI (mediana de 198 meses)^{184,211}. A pesar de que la MSI no presenta una esperanza de vida significativamente menor que la de la población general²⁰¹, merece destacar que con relativa frecuencia en este subgrupo de MS se observa afectación por la mutación D816V de las líneas hematopoyéticas mieloides (o incluso mieloides y linfoides), parámetro que se ha descrito constituiría el factor pronóstico adverso independiente más relevante, a la hora de predecir progresión de MSI a formas más agresivas de la enfermedad (p. ej. MSS, MSA, MS-AHNMD y MCL)¹⁸⁴.

En línea con lo anteriormente expuesto en relación con el pronóstico de los diferentes subtipos de mastocitosis, actualmente, el tratamiento más habitual de la mastocitosis está basado en la adopción de tratamientos sintomáticos para controlar los efectos provocados por la liberación de mediadores mastocitarios, cuya aplicación es requerida, en general, en aquellas mastocitosis que cursan con síntomas de liberación. Este tipo de aproximación terapéutica (anti-mediador) incluye como primera opción, la administración de anti-histamínicos para controlar los síntomas relacionados con la liberación de histamina, como son el prurito y la taquicardia. En función de la respuesta obtenida a este tipo de tratamiento y dependiendo de los síntomas del paciente, el tratamiento anti-mediador puede incluir además otros inhibidores y/o agentes estabilizantes del mastocito^{222,223} como el cromoglicato de sodio; este último compuesto es capaz de inhibir la activación y degranulación del mastocito demostrando ser esencial en el tratamiento de manifestaciones clínicas de liberación mastocitaria, sobre todo de las asociadas al tracto respiratorio²²⁴ y/o al aparato gastrointestinal²²⁵. Además, la administración de cromoglicato sódico de manera tópica también es muy útil para el control del prurito. Del mismo modo, el tratamiento con glucocorticoides es efectivo para el tratamiento de síntomas cutáneos, ayudando

además a controlar algunas complicaciones más graves como la malabsorción, la fibrosis hepática y la ascitis²²⁶. El tratamiento de las manifestaciones de la enfermedad a nivel óseo (p.ej. osteoporosis, osteopenia y/o lesiones líticas), debido a la infiltración de la MO por los mastocitos y a la liberación de mediadores mastocitarios (p. ej. histamina), incluye el uso de bifosfonatos acompañado de calcio y vitamina D²²⁶.

En contrapartida, el tratamiento con agentes citostáticos y/o citorreductores se restringe a pacientes que presentan variantes agresivas de la enfermedad (p. ej. MSA, MCL y/o MS-AHNMD) y está dirigido fundamentalmente a controlar la expansión del mastocito neoplásico, con el fin de evitar las consecuencias del daño orgánico que éste pueda provocar. En estos pacientes con variantes agresivas de MS resulta fundamental conocer el estado mutacional de *KIT*, debido a que uno de los fármacos anti-TK más comunes, el Imatinib (STI571), no es efectivo en pacientes con mutación en el codón D816 y sí en pacientes con mutaciones en las regiones extracelular y yuxtamembrana de *KIT*^{152,172,227-229}. Debido a que la mutación D816V de *KIT* es la mutación más frecuente en la MS, el tratamiento más habitual de la MS con comportamiento agresivo incluye fármacos citorreductores²⁰², de entre los que la cladribina (2CdA) y el interferón- α (IFN α) son los agentes más empleados y eficaces en el control de los síntomas relacionados con las lesiones mastocitarias a nivel tisular y de la enfermedad²³⁰. Sin embargo, merece destacar que en la actualidad se reconoce que la eficacia de estos agentes es relativa y su efecto beneficioso no suele mantenerse durante largos períodos de tiempo, llevando con frecuencia al empleo de estrategias poliquimioterápicas o al uso de terapias experimentales.

Precisamente, debido a que los tratamientos citorreductores antes mencionados no cuentan con la efectividad deseada, siendo en la mayoría de los casos muy difícil el control de la enfermedad, se siguen desarrollando y ensayando tratamientos más específicos, especialmente aquellos basados en el diseño de pequeñas moléculas inhibitoras dirigidas frente a *KIT* y/o sus vías de señalización y anticuerpos monoclonales frente a proteínas de membrana. Dentro del primer grupo cabe resaltar el Imatinib^{227,228} y el Masitinib²³¹, fármacos

del grupo de los inhibidores de receptores TK (TKRI) efectivos en aquellos pacientes en los que se detectan mutaciones de *KIT* fuera del dominio TK2²³¹; en contraposición con estos dos TKRI, Dasatinib²³² ha mostrado un efecto “*in vivo*” relativamente limitado y asociado a importantes efectos secundarios como por ejemplo la aparición de derrame pleural²³³, mientras que la Midostaurina (PKC412) parece incrementar la supervivencia de los pacientes con mastocitosis de curso agresivo, a pesar de no lograr alcanzarse habitualmente con este fármaco una remisión completa de la enfermedad²³⁴. Además de los TKRI anteriormente citados, existe otra serie de moléculas que, tras mostrar eficacia en estudios “*in vitro*”, se encuentran actualmente en evaluación en ensayos clínicos en distintas fases; entre ellas se incluyen la Tiazolamina²³⁵, el Tandutinib²³⁶, el Semaxinib²³⁷ y el EXEL-0862²³⁸, además del Blu-285, un fármaco que ha mostrado una efectividad superior al 90% en modelos murinos²³⁹.

En paralelo, en los últimos años se ha incrementado de forma notable el número de anticuerpos monoclonales dirigidos frente a antígenos tumorales disponibles y testados en un amplio abanico de ensayos clínicos. De todos ellos, algunos constituirían potenciales candidatos para el tratamiento de la MS al estar dirigidos frente a proteínas expresadas por el mastocito patológico (e incluso por sus células precursoras). Así, en este grupo de fármacos se incluyen anticuerpos monoclonales frente a CD13, CD25, CD30, CD33, CD44, CD45 y CD52. No obstante, la utilización de anticuerpos monoclonales dirigidos frente a algunas de estas proteínas como CD13 y CD45, es de prever que afecten a varias líneas celulares, y no específicamente al mastocito patológico (revisado por Valent *et al.*²⁴⁰), lo cual podría acarrear una importante toxicidad hematológica. Por el contrario, existen ensayos y/o casos clínicos referidos en la literatura, incluyendo algunos que recogen la experiencia de la REMA, en la que se han empleado anticuerpos anti-CD25, CD30, CD33 y CD52, para el tratamiento de pacientes con formas avanzadas de MS. De los resultados obtenidos cabe señalar de forma especial los referidos con anti-CD30 ya que se trata de una proteína que no suele expresarse en condiciones fisiológicas, lo que la convierte en una diana específica del mastocito patológico adecuada para el tratamiento de la mastocitosis^{241,242}. Actualmente se está evaluando la eficacia de un anticuerpo anti-CD30 unido al

agente antimitótico monometil auristatina E (MMAE) en un ensayo clínico de fase III (ClinicalTrials.gov número NCT01807598). Por otro lado, también existen resultados prometedores con el uso de terapia anti-CD52 (CAMPATH-1 o Alemtuzumab), habiéndose demostrado su capacidad para inducir muerte de mastocitos patológicos CD52⁺ de pacientes con MS²⁴³. Además, este último tratamiento, al haberse aplicado en un modelo de xenotransplante en ratón inmunodeficiente sobre células de la línea MCPV-1, se ha comprobado induce un incremento significativo de la supervivencia de aquellos ratones tratados frente a los no tratados (mediana de supervivencia de 46 vs. 31 días), asociado a una reducción significativa de la infiltración tisular y de las células leucémicas circulantes²⁴³. A su vez, CD33 es un marcador que se expresa en células de línea mieloide tanto normales como tumorales, incluido el mastocito normal y patológico y el precursor del mastocito de las formas más avanzadas de mastocitosis, frente al cual existe un fármaco (Mylotarg)²⁴⁴ compuesto por un anticuerpo humanizado anti-CD33 (gemtuzumab) conjugado con un agente citostático (ozogamicina), cuya efectividad en mastocitosis está aún por confirmar.

Pese a todo el arsenal terapéutico disponible y los avances alcanzados en el tratamiento de la MS, en la actualidad seguimos sin disponer de un tratamiento curativo universal para este grupo de enfermedades.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

La MS es el subtipo más frecuente de mastocitosis del adulto presentando un elevado grado de heterogeneidad en cuanto a su comportamiento y evolución clínica. En la actualidad son muchos los estudios en los que se describe que la mayoría de los pacientes con MS presentan la mutación D816V, e incluso que demuestran la presencia de esta mutación en otras células hematopoyéticas distintas del mastocito, por lo que implícitamente se considera que la mutación D816V de *KIT* podría ser un requisito indispensable para la manifestación o persistencia de la mastocitosis en la edad adulta. Sin embargo, en el momento de iniciar este trabajo existían también estudios que contradecían esta hipótesis, ya que describían la presencia de la mutación D816V en pequeños porcentajes de pacientes y, nunca identificaban esta mutación en otras líneas hematopoyéticas. Estas discrepancias pueden deberse tanto al tipo de pacientes seleccionados e incluidos en las diferentes series en función de su subtipo diagnóstico, como a diferentes niveles de sensibilidad de los métodos empleados para el análisis de la mutación. Por lo tanto, para esclarecer los mecanismos de la enfermedad sería clave establecer cuál es el porcentaje real de pacientes con MS que presentan esta mutación, determinar en qué momento de la ontogenia ocurre la mutación, si existen otras líneas hematopoyéticas que puedan estar afectadas por ella y con qué frecuencia aparecen, determinando además si la existencia de un patrón diferente de afectación de la hematopoyesis por la mutación de *KIT* se traduce en un comportamiento clínico distinto de la enfermedad.

Este conocimiento permitiría sin duda, comprender mejor la heterogeneidad de la MS desde un punto de vista clínico-biológico, a la vez que proporcionaría información clave para la estratificación pronóstica de la enfermedad y para un mejor seguimiento, tratamiento y control de la misma.

Ante estos antecedentes, en el presente trabajo doctoral hemos planteado como **objetivo general** determinar con precisión la frecuencia con la que los pacientes con mastocitosis presentan mutación de *KIT*, el grado de afectación de la hematopoyesis y de las células de la MO por la mutación y su posible correlación con la presencia de la mutación en SP y la evolución clínica de la enfermedad. Para ello, nos hemos propuesto tres **objetivos concretos**:

- Determinar la frecuencia real de las mutaciones de *KIT* y en especial de la mutación D816V de *KIT*, en los mastocitos patológicos de pacientes con MS, y conocer el grado de afectación del resto de líneas celulares hematopoyéticas de la MO.
- Establecer la frecuencia con la que se detecta la presencia de la mutación D816V de *KIT* en SP de pacientes con MS y correlacionar el grado de afectación por dicha mutación en SP, con el grado de afectación de la hematopoyesis medular.
- Investigar la posibilidad de que la mutación D816V de *KIT* esté presente en células MSC de MO y determinar el impacto que éste hallazgo pudiera tener en la evolución a medio y largo plazo de la enfermedad.

MATERIAL, MÉTODOS
Y RESULTADOS



En esta sección de la memoria se describen los pacientes, materiales y métodos empleados, así como los resultados obtenidos en el presente trabajo doctoral, mediante la inclusión de los artículos originales publicados en relación con la hipótesis y objetivos planteados. Cada uno de los artículos viene precedido por un resumen redactado en castellano para facilitar una revisión rápida de la información contenida en los mismos.

ARTÍCULO 1

“Mutación de *KIT* en mastocitos y otras líneas celulares hematopoyéticas en mastocitosis sistémica: estudio prospectivo de una serie de 113 pacientes de la Red Española de Mastocitosis (REMA)”

Introducción: La mastocitosis incluye un grupo heterogéneo de enfermedades caracterizadas por la proliferación y acumulación de mastocitos en distintos tejidos. A pesar de la importancia de la detección de la mutación en *KIT*, tanto para demostrar el carácter clonal de la MS como para su tratamiento, hasta el momento en el que iniciamos este trabajo se desconocía cuál era el porcentaje exacto de pacientes con MS portadores de mutaciones de *KIT*, así como el grado de afectación de otras líneas celulares hematopoyéticas de MO por estas mutaciones.

Objetivo: En este trabajo nos propusimos determinar la incidencia de las mutaciones que afecten al codón 816 de *KIT* y en especial la mutación D816V de *KIT* en MS, y determinar el grado de afectación de la hematopoyesis por esta mutación en los distintos subtipos diagnósticos de MS.

Pacientes, materiales y métodos: En conjunto, analizamos de forma prospectiva la presencia de la mutación D816V de *KIT* en mastocitos purificados de MO de 113 pacientes con MS, distribuidos en los siguientes subgrupos diagnósticos: MSIs⁺, 74 pacientes; MS-AHNMD, 13 casos; MSIs⁻, 7 pacientes; MSBD, 7 casos; MSA, 6 casos y MCL, 6 pacientes. Además, en un subgrupo de 67 de estos pacientes analizamos la presencia de la mutación D816V en diferentes

poblaciones celulares hematopoyéticas purificadas de MO, distintas de la línea mastocitaria. La separación de las distintas poblaciones celulares se realizó mediante citometría de flujo y el análisis de la mutación se llevó a cabo mediante la técnica de PCR en tiempo real de alta sensibilidad, una técnica de PCR empleando sondas de hibridación específicas de secuencia del exón 17 de *KIT* donde se localiza la mutación D816V y bloqueo de la amplificación del ADN silvestre mediante un oligonucleótido de PNA (PNA-PCR).

Resultados: Nuestros resultados muestran la presencia de la mutación D816V en los mastocitos purificados del 93% de los pacientes. En más detalle, la mutación estaba presente en prácticamente todos los subgrupos diagnósticos de pacientes con MS (MSIs⁺: 97%; MSIs⁻: 88%; MS-AHNMD: 100%; MSA: 100%; MCL: 67%), a excepción de las MSBD, entre las que solo se identificó la mutación en el 14% de los pacientes. Un pequeño porcentaje (<3%) de los pacientes analizados mostró mutaciones, distintas de la mutación D816V, en la misma región de *KIT*. En aproximadamente el 30% de los casos, la mutación además de estar presente en los mastocitos fue positiva también en, al menos, otra línea celular hematopoyética mieloide y/o linfóide. Aunque la presencia de la mutación multilineal se detectó también en un subgrupo de pacientes con MSIs⁺ (27%), éste era un patrón especialmente característico de las formas más agresivas de MS (MSA, MS-AHNMD y MCL), encontrándose en más del 80% de estos pacientes afectación de dos o más líneas celulares hematopoyéticas de MO por la mutación D816V.

Conclusiones: De acuerdo con nuestros resultados, la presencia de la mutación D816V puede considerarse como un marcador genético de MS, al estar presente en prácticamente todos los pacientes y subgrupos diagnósticos, a excepción de MSBD. La presencia de la mutación en otras líneas celulares hematopoyéticas además del mastocito es un hallazgo típico de las formas más agresivas de la enfermedad, estando presente también en un subgrupo de MSIs⁺, lo cual apoya la hipótesis del posible origen de la enfermedad en una célula precursora (*i.e.* "stem") hematopoyética (CPH) y podría reflejar el predominio de mutación multilineal en las formas más avanzadas y/o agresivas de la enfermedad.

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

Andres C. Garcia-Montero, Maria Jara-Acevedo, Cristina Teodosio, Maria Luz Sanchez, Rosa Nunez, Aranzazu Prados, Isabel Aldanondo, Laura Sanchez, Mercedes Dominguez, Luis M. Botana, Francisca Sanchez-Jimenez, Karl Sotlar, Julia Almeida, Luis Escribano, and Alberto Orfao

Despite the relevance of the c-kit/stem cell factor (SCF) signaling pathway in mast cell (MC) diseases, the exact frequency of *KIT* mutations in different compartments of bone marrow (BM) hematopoietic cells of individuals with systemic mastocytosis (SM), and its different diagnostic categories, remains unknown. In this study, we prospectively analyzed the presence of *KIT* mutations in fluorescence-activated cell-sorting (FACS)-purified populations of BM MCs (n = 113) and other BM cell compartments (n = 67)

from adults with SM. Our results show the presence of D816V *KIT* mutation in virtually all adults (93%) with indolent and aggressive forms of SM, except well-differentiated SM (29%), while other *KIT* mutations were rarely (< 3%) detected. In around one-third of patients with mutated MCs, the *KIT* mutation was also detected in CD34⁺ hematopoietic cells and eosinophils, and, to a lesser extent, in monocytic, neutrophil-lineage BM precursor cells and lymphocytes. Most patient with poor-prognosis SM (81%) carried the *KIT*

mutation in 2 or more BM myeloid cell populations, while this was detected in a smaller proportion (27%) of indolent cases. These results would support the notion that *KIT* mutation is a hallmark of adult SM where it targets a pluripotent hematopoietic stem cell, and may contribute to explaining previously observed discrepancies in the literature. (Blood. 2006; 108:2366-2372)

© 2006 by The American Society of Hematology

Introduction

Mast cell diseases (MCDs) are a heterogeneous group of disorders characterized by an abnormal proliferation and accumulation of mast cells (MCs) in different tissues. In a relatively high proportion of cases, the clonal nature of the disease can be established on the basis of the demonstration of gain-of-function mutations involving the tyrosine kinase domain of c-kit in lesional skin and bone marrow (BM) cells.¹⁻⁹ Typically, the A7176→T substitution is detected, whereby an aspartate is changed for a valine at codon 816 of the c-kit protein sequence. However, other uncommon somatic (V560G,¹⁰ D815K,¹¹ D816Y,^{2,11,12} D816F,^{2,11} D816H,¹³ and D820G¹⁴) and germ-line (F522C,¹⁵ A533D,¹⁶ K509I,¹⁷ and del419¹⁸) mutations, which may result in a ligand-independent activation of the stem cell factor receptor, have been reported, most frequently in individual cases. Presence of the *KIT* mutations in patients with systemic mastocytosis (SM) is not restricted to BM MCs, but it has also been sporadically reported in other non-MC hematopoietic

lineages,^{7,19-24} suggesting that expansion of clonal MCs may arise from an uncommitted hematopoietic stem cell. However, attempts to demonstrate the presence of *KIT* mutation in purified CD34⁺ hematopoietic precursor cells have failed so far.²⁵

The pathogenetic relevance of the different *KIT* mutations in MCDs is still not fully understood; however, their identification has become of major prognostic significance²⁶ due to the availability of protein kinase inhibitors such as imatinib (STI571, Gleevec; Novartis, Basel, Switzerland). These new targeted drugs have proven to be of limited efficacy in patients with MCD carrying the D816V-activating *KIT* mutation, while they are effective in cases displaying other *KIT* mutations (eg V560G,^{27,28} F522C,¹⁵ K509I,¹⁷ and del419¹⁸). Despite this, the frequency of the D816V *KIT* mutation in SM is highly variable in the literature,^{2,3,7,11} even once the analysis is restricted to patients showing the same type of MCD.^{3,5,9,29} Accordingly, in adult patients, the frequency of the

From the Servicio General de Citometría, Centro de Investigación del Cáncer, and Departamento de Medicina, Universidad de Salamanca, Spain; Unidad de Mastocytosis, Laboratorio K. Frank Austen, Hospital Ramón y Cajal, Madrid, Spain; Servicio de Inmunología, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain; Departamento de Farmacología, Facultad de Veterinaria, Universidad de Santiago de Compostela (USC), Lugo, Spain; Departamento de Biología Molecular y Bioquímica, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga, Spain; and the Institute for Pathology, University of Tübingen, Germany.

Submitted April 7, 2006; accepted May 20, 2006. Prepublished online as *Blood* First Edition Paper, June 1, 2006; DOI 10.1182/blood-2006-04-015545.

A complete list of the contributing members of the Spanish Network on Mastocytosis appears in "Appendix."

Supported by grants from the Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS) of the Ministerio de Sanidad y Consumo of Spain (03/0770; and REMA, G03/007);

from the Ministerio de Ciencia y Tecnología (SAF02-03 096); from the Comunidad Autónoma de Madrid (GR/SAL/0133/2004) and from the Fundación MMA. A.C.G.-M. is supported by a grant from FIS/Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) (CP03/00035); C.T. is supported by a grant from the Fundação Ciência Tecnológica (FCT) of Portugal (SFRH/BD/17545/2004); M.J.-A., R.N., and A.P. are supported by a grant from FIS (G03/007); and L.S. is supported by a grant from FIS (CMO3/0043).

A.C.G.-M. and M.J.-A. have contributed equally to this work. L.E. and A.O. have also contributed equally to this work.

Reprints: Alberto Orfao, Centro de Investigación del Cáncer, Campus Miguel de Unamuno, 37007 Salamanca, Spain; e-mail: orfao@usal.es.

The publication costs of this article were defrayed in part by page charge payment. Therefore, and solely to indicate this fact, this article is hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. section 1734.

© 2006 by The American Society of Hematology

Table 1. Systemic mastocytosis: demographics and clinical characteristics of the study population according to disease category

Category	No. of patients	Median age, y (range)	Sex, M/F	Median WBC count, × 10 ⁹ /L (range)	Median BM mast cells, % (range)	UP, %	Hepatomegaly, %	Splenomegaly, %	Eosinophilia, %	KIT mutation test before treatment, %
MCL	6	69 (37–76)	4/2	4.7 (1.5–13.4)	36 (25–60)	0	67	67	50	100
ISM	74	45 (21–79)	34/40	6.2 (4.3–15.7)	0.14 (0.013–1.65)	99	5.4	4	14	100
SM-ana	7	46 (19–70)	5/2	4.9 (3.9–8.2)	0.15 (0.035–0.26)	0	0	0	0	100
WDSM	7	23 (12–73)	2/5	5.6 (4.0–6.2)	0.30 (0.008–12)	100	0	0	0	100
ASM	6	55 (25–77)	5/1	4.8 (2.7–20.1)	1.85 (0.02–19)	33	83	100	0	67*
SM-AHNMD	13	72 (37–83)	8/5	6.1 (1.8–21.3)	0.60 (0.013–7.4)	62	23	23	23	92*

UP indicates urticaria pigmentosa.

*In those 3 patients tested at time of therapy (1 SM-AHNMD and 2 ASM), all cell populations tested were positive for the D816V KIT mutation.

D816V KIT mutation varies from 31%³⁰ to virtually all cases.⁵ Such variability could be due to the relatively low number of cases included in most studies, to patient selection with predominance of aggressive versus indolent forms of the disease and/or to the sensitivity of the methods used to assess the presence/absence of KIT mutations, particularly in cases with low MC burden.

In the present study, we have prospectively analyzed the presence of KIT mutations in fluorescence-activated cell-sorting (FACS)-purified populations of immunophenotypically aberrant BM MCs from a series of 113 patients with SM. In addition, in a subgroup of 67 patients with SM associated with KIT mutations, the presence of the mutation was also explored in other BM cell compartments.

Patients, materials, and methods

Patients

In the present study, a total of 113 adults who were consecutively diagnosed with SM at the reference centers of the Spanish Network on Mastocytosis (REMA) (Mast Cell Unit of the Hospital Ramón y Cajal, Madrid, Spain; and Department of Cytometry of the Cancer Research Center, Salamanca, Spain) were analyzed. In all cases, informed consent was obtained prior to the study, according to the guidelines of the local ethics committees.

According to the World Health Organization (WHO) criteria,^{31,32} patients were classified as follows: indolent systemic mastocytosis (ISM), 74 patients; aggressive systemic mastocytosis (ASM), 6 patients; systemic mastocytosis associated with a clonal non-mast-cell lineage hematopoietic disease (SM-AHNMD), 13 patients; and mast cell leukemia (MCL), 6 patients. In addition, 7 patients with well-differentiated systemic mastocytosis (WDSM)¹⁵ and 7 patients with systemic mastocytosis without skin

involvement associated with recurrent anaphylaxis or vascular collapse (SM-ana)³³ were also studied. Diagnosis included a complete clinical and physical work-up, a routine blood cell count and white blood cell (WBC) differential, routine serum biochemistry tests and measurement of serum tryptase levels (Pharmacia, Uppsala, Sweden), abdominal ultrasonography and/or computed tomography (CT) scan, bone densitometry and X-rays of the bones; furthermore, magnetic resonance imaging (MRI) was performed in selected cases. Skin biopsy was performed in all cases with cutaneous lesions. A complete BM study was performed in all cases following previously established criteria for morphology,³⁴ histology, and immunohistochemistry.^{35,36} In addition, 4-color multiparameter flow cytometry immunophenotypic analysis of BM MCs was performed according to the recommendations of the Spanish Network on Mastocytosis (REMA; Escribano et al^{37,38}). Demographics and clinical characteristics of the study population according to disease category are summarized in Table 1.

Isolation of mast cells and other subpopulations of BM nucleated cells

Isolation of BM MCs and other subpopulations of nucleated BM cells was performed using a 4-way fluorescence-activated cell-sorter (FACSARIA; Becton Dickinson Biosciences [BDB], San Jose, CA) equipped with the FACSDiva software (BDB). Prior to sorting, cells were stained with a single 4-color combination of monoclonal antibodies (MAbs)—CD14/CD117/CD34/CD45—conjugated with fluorescein isothiocyanate (FITC)/phycoerythrin (PE)/allophycocyanin (APC)/peridinin chlorophyll protein (PerCP)-cyanin 5.5 (Cy5.5) according to well-established stain-and-then-lyse-and-wash procedures, which have been described in detail elsewhere.³⁹ In the first 41 consecutive patients only purified BM MCs were analyzed for the presence of KIT mutation; in those 67 mutated patients out of the remaining 72 cases, the KIT mutation was also analyzed in other BM non-MC cell fractions (Table 2). The following phenotypic characteristics were used for the isolation of the different subpopulations of BM nucleated cells: MCs

Table 2. Frequency of KIT mutation in different diagnostic subgroups of adult patients with systemic mastocytosis

Category	Patient mast cells, no. of total (%)	Patients with KIT mutation on BM mast cells, no. (%)					
		Mast cells	CD34 ⁺ HPCs	Eosinophils	Monocytes	Neutrophils	Lymphocytes
MCL*	5/6 (83)	2/2 (100)	2/2 (100)	1/1 (100)	NA	1/1 (100)	NA
ISM	72/74 (97)§	43/43 (100)	9/38 (24)	9/42 (21)	4/37 (11)	3/37 (8)	1/10 (10)
SM-ana†	7/7 (100)¶	6/6 (100)	0/6 (0)	0/6 (0)	0/6 (0)	0/6 (0)	0/2 (0)
WDSM‡	2/7 (29)	2/2 (100)	1/2 (50)	0/2 (0)	0/2 (0)	0/2 (0)	0/2 (0)
ASM	6/6§	5/5 (100)	3/4 (75)	4/5 (80)	3/4 (75)	4/5 (80)	3/4 (75)
SM-AHNMD	13/13 (100)¶	9/9 (100)	6/9 (67)	6/9 (67)	5/8 (63)	4/7 (57)	2/5 (40)
Total	105/113 (93)	67/67 (100)	21/61 (34)	20/65 (31)	12/57 (21)	12/58 (21)	6/23 (26)

Patient mast cells indicates the frequency of patients carrying KIT mutation in their mast cells, from all patients analyzed. All other data shows patients with KIT mutation-positive mast cells. Results expressed as number of cases with the KIT mutation from all cases analyzed (N). All but 3 patients had the D816V KIT mutation.

NA indicates not analyzed.

*One patient had the D816Y KIT mutation.

†One patient had the V1815–816 insertion in the KIT sequence.

‡One patient had the I817V KIT mutation.

§P < .001 compared with the WDSM group.

¶P < .05 compared with the WDSM group.

¶¶P < .01 compared with the WDSM group.

were identified as being CD117^{hi}/CD34⁻/CD45⁺/CD14⁻; monocytes were CD45^{hi}/CD14^{hi}/CD34⁻/CD117⁻; neutrophils were CD45⁺/CD34⁻/CD117⁻/CD14⁻/sideward light scatter (SSC)^{hi}; eosinophils were CD45⁺/CD34⁻/CD117⁻/CD14⁻/SSC^{hi} with both green and orange autofluorescence; CD34⁺ hematopoietic progenitor cells (HPCs) were identified as being SSC^{lo/mt}/CD34⁺/CD45⁺/CD14⁻/CD117^{-/+}; and lymphocytes were SSC^{lo}/CD45^{hi}/CD14⁻/CD117⁻/CD34⁻. In 3 patients, nucleated erythroid precursors (CD45⁻/SSC^{lo}/CD14⁻/CD34⁻/CD117⁻) were also sorted.

The purity of the isolated cell populations was evaluated after acquiring 3×10^3 cells of each FACS-sorted cell fraction in a FACScalibur flow cytometer (BDB), and it was constantly greater than 90% (mast cells: $94\% \pm 3.7\%$; CD34⁺ HPCs: $96.7\% \pm 2.1\%$; eosinophils: $91.7\% \pm 4.1\%$; monocytes: $96.4\% \pm 1.8\%$; neutrophils: $99.6\% \pm 0.5\%$; erythroid precursors: $99\% \pm 1.2\%$; and lymphocytes: $98\% \pm 1.4\%$) in the absence of both contamination (< 0.01%) by MCs and cross-contamination with other D816V⁺ cell populations in the sample.

DNA extraction and detection of *KIT* mutation

Purified subpopulations of BM cells were used to extract genomic DNA (gDNA) using either the QIAamp mini- or micro-DNA extraction kits (QIAGEN, Valencia, CA) according to the instructions of the manufacturer. For those samples containing less than 10^4 FACS-sorted cells, the REDExtract-N-Amp blood polymerase chain reaction (PCR) kit (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) was used following the recommendations of the manufacturer, with the 5'-TTC TTT CCT CCA ACC TA-3' and 5'-TGC AAA TTT TGC TGA AGT AT-3' primers (Isogen Biosciences, Maarsen, The Netherlands).

For the detection of the somatic activating codon D816V *KIT* mutation, gDNA was used. In all cases a peptide nucleic acid (PNA)-mediated PCR clamping technique (LightCycler thermocycler, software version 3.5; Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) with the DNA Master Hybridization probes Kit (Roche Diagnostics) was used, as previously described in detail.¹¹ Hybridization probes and PNA-oligomer were purchased from TIB MOLBIOL (Berlin, Germany) and Applied Biosystems (Foster City, CA), respectively.

Positivity for the D816V or other *KIT* mutations localized in the proximity of codon 816 was confirmed by sequencing the PCR products in both directions, using the 5'-CAG CCA GAA ATA TCC TCC TTA CT-3' and 5'-TTG CAG GAC TGT CAA GCA GAG-3' primers (Isogen Life Sciences) and the dye-deoxy terminator method, in an ABI Prism 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA).

Statistical methods

In order to evaluate the statistical significance of the differences observed between groups, the nonparametric chi-square and the Fisher tests (SPSS 12.0 software; SPSS, Chicago, IL) were used; *P* values less than .05 were considered to be associated with statistical significance.

Results

Frequency and type of *KIT* mutation present in BM mast cells from adults with systemic mast cell disorders

Overall, 105 (93%) of the 113 SM patients studied showed *KIT* mutations in their BM MCs (Table 2). Upon classifying the patients according to their diagnosis, a high frequency of patients carrying the *KIT* mutation was found in all different groups of patients except WDSM (97% vs 29%; *P* < .001) (Table 2). Accordingly, while all ASM (6 of 6 patients), SM-AHNMD (13 of 13 patients), and SM-ana (7 of 7 patients) and most MCL (5 of 6 patients) and ISM (72 [97%] of 74 patients) carried the *KIT* mutation in their BM MCs, only 2 of 7 patients with WDSM had activating *KIT* mutation-positive BM MCs. From those 7 cases in which no mutations were detected at the activating loop of c-kit, 1 corresponded to a 76-year-old female with a MCL with 60% BM MCs;

another 2 patients (a 52-year-old male and a 40-year-old female) were diagnosed with ISM associated with skin involvement and variable percentages of BM MCs (1% and 0.027%, respectively). The other 5 patients (2 men and 3 women) were diagnosed with WDSM, with variable percentages of BM MCs (median, 0.7%; range, 0.07%-12%). Interestingly, purified BM MCs from all the 5 females with SM in the absence of detectable *KIT* mutations were shown to have a clonal origin as tested by the human androgen receptor gene assay.⁴⁰

In most of the mutated cases (102 [97%] of 105), PNA-mediated PCR clamping and DNA sequencing showed that the genetic change corresponded to the typical D816V *KIT* mutation (melting curve at 63°C). Of the other 3 mutated cases, 1 corresponded to a WDSM showing a A7178 → G point mutation that caused a I817V substitution in the *KIT* sequence (melting curve at 54°C); another was a SM-ana with an insertion of 6 bp (GTC ATA) just before the 816 *KIT* codon (melting curve at 56°C); the third case with MCL showed a G7175 → T point mutation causing a D816Y substitution (melting curve at 56°C) (Figure 1).

In a subgroup of 11 patients (9 with ISM, 1 with SM-AHNMD, and 1 with WDSM), the same PCR-based approach was used for the detection of *KIT* mutation in skin-biopsy samples. Comparison between skin and BM results showed a 100% (11 of 11 patients) concordance: 10 patients were positive for the D816V *KIT* mutation and 1 (the patient with WDSM) was negative.

Distribution of the *KIT* mutation in different compartments of BM cells

Among those patients carrying a *KIT* mutation in their BM MCs, 27 (40%) of 67 patients analyzed showed the presence of D816V *KIT* mutation in gDNA extracted from purified subpopulations of nucleated BM cells other than MCs. Of note, the frequency of patients with *KIT* mutation in their BM fraction of CD34⁺ HPCs (21 [34%] of 61 patients) and eosinophils (20 [31%] of 65 patients) was higher than it was in patients with *KIT* mutation-positive monocytes (12 [21%] of 57 patients) and neutrophils (12 [21%] of 58 patients) (Table 2).

Interestingly, the frequency of cases carrying a *KIT* mutation in CD34⁺ HPCs was significantly higher (*P* < .001) among patients with aggressive forms of mastocytosis, such as MCL (2 of 2 patients), ASM (3 of 4 patients) and SM-AHNMD (6 of 9 patients), than it was in patients with good-prognosis disease categories such as ISM (9 [24%] of 38 patients), SM-ana (0 of 6 patients) and WDSM (1 of 2 patients). Similar results were observed when other nucleated BM myeloid cell populations were analyzed for the presence of *KIT* mutations. Accordingly, a high proportion of all MCL, ASM, and SM-AHNMD carried the *KIT* mutation in their BM eosinophils (11 [73%] of 15 patients), monocytes (8 [69%] of 12 patients), and neutrophil lineage cells (9 [64%] of 14 patients), while it was detected in a smaller (*P* < .001) proportion of all patients with D816V⁺ ISM (eosinophils, 21%; monocytes, 11%; and neutrophil lineage cells, 8%) and constantly absent in patients with SM-ana and WDSM carrying the *KIT* mutation in their BM MCs. This also translated into an overall higher frequency of patients carrying the *KIT* mutation in 2 or more populations of BM myeloid cells in cases with intermediate/poor-prognosis SM (MCL, ASM, and SM-AHNMD) compared with the good-prognosis SM (ISM, SM-ana, and WDSM) (81% vs 27%, *P* = .02). Interestingly, the presence of *KIT* mutation was detected in all ISM with hypereosinophilia (5 of 5 patients) but also in patients with normal eosinophil counts (4 of 37 patients).

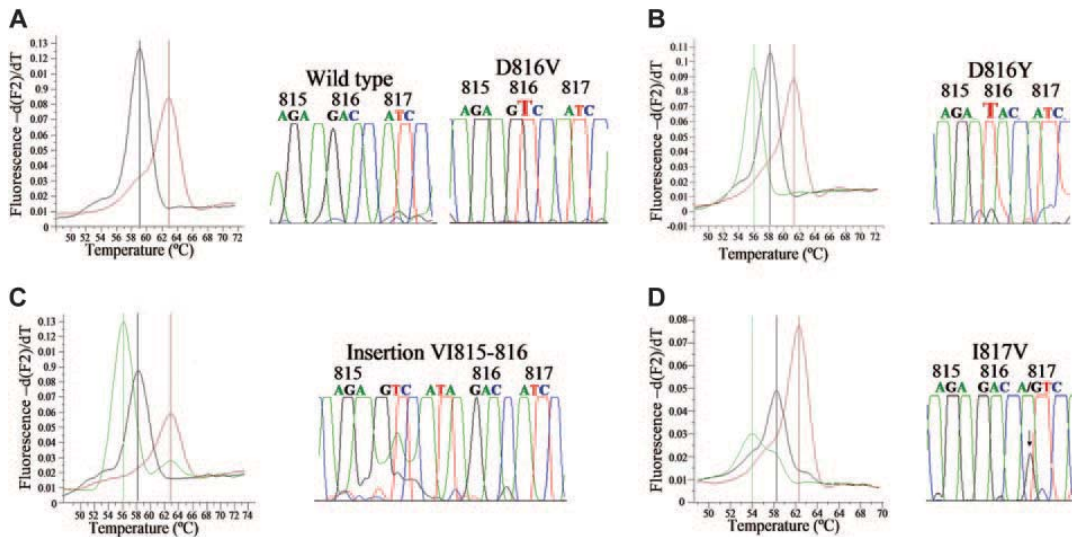


Figure 1. Melting curves and sequences of PCR products from patients with systemic mastocytosis carrying different *KIT* mutations. (A) D816V *KIT* mutation (melting curve at 63°C) found in a patient with ISM. (B) D816Y *KIT* mutation (56°C) found in a patient with MCL. (C) VI815-816 insertion (56°C) found in a patient with SM-ana. (D) I817V *KIT* mutation (54°C) found in a patient with WDSM. Comparison with typical D816V *KIT* mutation and wild-type sequence (melting curve at 59°C) are shown in all panels.

In addition, all patients showing involvement of the neutrophil (n = 10), monocytic (n = 10), and/or eosinophilic (n = 13) BM cell compartments in which CD34⁺ HPCs were simultaneously analyzed also showed the presence of *KIT* mutation in this latter BM cell compartment, independent of the diagnostic subgroup. In contrast, in 6 patients (1 WDSM, 1 SM-AHNMD, and 4 ISM), CD34⁺ HPCs carrying the *KIT* mutation were detected in the absence of involvement of any of the more mature myeloid cell compartments analyzed. Likewise, all 6 patients (3 ASM, 2 SM-AHNMD, and 1 ISM) carrying the D816V *KIT* mutation in the lymphocyte population also showed this mutation in CD34⁺ HPCs and all BM myeloid cell populations tested. However, in 1 patient with ISM carrying D816V in all myeloid populations as well as in another 16 patients showing variable involvement of CD34⁺ HPCs and other BM non-MC myeloid compartments, lymphocytes carried the wild-type *KIT* gDNA sequence (Table 2).

Analysis of the *KIT* mutational status of AHNMD associated with SM

From those 13 patients suffering from systemic mastocytosis associated with other non-mast-cell hematologic disorders, 10

patients had an associated myeloid malignancy and only 3 patients had a lymphoid neoplasia. Six of 13 patients had ASM associated with an AHNMD consisting of a chronic myelomonocytic leukemia (CMML; n = 1), myelodysplastic syndrome (MDS; n = 4) and a B-cell non-Hodgkin lymphoma (NHL; n = 1); the other 7 patients were diagnosed with ISM and AHNMDs consisting of MDS (n = 3), acute myeloid leukemia (AML; n = 1), polycythemia vera (PV; n = 1), B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL; n = 1) and lymphoplasmacytic lymphoma (LPL; n = 1). All patients (13 of 13) with SM-AHNMD had the D816V-activating *KIT* mutation on their BM MCs. In turn, upon analyzing the *KIT* mutational status of different BM cell populations other than MCs, 9 of these patients showed variable patterns of involvement. Accordingly, while in all patients with ASM associated with myeloid non-MC malignancies, involvement of neoplastic cells from the AHNMD was detected (4 of 4 patients), it was only found in a single patient with ISM associated with an AML (1 of 5 patients with ISM-AHNMD). Interestingly, this latter patient had a germ-line D816V *KIT* mutation also involving BM lymphoid and erythroid cells, as well as mucosal epithelial cells (Table 3; Figure 2). Despite this, another 2 patients with ISM-AHNMD in which an

Table 3. Involvement of different hematopoietic cell lineages in patients with SM-AHNMD as evaluated by the presence or absence of somatic activating *KIT* mutations at codon 816

Cell type	ISM					ASM			
	AML	B-CLL	MDS	PV	LPL	MDS	MDS	CMML	CMML
	Patient 1	Patient 2	Patient 3	Patient 4	Patient 5	Patient 6	Patient 7	Patient 8	Patient 9
Mast cells, %	0.7 +	0.03 +	0.9 +	0.1 +	0.3 +	7.5 +	6 +	0.22 +	0.2 +
CD34 ⁺ HPCs, %	7.7 +*	1.6 +	10 –	1.9 +	0.5 –	0.8 +	2 +	NA	1 +
Eosinophils, %	1.1 +	1.1 +	1.7 –	1.4 –	5.8 –	4.8 +	8.7 +	7.4 +	3.2 +
Monocytes, %	3.7 +	NA	4.2 –	3.2 –	9.2 –	2.9 +	12 +	31 +	11 +
Neutrophil lineage cells, %	73 +*	NA	49 –	52 –	54 –	66 +	NA	46 +	67 +
Erythroid precursors, %	12 +	NA	NA	NA	7.8 –	NA	NA	NA	NA
Lymphocytes, %	2.2 +	19 –†	NA	NA	6.1 –†	NA	NA	11.4 +	NA

Results expressed as percentage of cells from all nucleated BM cells.
 NA indicates not analyzed; +, presence of *KIT* mutation; and –, absence of *KIT* mutation.
 *Including blast cells.
 †Including neoplastic B-cells.

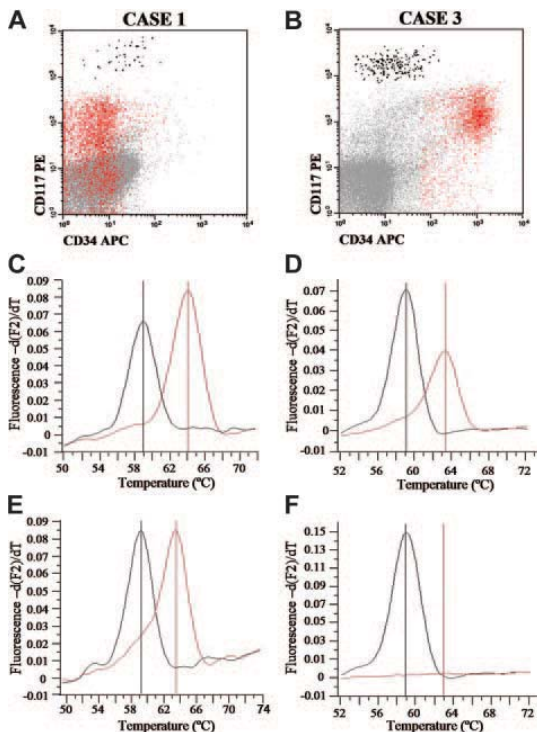


Figure 2. Representative analysis of D816V *KIT* mutation in purified BM MNCs and blast cells from 2 patients with SM-AHNMD. (A-B) Immunophenotypic characteristics of blast cells (red dots) and mast cells (black dots) in BM samples from patients 1 and 3 listed in Table 3, prior to FACS sorting. (C-F) Melting curves of wild-type (approximately 59°C; black line) and mutated (approximately 63°C; red line) *KIT* sequences from mast cells (C-D) and blast cells (E-F) from patients 1 (C-E) and 3 (D-F).

ISM was associated with B-CLL and PV also showed involvement of either all BM myeloid compartments analyzed or CD34⁺ HPCs, respectively.

Discussion

Despite the clinical and pathophysiologic relevance of the c-kit/SCF signaling pathway in MCD,^{1,4} the exact frequency of *KIT* mutations in different compartments of BM hematopoietic cells of individuals with SM and its different diagnostic categories remains largely unknown.

At present, it is generally accepted that adult patients usually express activating mutations of c-kit, whereas most cases of childhood-onset and familial mastocytosis would lack these mutations. However, it should be noted that so far, most studies analyzing *KIT* mutations in SM reported on relatively small series of patients with aggressive forms of the disease^{2,3,5,7,9,22,29,30} or single case reports.^{6,15,41} Despite this, recent review papers^{25,42} estimate that the frequency of the D816V *KIT* mutation in adult patients with SM could be higher than 80%, while the frequency of *KIT* mutations in the different forms of SM remains quite variable.^{2,3,5,7,9,11,29,30,43} In some studies, such variability could be related to differences in the methods used and/or the type of samples used for the identification of *KIT* mutations. Accordingly, while Pardanani et al,³⁰ through the use of DNA sequencing

techniques, have only found 14% (1 of 7) D816V⁺ cases in BM samples from patients with ISM, others⁵ using more sensitive methods based on the analysis of mRNA by restriction fragment length polymorphism (RFLP) approaches have found the *KIT* D816V mutation in all of their 11 patients with ISM. Likewise, the frequency of this mutation in patients suffering from ISM varied from 16% (7 of 43 patients) if analyzed in PB⁴³ to 100% (11 of 11) if assessed in BM samples,⁵ even though methods with similarly high sensitivity were used. Altogether, these findings suggest that variations in the frequency of D816V⁺ SM cases may be related to both the sensitivity of the method and the MC burden, and that both factors could be responsible for the impression that aggressive forms of SM are associated with higher frequencies of *KIT* mutation.^{3,9,43} Because of this, in the present study we used a method¹¹ with a sensitivity always higher than 1/20, as evaluated in external quality control schemes (European Competence Network on Mastocytosis [ECNM] interlaboratory quality control [round robin]), to detect the D816V *KIT* mutation in highly purified populations of MCs. An additional advantage of the method used is that it allows detection of mutations in gDNA at codon 816 as well as at codons 815 and 817 of the activating loop of c-kit, enabling us to detect mutations in this region of the *KIT* gene in purified cell populations independent of whether or not these cells expressed stem cell factor receptor.

Our results show the presence of activating *KIT* mutations in purified BM MCs from most patients with both indolent and aggressive forms of SM. Interestingly, of the different diagnostic subgroups of SM, only those patients with WDSM showed a relatively low frequency of *KIT* mutations. These results are in line with the observation that aberrant expression of CD25 and CD2 on BM MCs is frequently absent in WDSM,¹⁵ while present in virtually all patients with ISM,³⁷ supporting the notion that aberrant MC phenotypes could be associated with underlying genetic lesions.⁴⁴ Overall, these results obtained through the analysis of purified MCs could contribute to an explanation of previously observed discrepancies in the literature.^{2,3,5,7,9,11,29,30,43} As a consequence, our findings would also indicate that treatment with imatinib, which has been shown to be ineffective in vitro and in vivo against MCs carrying the D816V c-kit mutation,^{27,28,45} would therefore not be indicated in virtually all patients with SM, except most WDSM. However, further studies are required before definitive conclusions can be drawn in this regard.

In the present study we confirm previous observations^{11,42} that found a low frequency (< 5%) of activating *KIT* mutations other than D816V in patients with SM. Interestingly, 2 of the 3 patients reported here to carry *KIT* mutations other than D816V showed mutations (I817V and V815-816) that had not been previously described in the literature. At present, there is still no information about the functional status of these new mutations; however, it could be speculated that the V815-816 insertion could cause a ligand-independent activation of c-kit because it led to insertion of a Val at the activating loop of c-kit, at the same position as that of the D816V mutation. Nonetheless, the functionality of this, as well as of the I817V *KIT* mutation, needs further characterization by functional studies. A third patient had an activating ligand-independent c-kit mutation (D816Y) that had already been identified in patients suffering from mastocytosis^{2,11} and AML.¹² Interestingly, the 2 former cases corresponded to patients suffering from recently described forms of mastocytosis (SM-ana³³ and WDSM¹⁵) in which the presence of *KIT* mutations has not been systematically explored. Of note, the only *KIT* mutation described so far in a

patient with WDSM corresponded to a F522C¹⁵ germ-line mutation; this observation, together with our findings, would support the notion that WDSM could be a genetically heterogeneous and distinct subgroup of mastocytosis.

In 1995, Nagata et al³ described the presence of a D816V mutation in a PB sample from a patient with SM in the absence of detectable circulating MCs. Since then, several reports have identified the D816V mutation in non-MC hematopoietic cell lineages from patients with SM,^{7,19-24} leading to the notion that SM could arise from a uncommitted hematopoietic progenitor cell.^{7,25} However, attempts have failed so far to identify the *KIT* mutation in BM CD34⁺ HPCs from patients with SM,²¹ and to the best of our knowledge, this is the first report in which the presence of the *KIT* mutation in BM CD34⁺ HPCs of a relatively high proportion of patients with SM is confirmed. In addition, we also showed that involvement of CD34⁺ HPCs and other non-MC hematopoietic lineages is not restricted to ASM, MCL, and SM-AHNMD, but is also present in a significant proportion of patients with ISM.

Upon comparing the frequency at which involvement of CD34⁺ HPCs and other more mature CD34⁻ myeloid cell compartments occurred, we found a higher percentage of involvement of the CD34⁺ HPCs and eosinophils than monocytic and neutrophil lineage cells. Only those patients with the D816V *KIT* mutation in CD34⁺ HPCs showed involvement of other more mature myeloid cell populations, while a few patients showed the presence of the mutation in the CD34⁺ HPC compartment in the absence of an involvement of the other myeloid cell compartments analyzed. Interestingly, the presence of the *KIT* mutation in the eosinophils was not restricted to patients with eosinophilia associated with SM as previously suggested,¹⁹ but it was also found among SM patients with normal PB eosinophil counts. Moreover, in some patients, the presence of the *KIT* mutation in eosinophils was detected without involvement of the other myeloid cell lineages apart from CD34⁺ HPCs. In contrast to the common CD34⁺ CD117⁺ CD13⁺ bilineage monocytic-MC precursor proposed by others,⁴⁶ our results suggest the existence of a common bilineage-restricted committed progenitor for MCs and eosinophils during differentiation of hematopoietic cells.

Most patients with MCL and ASM carried the D816V *KIT* mutation in almost all myeloid cell populations analyzed as well as the lymphocytes, while this occurred in a significantly smaller proportion of ISM cases and in none of the patients with SM-ana and WDSM. Altogether, these findings suggest that in most aggressive forms of mastocytosis and a minor proportion of ISM, the *KIT*-mutated HPCs has acquired a clear proliferative advantage involving not only CD117⁺-expressing mature myeloid cells (eg, MCs) but also other CD117⁻-maturing myeloid precursors and lymphocytes. The prognostic significance of these observations for predicting clinical outcome in patients with SM showing different forms of the disease requires further investigation.

Regarding SM-AHNMD, we found a slightly different frequency of involvement of the leukemic/neoplastic cells correspond-

ing to the AHNMD in patients with a diagnosis of ASM-AHNMD versus ISM-AHNMD. Accordingly, the D816V *KIT* mutation, which was detected in BM MCs from all patients studied, was also present in purified neoplastic cells from all ASM-AHNMD patients, but was absent in the AHNMD cells from all except 1 patient with ISM-AHNMD who had a germ-line mutation, indicating the coexistence of 2 different cell clones and, potentially, of 2 different unrelated hematologic disorders in most of the patients from this latter group. Further studies in larger series of patients with SM-AHNMD are necessary to determine the potential clinical significance of these observations.

In summary, in the present study we show the presence of the D816V *KIT* mutation in almost all SM patients, similar frequencies being observed in all different diagnostic categories of the disease, except WDSM. In most cases with poor-prognosis SM, as well as in a smaller proportion of ISM, involvement of CD34⁺ HPCs and other hematopoietic cell compartments by the *KIT*-mutated clone was detected, supporting the origin of SM in a pluripotent hematopoietic stem cell.

Acknowledgment

We thank Professor Frank K. Austen for the critical review of the manuscript.

Appendix

Contributing members of the Spanish Network on Mastocytosis include the following:

Members: Aldanondo, Isabel¹; Alfonso, Amparo²; Almeida, Julia³; Angulo, Miguel³; Azana, Jose M.⁴; Botana, Luis M.²; Cuevas, Manuela⁵; De La Hoz, Belen⁶; Dominguez, Mercedes⁷; Escribano, Luis⁸; Fajardo, Ignacio Jose⁹; Garcia Faroldi, Gianni⁹; Garcia-Montero Andres C.³; Gonzalez, Marcos¹⁰; Hernandez-Campo, Pilar³; Herrero, Sonia¹¹; Jara, Maria³; Löber, Kristin²; Medina Torres, Miguel Angel⁹; Melgarejo, Esther⁹; Moreno Iruela, Inmaculada⁷; Nunez, Rosa⁸; Orfao, Alberto³; Pernas, Octavio²; Prados, Aranzazu⁸; Rivas, Rosana³; Rodriguez-Caballero, Arancha³; Rodriguez Caso, Carlos³; Sanchez, Laura⁸; Sanchez, Maria Luz³; Sanchez-Jimenez, Francisca M.⁹; Torano, Alfredo⁷; Urdiales, Jose Luis⁹.

Centers: ¹Servicio de Dermatología, Hospital Ramón y Cajal, Madrid. ²Departamento de Farmacología, Facultad de Veterinaria, Universidad de Santiago de Compostela, Lugo. ³Servicio General de Citometría, Centro de Investigación del Cáncer and Departamento de Medicina, Universidad de Salamanca, Salamanca. ⁴Servicio de Dermatología, Complejo Hospitalario de Albacete, Albacete. ⁵Servicio de Inmunología, Hospital Ramón y Cajal, Madrid. ⁶Servicio de Alergia, Hospital Ramón y Cajal, Madrid. ⁷Servicio de Inmunología, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Madrid. ⁸Unidad de Mastocitosis, Hospital Ramón y Cajal, Madrid. ⁹Departamento de Biología Molecular y Bioquímica, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga, Málaga. ¹⁰Servicio de Hematología, Hospital Universitario de Salamanca, Salamanca. ¹¹Servicio de Hematología, Complejo Hospitalario de Albacete, Albacete.

References

- Longley BJ, Tyrrell L, Lu SZ, et al. Somatic c-KIT activating mutation in urticaria pigmentosa and aggressive mastocytosis: establishment of clonality in a human mast cell neoplasm. *Nat Genet*. 1996;12:312-314.
- Longley BJ Jr, Metcalfe DD, Tharp M, et al. Activating and dominant inactivating c-KIT catalytic domain mutations in distinct clinical forms of human mastocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96:1609-1614.
- Nagata H, Worobec AS, Oh CK, et al. 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. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92:10560-10564.
- Nagata H, Okada T, Worobec AS, Semere T, Metcalfe DD. c-kit mutation in a population of patients with mastocytosis. *Int Arch Allergy Immunol*. 1997; 113:184-186.
- Fritsche-Polanz R, Jordan JH, Feix A, et al. Mutation analysis of C-KIT in patients with myelodysplastic syndromes without mastocytosis and cases of systemic mastocytosis. *Br J Haematol*. 2001;113:357-364.
- Jordan JH, Fritsche-Polanz R, Sperr WR, et al. A case of "smouldering" mastocytosis with high mast cell burden, monoclonal myeloid cells, and C-KIT mutation Asp-816-Val. *Leuk Res*. 2001;25: 627-634.

7. Yavuz AS, Lipsky PE, Yavuz S, Metcalfe DD, Akin C. Evidence for the involvement of a hematopoietic progenitor cell in systemic mastocytosis from single-cell analysis of mutations in the c-kit gene. *Blood* 2002;100:661-665.
8. Pardanani A, Elliott M, Reeder T, et al. Imatinib for systemic mast-cell disease. *Lancet*. 2003;362:535-536.
9. Horny HP, Sotlar K, Sperr WR, Valent P. Systemic mastocytosis with associated clonal haematological non-mast cell lineage diseases: a histopathological challenge. *J Clin Pathol*. 2004;57:604-608.
10. Buttner C, Henz BM, Welker P, Sepp NT, Grabbe J. Identification of activating c-kit mutations in adult-, but not in childhood-onset indolent mastocytosis: a possible explanation for divergent clinical behavior. *J Invest Dermatol*. 1998;111:1227-1231.
11. Sotlar K, Escribano L, Landt O, et al. One-step detection of c-kit point mutations using PNA-mediated PCR-clamping and hybridization probes. *Am J Pathol*. 2003;162:737-746.
12. Beghini A, Cairoli R, Morra E, Larizza L. In vivo differentiation of mast cells from acute myeloid leukemia blasts carrying a novel activating ligand-independent C-kit mutation. *Blood Cells Mol Dis*. 1998;24:262-270.
13. Pullarkat VA, Pullarkat ST, Calverley DC, Brynes RK. Mast cell disease associated with acute myeloid leukemia: detection of a new c-kit mutation Asp816His. *Am J Hematol*. 2000;65:307-309.
14. Pignon JM, Giraudier S, Duquesnoy P, et al. A new c-kit mutation in a case of aggressive mast cell disease. *Br J Haematol*. 1997;96:374-376.
15. Akin C, Fumo G, Yavuz AS, Lipsky PE, Neckers L, Metcalfe DD. A novel form of mastocytosis associated with a transmembrane c-kit mutation and response to imatinib. *Blood*. 2004;103:3222-3225.
16. Tang X, Boxer M, Drummond A, Ogston P, Hodgins M, Burden AD. A germline mutation in KIT in familial diffuse cutaneous mastocytosis. *J Med Genet*. 2004;41:e88.
17. Zhang LY, Smith ML, Schultheis B, et al. A novel K5091 mutation of KIT identified in familial mastocytosis: in vitro and in vivo responsiveness to imatinib therapy. *Leuk Res*. 2006;30:373-378.
18. Hartmann K, Wardelmann E, Ma Y, et al. Novel germline mutation of KIT associated with familial gastrointestinal stromal tumors and mastocytosis. *Gastroenterology*. 2005;129:1042-1046.
19. Pardanani A, Reeder T, Li CY, Tefferi A. Eosinophils are derived from the neoplastic clone in patients with systemic mastocytosis and eosinophilia. *Leuk Res*. 2003;27:883-885.
20. Afonja O, Amorosi E, Ashman L, Takeshita K. Multilineage involvement and erythropoietin-"independent" erythroid progenitor cells in a patient with systemic mastocytosis. *Ann Hematol*. 1998;77:183-186.
21. Akin C, Kirshenbaum AS, Semere T, Worobec AS, Scott LM, Metcalfe DD. Analysis of the surface expression of c-kit and occurrence of the c-kit Asp816Val activating mutation in T cells, B cells, and myelomonocytic cells in patients with mastocytosis. *Exp Hematol*. 2000;28:140-147.
22. Taylor ML, Sehgal D, Raffeld M, et al. Demonstration that mast cells, T cells, and B cells bearing the activating kit mutation D816V occur in clusters within the marrow of patients with mastocytosis. *J Mol Diagn*. 2004;6:335-342.
23. Tefferi A, Lasho TL, Brockman SR, Elliott MA, Dispenzieri A, Pardanani A. FIP1L1-PDGFR α and c-kit D816V mutation-based clonality studies in systemic mast cell disease associated with eosinophilia. *Haematologica*. 2004;89:871-873.
24. Kocabas CN, Yavuz AS, Lipsky PE, Metcalfe DD, Akin C. Analysis of the lineage relationship between mast cells and basophils using the c-kit D816V mutation as a biologic signature. *J Allergy Clin Immunol*. 2005;115:1155-1161.
25. Akin C. Clonality and molecular pathogenesis of mastocytosis. *Acta Haematologica*. 2005;114:61-69.
26. Hartmann K, Henz BM. Mastocytosis: recent advances in defining the disease. *Br J Dermatol*. 2001;144:682-695.
27. Frost MJ, Ferrao PT, Hughes TP, Ashman LK. Juxtamembrane mutant V560GKit is more sensitive to Imatinib (STI571) compared with wild-type c-kit whereas the kinase domain mutant D816VKit is resistant. *Mol Cancer Ther*. 2002;1:1115-1124.
28. Akin C, Brockow K, D'Ambrosio C, et al. Effects of tyrosine kinase inhibitor STI571 on human mast cells bearing wild-type or mutated c-kit. *Exp Hematol*. 2003;31:686-692.
29. Pullarkat VA, Bueso-Ramos C, Lai R, et al. Systemic mastocytosis with associated clonal hematological non-mast-cell lineage disease: analysis of clinicopathologic features and activating c-kit mutations. *Am J Hematol*. 2003;73:12-17.
30. Pardanani A, Reeder TL, Kimlinger TK, et al. Fit-3 and c-kit mutation studies in a spectrum of chronic myeloid disorders including systemic mast cell disease. *Leuk Res*. 2003;27:739-742.
31. Valent P, Horny HP, Escribano L, et al. Diagnostic criteria and classification of mastocytosis: a consensus proposal. *Leuk Res*. 2001;25:603-625.
32. Valent P, Horny H-P, Li CY, et al. Mastocytosis (mast cell disease). In: Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW, eds. *World Health Organization (WHO) Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. Lyon, France: IARC Press; 2001:291-302.
33. Akin C, Metcalfe DD. Occult bone marrow mastocytosis presenting as recurrent anaphylaxis [abstract]. *J Allergy Clin Immunol*. 2003;111:S206.
34. Sperr WR, Escribano L, Jordan JH, et al. Morphologic properties of neoplastic mast cells: delineation of stages of maturation and implication for cytological grading of mastocytosis. *Leuk Res*. 2001;25:529-536.
35. Horny HP, Sillaber C, Menke D, et al. Diagnostic value of immunostaining for tryptase in patients with mastocytosis. *Am J Surg Pathol*. 1998;22:1132-1140.
36. Horny HP, Valent P. Diagnosis of mastocytosis: general histopathological aspects, morphological criteria, and immunohistochemical findings. *Leuk Res*. 2001;25:543-551.
37. Escribano L, Orfao A, Diaz-Agustin B, et al. Indolent systemic mast cell disease in adults: immunophenotypic characterization of bone marrow mast cells and its diagnostic implications. *Blood*. 1998;91:2731-2736.
38. Escribano L, Diaz-Agustin B, Lopez A, et al. Spanish Network on Mastocytosis (REMA): immunophenotypic analysis of mast cells in mastocytosis: when and how to do it: proposals of the Spanish Network on Mastocytosis (REMA). *Cytometry B Clin Cytom*. 2004;58:1-8.
39. Sanchez ML, Almeida J, Vidrales B, et al. Incidence of phenotypic aberrations in a series of 467 patients with B chronic lymphoproliferative disorders: basis for the design of specific four-color stainings to be used for minimal residual disease investigation. *Leukemia*. 2002;16:1460-1469.
40. Wu Y, Basir Z, Kajdacsy-Balla A, et al. Resolution of clonal origins for endometriotic lesions using laser capture microdissection and the human androgen receptor (HUMARA) assay. *Fertil Steril*. 2003;79:710-717.
41. Escribano L, Garcia-Montero A, Nunez-Lopez R, et al. Systemic mastocytosis associated with acute myeloid leukemia: case report and implications for disease pathogenesis. *J Allergy Clin Immunol*. 2004;114:28-33.
42. Valent P, Akin C, Sperr WR, et al. Mastocytosis: pathology, genetics, and current options for therapy. *Leuk Lymphoma*. 2005;46:35-48.
43. Worobec AS, Semere T, Nagata H, Metcalfe DD. Clinical correlates of the presence of the Asp816Val c-kit mutation in the peripheral blood mononuclear cells of patients with mastocytosis. *Cancer*. 1998;83:2120-2129.
44. Escribano L, Garcia-Montero A, Nunez R, Orfao A, on behalf of the Red Española de Mastocytosis (REMA). Flow cytometric analysis of normal and neoplastic mast cells: role in diagnosis and follow-up of mast cell disease. *Immunol Allergy Clin North Am*. 2006; in press. Published ahead of print on 6 July 2006 as DOI 10.1016/j.jiac.2006.05.008.
45. Ma Y, Zeng S, Metcalfe DD, et al. The KIT mutation causing human mastocytosis is resistant to STI571 and other KIT kinase inhibitors; kinases with enzymatic site mutations show different inhibitor sensitivity profiles than wild-type kinases and those with regulatory-type mutations. *Blood*. 2002;99:1741-1744.
46. Kirshenbaum AS, Goff JP, Semere T, Foster B, Scott LM, Metcalfe DD. Demonstration that human mast cells arise from a progenitor cell population that is CD34(+), c-kit(+), and expresses aminopeptidase N (CD13). *Blood*. 1999;94:2333-2342.

ARTÍCULO 2

“Detección de la mutación D816V de *KIT* en sangre periférica de pacientes con mastocitosis sistémica: implicaciones diagnósticas”

Introducción: Recientemente se ha demostrado la presencia de la mutación D816V de *KIT* en SP de pacientes con MS en ausencia de mastocitos circulantes. Este hallazgo ha sido posible gracias al desarrollo y aplicación de técnicas moleculares de PCR que tienen una sensibilidad muy elevada. Como consecuencia se ha propuesto que la detección de la mutación D816V de *KIT* en SP se incluya dentro de los algoritmos diagnósticos de MS. No obstante, se desconoce cuál es la frecuencia exacta de pacientes que presentan la mutación D816V de *KIT* en SP, si existe o no asociación con la presencia de la mutación D816V en varias líneas celulares hematopoyéticas de la MO y cuál es, en definitiva, el significado biológico de la misma.

Objetivo: En este trabajo nos propusimos determinar la frecuencia de mutación D816V de *KIT* en SP de pacientes con MS y determinar su posible utilidad a la hora de predecir/identificar la existencia de afectación de varias líneas celulares hematopoyéticas de MO por la mutación D816V de *KIT*.

Pacientes, materiales y métodos: En conjunto, en este trabajo analizamos ADN genómico (gDNA) obtenido a partir de muestras pareadas de MO y SP de un total de 190 pacientes, distribuidos en los siguientes subgrupos diagnósticos: MSIs⁺, 132 pacientes; MSIs⁻, 44 casos; MSA, 9 casos; MS-ANHMD, 2 pacientes; y 2 pacientes con síndrome monoclonal de activación mastocitaria (cMCAS). El análisis de la mutación de *KIT* se realizó simultáneamente con dos métodos distintos: una técnica de PCR específica de alelo (ASO-qPCR) y una técnica de PCR con sondas de hibridación específicas e inhibición de la amplificación del ADN silvestre mediante una sonda (específica) de tipo PNA. Como control de referencia analizamos gADN obtenido a partir de muestras de SP de 35 adultos sanos.

Resultados: La técnica de ASO-qPCR confirmó la presencia de la mutación D816V de *KIT* en la SP de la mayoría de los pacientes con MS (161/190; 85%), con una distribución creciente desde las formas más indolentes -MSIs⁻ (66%), MSIs⁺ (92%) a las mastocitosis agresivas (100%). En contraposición, la técnica de PNA-PCR demostró tener una menor sensibilidad, mostrando la presencia de la mutación en SP de 84/190 pacientes (44%) ($P > .0001$). No obstante, la simple detección de la mutación en SP mediante técnica de ASO-qPCR no permitía predecir de forma precisa la existencia de afectación multilineal en MO (precisión global: 48%); por el contrario, tanto la detección de la mutación D816V de *KIT* mediante técnica de PNA-PCR como la evaluación cuantitativa mediante ASO-qPCR del porcentaje de células mutadas en SP predecían la existencia de afectación multilineal en MO, ambas con elevada fiabilidad (precisión global de 83% y 82%, respectivamente).

Conclusiones: Nuestros resultados confirman la presencia de la mutación D816V de *KIT* en la SP de la gran mayoría de los pacientes con MS, sugiriendo que los dos métodos testados proporcionan información clínica útil y complementaria a la hora de predecir la existencia de afectación multilineal de la hematopoyesis en MO a través de la identificación de la mutación D816V de *KIT* y la cuantificación de su carga alélica en SP.

Detection of the *KIT* D816V mutation in peripheral blood of systemic mastocytosis: diagnostic implications

Maria Jara-Acevedo¹, Cristina Teodosio², Laura Sanchez-Muñoz³, Ivan Álvarez-Twose³, Andrea Mayado¹, Carolina Caldas¹, Almudena Matito³, José M Morgado³, Javier I Muñoz-González¹, Luis Escribano¹, Andrés C Garcia-Montero^{1,4} and Alberto Orfao^{1,4}

¹*Servicio General de Citometría (NUCLEUS), Centro de Investigación del Cáncer (IBMCC-CSIC/USAL and IBSAL) and Departamento de Medicina, Universidad de Salamanca, Salamanca, Spain;* ²*Department of Immunology, Erasmus MC, University Medical Center Rotterdam, Rotterdam, The Netherlands and* ³*Centro de Estudios de Mastocitosis de Castilla La Mancha (CLMast), Hospital Virgen del Valle, Toledo, Spain*

Recent studies have found the *KIT* D816V mutation in peripheral blood of virtually all adult systemic mastocytosis patients once highly sensitive PCR techniques were used; thus, detection of the *KIT* D816V mutation in peripheral blood has been proposed to be included in the diagnostic work-up of systemic mastocytosis algorithms. However, the precise frequency of the mutation, the biological significance of peripheral blood-mutated cells and their potential association with involvement of bone marrow hematopoietic cells other than mast cells still remain to be investigated. Here, we determined the frequency of peripheral blood involvement by the *KIT* D816V mutation, as assessed by two highly sensitive PCR methods, and investigated its relationship with multilineage involvement of bone marrow hematopoiesis. Overall, our results confirmed the presence of the *KIT* D816V mutation in peripheral blood of most systemic mastocytosis cases (161/190; 85%)—with an increasing frequency from indolent systemic mastocytosis without skin lesions (29/44; 66%) to indolent systemic mastocytosis with skin involvement (124/135; 92%), and more aggressive disease subtypes (11/11; 100%)—as assessed by the allele-specific oligonucleotide-qPCR method, which was more sensitive ($P < .0001$) than the peptide nucleic acid-mediated PCR approach (84/190; 44%). Although the presence of the *KIT* mutation in peripheral blood, as assessed by the allele-specific oligonucleotide-qPCR technique, did not accurately predict for multilineage bone marrow involvement of hematopoiesis, the allele-specific oligonucleotide-qPCR allele burden and the peptide nucleic acid-mediated-PCR approach did. These results suggest that both methods provide clinically useful and complementary information through the identification and/or quantification of the *KIT* D816V mutation in peripheral blood of patients suspected of systemic mastocytosis.

Modern Pathology (2015) 28, 1138–1149; doi:10.1038/modpathol.2015.72; published online 12 June 2015

Systemic mastocytosis is a group of heterogeneous disorders characterized by an abnormal accumulation of clonal mast cells in different tissues, such as the bone marrow, skin, spleen and/or the gastrointestinal tract.¹ Owing to the heterogeneity of the disease, the current WHO 2008 classification of

mastocytosis² defines seven different diagnostic categories of the disease, which vary from clinically indolent to aggressive forms of systemic mastocytosis. From all WHO subtypes of mastocytosis, indolent systemic mastocytosis is by far the most prevalent one in adults.³ At diagnosis, the great majority of adult indolent systemic mastocytosis cases present with both skin and bone marrow involvement, although a significant number of indolent systemic mastocytosis cases also show symptoms associated with the release of mast cells mediators in the absence of skin lesions at diagnosis.^{4,5} Interestingly, virtually all (>90%)⁶ indolent systemic mastocytosis and aggressive systemic mastocytosis patients carry the *KIT* D816V

Correspondence: Dr AC Garcia-Montero, PhD or Professor A Orfao, MD, PhD, Centro de Investigación del Cáncer (IBMCC-CSIC/USAL and IBSAL) and Departamento de Medicina, Universidad de Salamanca, Campus Miguel de Unamuno, Salamanca 37007, Spain.

E-mail: angarmon@usal.es or orfao@usal.es

⁴These authors contributed equally to this work.

Received 9 March 2015; accepted 5 May 2015; published online 12 June 2015

somatic mutation in pathological mast cells from the skin and bone marrow, the latter contributing (as a minor criteria) to the diagnosis of systemic disease. As the level of infiltration of bone marrow by tumor mast cells is frequently low⁷ (eg <0.1% of bone marrow-aspirated samples), highly sensitive molecular approaches have long been required for reliable detection of the *KIT* D816V mutation, even after purification of bone marrow mast cells.^{8,9} Despite this, it is now well established that, in at least one-third of indolent systemic mastocytosis and all aggressive systemic mastocytosis patients, bone marrow myeloid and/or lymphoid cells other than mast cells also carry the *KIT* D816V mutation (multilineage systemic mastocytosis);⁶ such patients have a greater risk for disease progression.¹⁰ Among multilineage systemic mastocytosis patients, the presence of the *KIT* D816V mutation is typically detected in genomic DNA (gDNA) of CD34⁺ hematopoietic stem and precursor cells, eosinophils, monocytes and maturing neutrophils, and, to a less extent, also in T lymphocytes, in addition to bone marrow mast cells.^{6,11}

Altogether, these results indicate that clonal mast cells from adult indolent systemic mastocytosis and aggressive systemic mastocytosis patients derive from a hematopoietic precursor with the ability for multilineage differentiation, which already carries the *KIT* D816V mutation.^{6,12} Thereby, the *KIT* mutation should also be detectable in peripheral blood from a significant percentage of systemic mastocytosis cases.¹⁰ In line with this hypothesis, new highly sensitive methods have been described,¹³ which allowed detection of the *KIT* D816V mutation in peripheral blood leukocytes from most mastocytosis cases, including 66/69 (96%) indolent systemic mastocytosis and 3/4 cutaneous mastocytosis investigated.^{9,14} Despite this, the potential relationship between the presence of the *KIT* D816V mutation in peripheral blood and multilineage involvement of bone marrow hematopoiesis has not been investigated so far. In this regard, particularly intriguing is the potential lack of association between the allele burden for the *KIT* mutation in peripheral blood, as assessed by the allele-specific oligonucleotide polymerase chain reaction (allele-specific oligonucleotide-qPCR), and the clinical and biological features of indolent systemic mastocytosis.^{9,15} Thereby, the precise biological and clinical significance of the presence of circulating peripheral blood *KIT*-mutated cells in systemic mastocytosis still remains to be elucidated.

Here, we investigated the presence of the *KIT* D816V mutation in peripheral blood from a series of 190 *KIT* D816V⁺ systemic mastocytosis and 2 *KIT* D816V⁺ monoclonal mast cell activation syndrome^{5,16} cases using a peptide nucleic acid-mediated PCR-clamping (peptide nucleic acid-mediated PCR) technique¹⁷ and the more recently proposed allele-specific oligonucleotide-qPCR approach.¹³ In addition, we also investigated the

presence of multilineage bone marrow involvement by the *KIT* D816V mutation in highly purified bone marrow CD34⁺ hematopoietic stem and precursor cells and maturing neutrophils using both methods. Our aim was to determine the precise frequency of peripheral blood involvement by the *KIT* D816V mutation, its relationship with the degree of involvement of bone marrow hematopoiesis in indolent systemic mastocytosis and the potential diagnostic implications of these findings.

Materials and methods

Patients and Samples

gDNA was obtained from bone marrow and peripheral blood samples from a total of 192 adult patients diagnosed with systemic mastocytosis ($n = 190$) and monoclonal mast cell activation syndrome ($n = 2$) that carry the *KIT* D816V mutation. These 192 *KIT* D816V⁺ cases were selected from a series of 456 consecutively diagnosed systemic mastocytosis patients, of whom 417 (91%) had the *KIT* D816V mutation, 9 (2%) had other exon 17 *KIT* mutations, 5 (1%) had *KIT* mutations in exons other than exon 17 and 25 (6%) had no detectable *KIT* mutations. All patients were prospectively diagnosed and classified between January 2008 and December 2012 at the reference centers of the Spanish Network on Mastocytosis (REMA; Mast Cell Unit of the Hospital Virgen del Valle, Toledo, Spain, and Cytometry Service of the Cancer Research Center, Salamanca, Spain) by the WHO 2008 criteria² and the more recent European Competence Network on Mastocytosis¹⁸ and REMA guidelines,³ with the following distribution: indolent systemic mastocytosis with skin lesions, 135 cases; indolent systemic mastocytosis without skin lesions, 44 cases; aggressive systemic mastocytosis, 9 cases; systemic mastocytosis with an associated hematological non-mast cells lineage disease, 2 cases, and; monoclonal mast cell activation syndrome, 2 patients. Paired peripheral blood and bone marrow samples from all cases were analyzed by the peptide nucleic acid-mediated PCR method;¹⁷ all such peripheral blood samples were analyzed in parallel by the allele-specific oligonucleotide-qPCR method. Furthermore, in a subset of 161 patients (indolent systemic mastocytosis with skin lesions, 111; indolent systemic mastocytosis without skin lesions, 41; aggressive systemic mastocytosis, 6; systemic mastocytosis with an associated hematological non-mast cells lineage disease, 1; and monoclonal mast cell activation syndrome, 2 cases) in whom enough gDNA from bone marrow-purified cell populations was available, analysis on bone marrow cells was also performed in parallel by allele-specific oligonucleotide-qPCR. In addition, peripheral blood samples from a total of 35 healthy adults were analyzed in parallel by the two PCR methods. In all cases, informed consent was given by

the donor before entering the study, according to the Declaration of Helsinki; the study was approved by the local Ethics Committees of the two centers. Overall, 64 of 192 patients included in this study have been included in previously reported series of systemic mastocytosis patients by the REMA.^{19–22}

Isolation of Bone Marrow Cell Populations

Isolation of bone marrow mast cells, CD34⁺ hematopoietic stem and precursor cells, eosinophils, monocytes, maturing neutrophils and lymphocytes was performed using a four-way FACSAria III (Becton Dickinson Biosciences, San Jose, CA, USA) fluorescence-activated cell sorter (FACS) equipped with the FACSDiva software (Becton Dickinson Biosciences), as described elsewhere.^{6,8} The overall purity of the FACS-sorted cell populations was systematically >96% (mean \pm 1 s.d. of 98 \pm 2%), with < 0.01% contamination by bone marrow mast cells in all purified non-mast cell fractions.

DNA Extraction and Detection of the KIT Mutation

gDNA was extracted from the different FACS-purified bone marrow cell populations using the GenElute Mammalian Genomic DNA Miniprep (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) and the NucleoSpin Tissue XS (Macherey-Nagel, Düren, Germany), according to the manufacturer's instructions. In parallel, gDNA was also obtained from unfractionated peripheral blood samples from both systemic mastocytosis patients and healthy controls by a salting-out method (Gentra Puregene Blood kit; Qiagen, Hilden, Germany), following the standard operating procedures of the Spanish National DNA Bank Carlos III (University of Salamanca; <http://www.bancoadn.org>), where gDNA from the peripheral blood samples is now publicly available.

Detection of the KIT D816V mutation was performed in gDNA from peripheral blood and highly purified bone marrow cell populations using two different methods. First, the established standard approach based on a peptide nucleic acid-mediated PCR technique (LightCycler 2.0, software version 3.5; Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) was used, as described elsewhere.^{6,17} Based on the results obtained with this method on purified bone marrow cell populations, all patients were further subclassified as having either systemic mastocytosis with KIT D816V mutation restricted to bone marrow mast cells (mast cell-restricted systemic mastocytosis) or systemic mastocytosis with multilineage involvement of bone marrow hematopoiesis by the KIT mutation (multilineage systemic mastocytosis), following the previously defined criteria.^{6,10} In a subset of 161 patients, detection of the KIT D816V mutation was also performed in parallel in aliquots of the same samples containing the same amount of gDNA (200 ng per sample for peripheral blood

leukocytes, and 50 ng per sample for purified bone marrow neutrophils and/or CD34⁺ hematopoietic stem and precursor cells) using a previously described allele-specific oligonucleotide-qPCR assay;¹³ for this purpose, an incubation at 95 °C for the activation of the DNA polymerase (10 min) followed by 45 cycles of PCR amplification (denaturation at 95 °C for 10 s followed by annealing at 60 °C for 30 s and elongation at 72 °C for 1 s) was performed in a LightCycler 2.0 thermocycler using the LightCycler TaqMan Master kit reagents (Roche Diagnostics).

All hybridization probes required for the peptide nucleic acid-mediated PCR technique,⁶ as well as the primers used in both techniques, were obtained from Sigma-Aldrich, whereas the allele-specific oligonucleotide-qPCR TaqMan probe¹³ was purchased from Applied Biosystems (Foster City, CA, USA). As negative and positive controls, gDNA from an adult healthy donor and the KIT D816V mutation-positive HMC-1^{560+/816+} cell line (proved to have two copies of the KIT gene, including a KIT D816V-mutated allele and a wild-type KIT allele)²³ were systematically studied in parallel to both the patient and control samples. For the identification of the most discriminating cutoff to classify both negative vs positive samples, as well as cases with mast cell-restricted vs multilineage involvement of hematopoiesis by the KIT D816V mutation, receiver operating characteristic curves were applied to select for the most specific crossing threshold (C_t) value (C_t value that provided the best sensitivity in the absence of false-positive results); $C_t < 37$ for negative vs positive samples and $C_t < 32$ for mast cell-restricted vs multilineage bone marrow involvement. For those peripheral blood samples that were positive for the KIT D816V mutation, as assessed by the allele-specific oligonucleotide-qPCR method, quantification of the mutated KIT allele burden was calculated by plotting individual results against a standard curve with percentages of mutated cells ranging from 0.01 to 100%, as generated through a series of dilutions of KIT D816V mutation-positive gDNA from the HMC-1^{560+/816+} cell line into wild-type gDNA from a pool of healthy control samples; in turn, the allele burden for the KIT mutation in bone marrow samples was quantified by the same allele-specific oligonucleotide-qPCR assay using the 'delta-delta C_t ' ($\Delta\Delta C_t$) method²⁴ to correct for the potential presence of false-negative results owing to the low amounts of gDNA obtained from bone marrow-purified cell populations. The efficiency of the $\Delta\Delta C_t$ method was evaluated using the standard curve regression analysis (LightCycler 3.5 software) generated with gDNA from the HMC-1^{560+/816+} cell line. Correlation of the results obtained with the two different analytical strategies used for peripheral blood vs bone marrow samples was performed in a subgroup of 90 cases, in which enough gDNA from bone marrow-purified cell populations was available, such analysis confirming that both approaches provided highly concordant results.

Statistical Methods

For all statistical analyses, the SPSS 20.0 software (SPSS, Chicago, IL, USA) was used. The Mann–Whitney *U*-test and the χ^2 tests were used to determine the statistical significance of the differences observed between groups; receiver operating characteristic curve analysis was used to identify the most discriminating cutoff for the presence of the *KIT* D816V mutation in peripheral blood, as assessed by the allele-specific oligonucleotide-qPCR method. Sensitivity was calculated as (true positive)/(true positive+false negative cases), specificity as (true negative)/(true negative+false positive cases) and overall accuracy as (true positive+true negative)/(true positive+false positive+true negative+false negative cases). Correlation between two variables was assessed by the Spearman's test (r_s). *P*-values < 0.05 were considered to be associated with statistical significance.

Results

Multilineage Involvement of Bone Marrow Cells by the *KIT* D816V Mutation

All patients ($n = 192$) had the *KIT* D816V mutation in FACS-purified bone marrow mast cells, as assessed by the peptide nucleic acid-mediated PCR method. In a substantial fraction of cases (67/192; 35%), the *KIT* mutation was also present in other bone marrow cell compartments such as the CD34+ hematopoietic stem and precursor cells, eosinophils, monocytes and maturing bone marrow neutrophils, as evaluated by the same PCR method. In addition, in 28 cases carrying multilineage *KIT* mutation, the *KIT* D816V mutation was also detected by the same technique in bone marrow T lymphocytes (28/192; 15%). The relative distribution of cases carrying multilineage involvement of bone marrow hematopoiesis by the *KIT* mutation within the different diagnostic subtypes of systemic mastocytosis was as follows: indolent systemic mastocytosis without skin lesions, 5/44 cases (11%); indolent systemic mastocytosis with skin lesions, 51/135 cases (37%); aggressive systemic mastocytosis, 9/9; systemic mastocytosis with an associated hematological non-mast cell lineage disease, 2/2; and monoclonal mast cell activation syndrome, 0/2.

Frequency of the *KIT* D816V Mutation in Peripheral Blood

Overall, none of the healthy controls analyzed (0/35) tested positive for the *KIT* D816V mutation in peripheral blood by any of the two PCR methods used. In contrast, the majority of mastocytosis patients were positive for this *KIT* mutation in peripheral blood by allele-specific oligonucleotide-qPCR (164/192; 85%) and/or by the peptide nucleic

acid-mediated-PCR technique (84/192; 44%). Of note, all 84 cases that tested positive for the *KIT* D816V mutation with the peptide nucleic acid-mediated PCR technique were also positive by allele-specific oligonucleotide-qPCR. These results indicate that while both methods are highly (100%) specific, the allele-specific oligonucleotide-qPCR technique is almost two times more sensitive in peripheral blood compared with the peptide nucleic acid-mediated PCR method (85% vs 44%; respectively; $P < 0.0001$). Thereby, the overall accuracy of the allele-specific oligonucleotide-qPCR was clearly higher compared with that of the peptide nucleic acid-mediated PCR (88% vs 52%, respectively; $P < 0.0001$) owing to its greater sensitivity (Table 1).

Despite the differences described for the two methods, their sensitivity was clearly lower among indolent systemic mastocytosis cases without skin lesions (indolent systemic mastocytosis without skin lesions; $n = 44$) compared with those showing skin involvement (indolent systemic mastocytosis with skin lesions; $n = 135$): 18% vs 48% ($P = 0.0004$) for the peptide nucleic acid-mediated-PCR and 66% vs 92% ($P < 0.0001$) for the allele-specific oligonucleotide-qPCR, respectively. This translated into a lower overall accuracy for the detection of the *KIT* mutation in peripheral blood samples from indolent systemic mastocytosis without skin lesions vs indolent systemic mastocytosis with skin lesions cases for the allele-specific oligonucleotide-qPCR (81% vs 93%, respectively; $P = 0.02$) but not for the peptide nucleic acid-mediated PCR technique (54% vs 59%, respectively; $P = 0.60$) (Table 2). However, the peptide nucleic acid-mediated PCR method emerged as a more accurate approach compared with the (qualitative) allele-specific oligonucleotide-qPCR method (overall accuracy of 83% vs 48%, respectively) in predicting the multilineage involvement of bone marrow hematopoiesis by the *KIT* mutation (Table 1), based on peripheral blood analysis when the qualitative threshold for positivity ($C_t < 37$; corresponding to an allele burden of 0.01%) by the allele-specific oligonucleotide-qPCR method was used. Thus, while the former method showed a lower sensitivity (88% vs 98%; $P = 0.02$), it had a significantly higher specificity (80% vs 22%; $P < 0.0001$) (Table 1). Of note, when patients ($n = 161$) were classified according to the degree of involvement of hematopoiesis by the mutation as carrying mast cell-restricted vs multilineage *KIT* mutation using the (qualitative) allele-specific oligonucleotide-qPCR instead of the peptide nucleic acid-mediated-PCR method for the analysis of purified bone marrow maturing neutrophils, the overall accuracy of both methods was also similar (52% vs 56%, $P > 0.05$); despite this, the qualitative allele-specific oligonucleotide-qPCR method still showed a lower specificity compared with the peptide nucleic acid-mediated PCR method (18% vs 63%; $P < 0.0001$) in association with a significantly higher

Table 1 Comparative analysis of the performance of the peptide nucleic acid-mediated-PCR vs the allele-specific oligonucleotide-qPCR methods^a

Prediction for the KIT mutation (patients, n = 192; controls, n = 35)				
	PNA-mediated-PCR	Qualitative ASO-qPCR	P-value	
True positive	84/192 (44%)	164/192 (85%)		
False positive	0/35 (0%)	0/35 (0%)		
True negative	35/35 (100%)	35/35 (100%)		
False negative	108/192 (56%)	28/192 (15%)		
Sensitivity	44%	85%	< 0.0001	
Specificity	100%	100%	NS	
Overall accuracy	52%	88%	< 0.0001	

Prediction for multilineage KIT mutation (mast cell-restricted systemic mastocytosis, n = 125; multilineage systemic mastocytosis, n = 67)				
	PNA-mediated-PCR	ASO-qPCR		
		Qualitative T > 0.01%	P-value	Quantitative T > 6%
True positive	59/67 (88%)	66/67 (98%)		33/67 (49%)
False positive	25/125 (20%)	98/125 (78%)		1/125 (1%)
True negative	100/125 (80%)	27/125 (22%)		124/125 (99%)
False negative	8/67 (12%)	1/67 (2%)		34/67 (51%)
Sensitivity	88%	98%	0.02	49%
Specificity	80%	22%	< 0.0001	99%
Overall accuracy	83%	48%	< 0.0001	82%

Abbreviations: ASO: allele-specific oligonucleotide; false negative case: case that meets the condition but tested negative; false positive case: case that does not meet the condition but tested positive; NS: not statistically significantly different; PNA: peptide nucleic acid; T: threshold.

Systemic mastocytosis patients were classified as having mast cell-restricted or multilineage KIT mutation according to the results of peptide nucleic acid-mediated PCR analysis of gDNA from purified bone marrow cell populations, as described in the Material and Methods section.

^aFor detection of the KIT D816V mutation in peripheral blood gDNA and prediction for the presence of the KIT D816V mutation in bone marrow mast cells and other hematopoietic cells from KIT D816V⁺ systemic mastocytosis (n = 190) and clonal mast cell activation syndrome (n = 2) patients.

sensitivity (90% vs 49%; $P < 0.01$) (Table 3). Interestingly, the overall accuracy of the peptide nucleic acid-mediated PCR method evaluated in peripheral blood to predict for the presence of multilineage involvement of hematopoiesis by the KIT mutation was higher among indolent systemic mastocytosis without skin lesions (93%) vs indolent systemic mastocytosis with skin lesions (77%) patients ($P = 0.02$), whereas it was similar for both patient groups for the qualitative (negative vs positive peripheral blood KIT mutation) allele-specific oligonucleotide-qPCR approach (45% vs 44%, respectively) (Table 2). As expected, the peripheral blood KIT D816V-positive allele burden observed among patients with mast cell-restricted KIT mutation (n = 98) was significantly lower ($P < 0.0001$) compared with that of multilineage systemic mastocytosis patients (n = 66) with a mean percentage \pm 1 s.d. of KIT-mutated cells of $1.9 \pm 2\%$ vs $15 \pm 20\%$, respectively (Figure 1a). Thereby, when the most specific cutoff (corresponding to an allele burden of 6% by the allele-specific oligonucleotide-qPCR method) was selected, to increase the specificity for the discrimination between mast cell-restricted vs multilineage systemic mastocytosis cases through analysis of peripheral blood samples by the allele-specific oligonucleotide-qPCR method, a similar

overall accuracy was obtained for the quantitative allele-specific oligonucleotide-qPCR vs the peptide nucleic acid-mediated PCR method (82% vs 83%; $P > 0.05$). Nevertheless, it should be noted that based on the KIT D816V allele burden of 6% by quantitative allele-specific oligonucleotide-qPCR virtually all mast cell-restricted systemic mastocytosis patients were correctly classified, whereas only half (33/67) of all multilineage systemic mastocytosis patients were identified as such (49% sensitivity; 99% specificity) (Figure 1a). Similar results were observed once indolent systemic mastocytosis cases were subdivided into indolent systemic mastocytosis without skin lesions and indolent systemic mastocytosis with skin lesions patients: 60% and 44% sensitivity and 99% and 98% specificity, and a 93% and 76% overall accuracy, respectively (Figure 1b).

Degree of Involvement of Distinct Bone Marrow Cell Compartments from Systemic Mastocytosis Patients by the KIT D816V Mutation as Defined by the Allele-Specific Oligonucleotide-qPCR vs the Peptide Nucleic Acid-Mediated-PCR Techniques

In a subset of 152/179 indolent systemic mastocytosis patients, in whom enough gDNA from purified

Table 2 Detection of the *KIT* mutation in peripheral blood gDNA from indolent systemic mastocytosis patients (*n*=179) grouped according to the presence vs absence of skin lesions by the peptide nucleic acid-mediated-PCR vs the allele-specific oligonucleotide-qPCR assays^a

Prediction for the <i>KIT</i> mutation						
	Indolent systemic mastocytosis without skin lesions ^b (<i>n</i> = 44)			Indolent systemic mastocytosis with skin lesions ^c (<i>n</i> = 135)		
	PNA-PCR	Qualitative ASO-qPCR	P-value	PNA-PCR	Qualitative ASO-qPCR	P-value
Sensitivity	18%	66%	< 0.0001	48%	92%	< 0.0001
Specificity	100%	100%	NS	100%	100%	NS
Overall accuracy	54%	81%	0.007	59%	93%	< 0.0001

Prediction for multilineage <i>KIT</i> mutation										
	Indolent systemic mastocytosis without skin lesions ^b (<i>n</i> = 44)					Indolent systemic mastocytosis with skin lesions ^c (<i>n</i> = 135)				
	PNA-PCR		ASO-qPCR			PNA-PCR		ASO-qPCR		
	Qualitative T> 0.01%	P-value	Quantitative T> 6%	P-value		Qualitative T> 0.01%	P-value	Quantitative T> 6%	P-value	
Sensitivity	100%	100%	NS	60%	NS	84%	98%	0.01	44%	< 0.0001
Specificity	92%	38%	< 0.0001	100%	NS	74%	12%	< 0.0001	98%	< 0.0001
Overall accuracy	93%	45%	< 0.0001	93%	NS	77%	44%	< 0.0001	76%	NS

Abbreviations: ASO: allele-specific oligonucleotide; NS: not statistically significantly different; PNA-PCR: peptide nucleic acid-mediated PCR; T: threshold.

Systemic mastocytosis patients were classified as having mast cell-restricted or multilineage *KIT* mutation according to the results of peptide nucleic acid-mediated PCR analysis of gDNA from purified bone marrow cell populations, as described in the Material and Methods section. All aggressive systemic mastocytosis cases (*n* = 9) and systemic mastocytosis with an associated hematological non-mast cell lineage disease (*n* = 2) had multilineage *KIT* mutation and they were all positive in peripheral blood gDNA by the two methods. Conversely, the two monoclonal mast cell activation syndrome patients showed mast cell-restricted *KIT* mutation in the bone marrow and they were both negative in peripheral blood by the two methods evaluated.

^aUtility of the two methods to predict for both the presence of the *KIT* D816V mutation in bone marrow mast cells and the presence of multilineage bone marrow involvement by the *KIT* mutation.

^bThirty-nine indolent systemic mastocytosis without skin lesions cases had mast cell-restricted *KIT* mutation and five showed multilineage involvement of hematopoiesis.

^cEighty-four indolent systemic mastocytosis with skin lesion cases had mast cell-restricted *KIT* mutation and 51 multilineage *KIT* mutation.

Table 3 Performance of the peptide nucleic acid-mediated-PCR vs the allele-specific oligonucleotide-qPCR methods in detecting the *KIT* mutation in peripheral blood gDNA and predicting for the presence of multilineage *KIT* mutation by allele-specific oligonucleotide-qPCR analysis of purified bone marrow maturing neutrophils

Prediction for multilineage <i>KIT</i> mutation(mast cell-restricted systemic mastocytosis, <i>n</i> = 84; multilineage systemic mastocytosis, <i>n</i> = 77)					
	ASO-qPCR				
PNA-mediated-PCR	Qualitative T> 0.01%	P-value	Quantitative T> 6%	P-value	
True positive	38/77 (49%)		69/77 (90%)	19/77 (25%)	
False positive	31/84 (37%)		69/84 (82%)	7/84 (8%)	
True negative	53/84 (63%)		15/84 (18%)	77/84 (92%)	
False negative	39/77 (51%)		8/77(10%)	58/77(75%)	
Sensitivity	49%		90%	0.01	25%
Specificity	63%		18%	< 0.0001	92%
Overall accuracy	56%		52%	NS	60%

Abbreviations: ASO: allele-specific oligonucleotide; false negative case: case that meets the condition but tested negative; false positive case: case that does not meet the condition but tested positive; NS: not statistically significantly different; PNA: peptide nucleic acid; T: threshold.

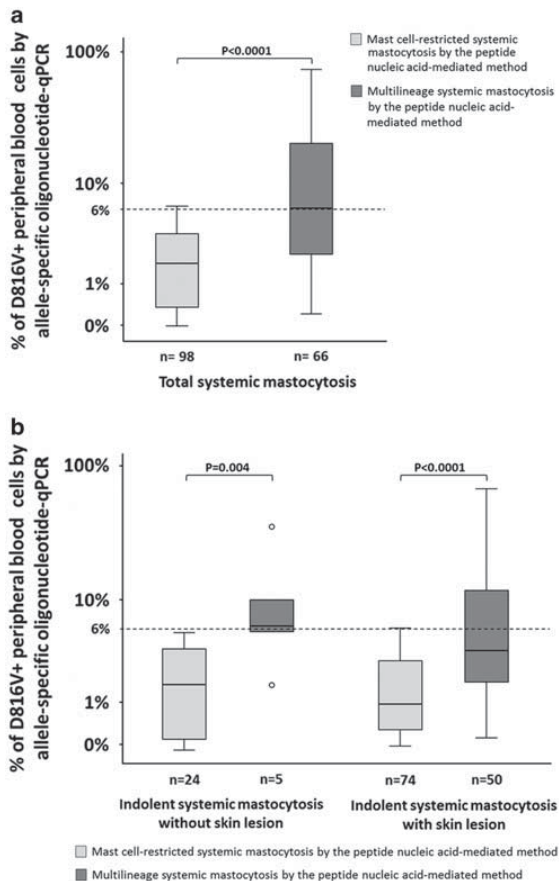


Figure 1 *KIT* D816V-positive allele burden in peripheral blood leukocytes from systemic mastocytosis patients, as assessed by allele-specific oligonucleotide-qPCR. The percentage of *KIT* D816V⁺ peripheral blood leukocytes grouped according to the degree of bone marrow involvement by the *KIT* mutation as defined by the conventional peptide nucleic acid-mediated-PCR technique is displayed. In (a), the percentage of *KIT*-positive peripheral blood leukocytes in the overall group of systemic mastocytosis patients is shown, whereas in (b), the percentage of *KIT*-positive peripheral blood leukocytes among indolent systemic mastocytosis without skin lesions and indolent systemic mastocytosis with skin lesions patients is displayed. Notched boxes extend from the 25th to 75th percentile values; the lines in the middle and vertical lines correspond to median values and the 10th and 90th percentiles, respectively, whereas the horizontal dotted line corresponds to the 6% cutoff allele burden by allele-specific oligonucleotide-qPCR.

bone marrow CD34⁺ hematopoietic stem and precursor cells and/or maturing neutrophils was available, we investigated the frequency of cases showing the *KIT* D816V⁺ mutation in both purified bone marrow cell populations also using the allele-specific oligonucleotide-qPCR method (all these cases had already been tested and classified as having mast cell-restricted or multilineage involvement of bone marrow hematopoiesis by the *KIT* mutation by the peptide nucleic acid-mediated PCR

method). Overall, allele-specific oligonucleotide-qPCR showed the presence of the *KIT* mutation in purified CD34⁺ hematopoietic stem and precursor cells and maturing neutrophils from 76/105 (72%) and 71/152 (46%) indolent systemic mastocytosis cases analyzed, respectively (Figure 2a). In detail, virtually all cases (39/43; 93%) who were classified by the peptide nucleic acid-mediated PCR assay as having multilineage involvement of hematopoiesis by the *KIT* mutation showed involvement of CD34⁺ hematopoietic stem and precursor cells (28/30, 93%) and/or maturing neutrophils (25/43, 58%) also by the allele-specific oligonucleotide-qPCR technique. Additionally, a great proportion of cases (73/109; 67%) with mast cell-restricted bone marrow involvement by the *KIT* mutation, as assessed by the peptide nucleic acid-mediated PCR method, also showed involvement of CD34⁺ hematopoietic stem and precursor cells (48/75; 64%) and/or maturing neutrophils (46/109; 42%) by the *KIT* mutation by the allele-specific oligonucleotide-qPCR assay. As expected, lower frequencies of *KIT* D816V⁺ CD34⁺ hematopoietic stem and precursor cells (mean \pm 1 s.d. of 6.6% vs 21 \pm 26%; $P=0.001$) and maturing neutrophils (mean \pm 1 s.d. of 17 \pm 32% vs 31% \pm 35%; $P=0.0003$) were observed with the allele-specific oligonucleotide-qPCR technique among those positive cases that showed mast cell-restricted vs multilineage involvement of hematopoiesis by the peptide nucleic acid-mediated-PCR method (Figure 2b).

Correlation Between the Percentage of *KIT* D816V-Mutated Bone Marrow CD34⁺ Hematopoietic Stem and Precursor Cells and Maturing Neutrophils and that of Peripheral Blood Leukocytes as Detected by Allele-Specific Oligonucleotide-qPCR

Overall, no significant correlation ($P>0.05$) was observed between the percentage of bone marrow CD34⁺ hematopoietic stem and precursor cells and maturing neutrophils carrying the *KIT* D816V mutation by allele-specific oligonucleotide-qPCR, when all cases were analyzed together (Figure 3a); however, this correlation increased towards statistical significance ($r_s=0.61$; $P=0.007$) when the analysis was restricted to those cases that simultaneously showed the mutation in the above two cell populations (Figure 3b). Most interestingly, only a marginally statistically significant correlation was found between the percentage of bone marrow maturing neutrophils and the percentage of peripheral blood leukocytes carrying the *KIT* mutation, when all cases were analyzed together ($r_s=0.33$; $P=0.02$) (Figure 3c); once again, when we restricted the analysis to those cases that showed the *KIT* mutation in both cell populations, the degree of correlation increased ($r_s=0.60$; $P=0.002$) (Figure 3d). In turn, a marginal degree of correlation was observed between the level of involvement of bone marrow CD34⁺ hematopoietic stem and precursor cells and that of

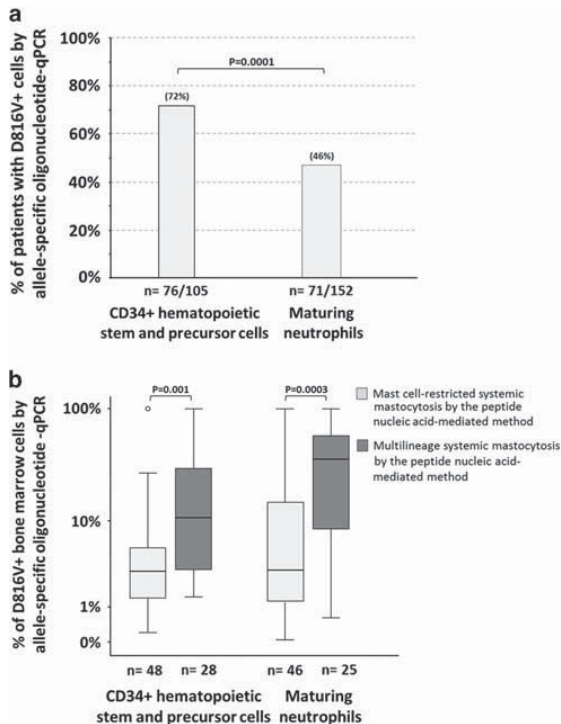


Figure 2 Frequency and degree of involvement of bone marrow isolated cells from indolent systemic mastocytosis patients grouped according to the presence of mast cell-restricted vs multilineage involvement of hematopoiesis by the *KIT* D816V⁺ as assessed by the allele-specific oligonucleotide-qPCR method. Frequency and degree of involvement by the *KIT* D816V mutation of FACS-purified bone marrow CD34⁺ hematopoietic stem and precursor cells and maturing neutrophils from indolent systemic mastocytosis patients as assessed by the allele-specific oligonucleotide-qPCR technique. In (a), the overall frequency of indolent systemic mastocytosis cases carrying the *KIT* D816V mutation in bone marrow CD34⁺ hematopoietic stem and precursor cells and maturing neutrophils by the allele-specific oligonucleotide-qPCR method is shown, whereas in (b), the percentage of bone marrow CD34⁺ hematopoietic stem and precursor cells and maturing neutrophils carrying the *KIT* D816V mutation by allele-specific oligonucleotide-qPCR among indolent systemic mastocytosis cases who tested positive for the mutation by this technique, grouped according to the degree of bone marrow involvement by the *KIT* mutation as defined by the conventional peptide nucleic acid-mediated-PCR technique is displayed. Notched boxes extend from the 25th to 75th percentile values; the lines in the middle and vertical lines correspond to median values and the 10th and 90th percentiles, respectively.

peripheral blood leukocytes, both when we analyzed all cases together ($r_s = 0.34$; $P = 0.02$) (Figure 3e) and only those cases where the two cell populations were simultaneously positive for the *KIT* D816V mutation ($r_s = 0.25$; $P = 0.16$) (Figure 3f).

Discussion

Currently, it is well established that ~90% of adult systemic mastocytosis patients carry the *KIT* D816V

mutation in bone marrow mast cells,^{6,10} as also found in our series of 456 cases from which the 192 *KIT* D816V patients here reported were selected. Moreover, virtually all aggressive systemic mastocytosis cases, as well as around one-fourth of indolent systemic mastocytosis patients,⁶ present multilineage involvement of bone marrow cell compartments other than mast cells by the *KIT* mutation,^{11,12,25,26} this being considered as the most powerful prognostic factor for disease progression among adult indolent systemic mastocytosis patients.^{7,10,27}

Recently, several groups^{9,13,14} have confirmed the feasibility of detecting the *KIT* mutation in peripheral blood leukocytes; consequently, sensitive allele-specific oligonucleotide-qPCR approaches for peripheral blood detection of the *KIT* D816V mutation^{13,28} have been included in recent consensus diagnostic algorithms¹⁸ owing to the less invasive diagnostic approach in peripheral blood vs bone marrow. However, careful analysis of the literature shows discrepant results regarding both the frequency of systemic mastocytosis cases who are *KIT* D816V⁺ in peripheral blood and the prognostic impact of the *KIT* D816V allele burden. Thus, while Kristensen *et al.*^{9,29} reported positive rates in peripheral blood samples of indolent systemic mastocytosis cases between 96% and 100%, Erben *et al.*³⁰ only found 46% of indolent systemic mastocytosis patients to be positive in peripheral blood using a different allele-specific quantitative real-time PCR method. In turn, whereas Erben *et al.*³⁰ suggested that a greater amount of *KIT* D816V⁺ cells in peripheral blood is associated with a poorer outcome, the Danish group¹⁵ did not find any correlation between the allele burden for the *KIT* D816V mutation and the clinical manifestations of indolent systemic mastocytosis. Overall, such apparently discrepant results could be explained by the fact that different approaches were used to assess peripheral blood involvement by the *KIT* mutation (analysis on gDNA^{9,13} vs cDNA³⁰), which therefore might have different sensitivities. Of note, no study has been reported so far in which paired peripheral blood and bone marrow samples had been analyzed in large series of systemic mastocytosis cases by two or more (highly sensitive) PCR methods,²⁸ to clarify such discrepancies. Furthermore, the precise relationship between the presence of *KIT* D816V⁺ cells in peripheral blood and multilineage involvement of bone marrow hematopoiesis by the *KIT* mutation also remains unknown.

In this study, we compared the performance of the two most widely accepted methods²⁸ (peptide nucleic acid-mediated PCR-clamping technique¹⁷ vs allele-specific oligonucleotide-qPCR¹³), which are currently used to detect the *KIT* D816V mutation in clinical diagnostic laboratories, on the same gDNA samples obtained from paired peripheral blood leukocytes and highly purified bone marrow CD34⁺ hematopoietic stem and precursor cells and maturing neutrophils, from a large cohort of systemic

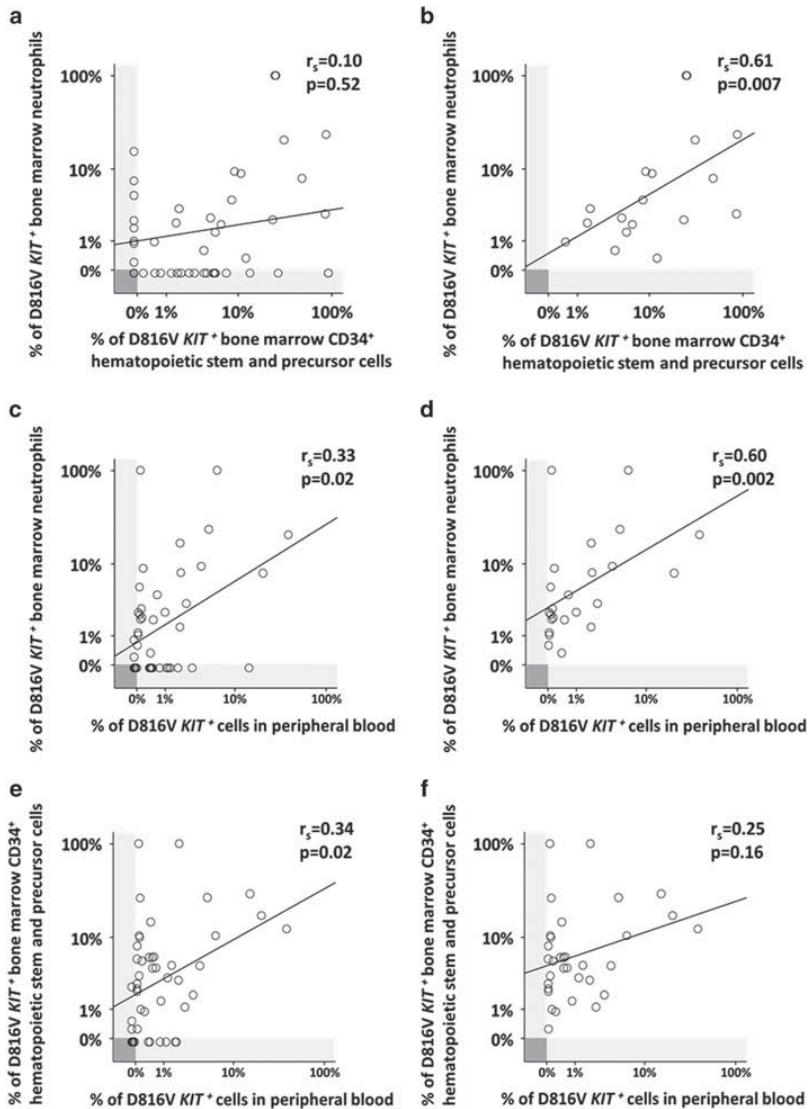


Figure 3 Correlation between the percentage of KIT D816V mutated bone marrow CD34⁺ hematopoietic stem and precursor cells and maturing neutrophils and peripheral blood leukocytes in systemic mastocytosis patients. Analysis of the KIT D816V mutation is shown for all indolent systemic mastocytosis patients for whom paired bone marrow CD34⁺ hematopoietic stem and precursor cells plus maturing neutrophils and peripheral blood leukocytes were studied ($n=49$). In (a) and (b), the correlation between the percentage of KIT D816V bone marrow CD34⁺ hematopoietic stem and precursor cells (Y axis) and maturing neutrophils (X axis) is shown for all cases evaluated (a) and only for those patients who had the D816V mutation in both bone marrow cell subsets ($n=18$), respectively (b). (c) and (d) The correlation between the percentage of KIT-mutated peripheral blood nucleated cells (X axis) and bone marrow-purified CD34⁺ hematopoietic stem and precursor cells (Y axis) for all cases tested ($n=49$) and for those cases who were D816V positive in both cell populations ($n=24$), respectively. (e) and (f) The correlation between the percentage of KIT-mutated peripheral blood nucleated cells (X axis) and maturing neutrophils (Y axis) for all cases evaluated ($n=49$) and for those cases who were D816V-positive in both cell populations ($n=33$), respectively.

mastocytosis patients. To the best of our knowledge, this is the only series of systemic mastocytosis patients in which both methods have been performed in parallel to evaluate their accuracy in both detecting the KIT mutation in peripheral blood and

determining its relationship with multilineage involvement of bone marrow hematopoiesis.

Overall, our results confirmed that allele-specific oligonucleotide-qPCR is significantly more sensitive than peptide nucleic acid-mediated PCR to identify

the *KIT* D816V mutation in both peripheral blood leukocytes and purified bone marrow cell populations, in line with the higher frequencies of *KIT* mutated cases reported in the literature with the former technique.^{9,29} In contrast, both methods showed an overall similar accuracy to predict for mast cell-restricted vs multilineage bone marrow involvement by the *KIT* mutation based on peripheral blood screening, whenever quantitative (the *KIT* allele burden) instead of qualitative (negative vs positive peripheral blood for the *KIT* mutation) allele-specific oligonucleotide-qPCR results were used. Of note, similar results were observed when we restricted the analysis to indolent systemic mastocytosis patients grouped according to the presence vs absence of skin lesions, although both a lower sensitivity and overall accuracy for the detection of the *KIT* D816V mutation were observed among indolent systemic mastocytosis without skin lesions vs indolent systemic mastocytosis with skin lesions cases for the qualitative allele-specific oligonucleotide-qPCR vs both the allele-specific oligonucleotide-qPCR allele burden and the peptide nucleic acid-mediated PCR method. Thus, while the quantitative allele-specific oligonucleotide-qPCR and the peptide nucleic acid-mediated-PCR methods showed a great efficiency in classifying indolent systemic mastocytosis with skin lesions and indolent systemic mastocytosis without skin lesions patients as having mast cell-restricted vs multilineage bone marrow disease, the qualitative allele-specific oligonucleotide-qPCR approach showed a similarly poorer performance in the two subgroups of indolent systemic mastocytosis patients owing to its lower specificity. Noteworthy, similar results were also obtained when multilineage involvement of bone marrow hematopoiesis was defined by the presence of *KIT*-mutated bone marrow maturing neutrophils by allele-specific oligonucleotide-qPCR. Altogether, these results support the recent consensus proposal, to introduce the use of allele-specific oligonucleotide-qPCR analysis of peripheral blood leukocytes in the diagnostic screening of systemic mastocytosis.^{9,18} However, caution should be taken in systemic mastocytosis cases presenting with mast cell activation-associated symptoms (e.g., anaphylaxis) in the absence of skin lesions if the mutation is not detected, because around one-third of indolent systemic mastocytosis without skin lesions cases carrying the *KIT* D816V mutation in bone marrow cells this mutation could not be detected in peripheral blood by either of the methods. More importantly, no clear association was found between the qualitative allele-specific oligonucleotide-qPCR method and multilineage involvement of bone marrow hematopoiesis using the presence of the mutation in peripheral blood; in contrast, the *KIT* allele burden by (quantitative) allele-specific oligonucleotide-qPCR and the detection of the *KIT* D816V⁺ mutation in peripheral blood cells by the peptide nucleic acid-mediated PCR method were

both highly predictive for multilineage involvement of bone marrow hematopoiesis.

To clarify the lack of correlation between the qualitative allele-specific oligonucleotide-qPCR and peptide nucleic acid-mediated PCR methods, we investigated the presence of the *KIT* mutation in highly purified compartments of bone marrow CD34⁺ hematopoietic stem and precursor cells and maturing neutrophils with both techniques, and compared them with the peripheral blood results. As expected, the allele-specific oligonucleotide-qPCR method detected involvement of CD34⁺ hematopoietic stem and precursor cells and/or maturing neutrophils in a higher proportion of cases compared with the peptide nucleic acid-mediated PCR method, but with a lower median allele burden in the negative vs positive cases for the latter approach. Altogether, these results support the established notion that systemic mastocytosis is a stem cell disease,^{6,12,31} a notion that is further demonstrated here by the high rate of involvement of CD34⁺ hematopoietic stem and precursor cells and other non-mast cells lineages by the *KIT* D816V mutation. Nonetheless, no significant correlation was found between the percentage of bone marrow CD34⁺ hematopoietic stem and precursor cells, as well as maturing neutrophils carrying the *KIT* D816V mutation, with a significant proportion of cases showing the mutation in CD34⁺ hematopoietic stem and precursor cells but not in maturing neutrophils. This suggests that the presence of the *KIT* mutation in a small percentage of CD34⁺ hematopoietic stem and precursor cells could most likely be associated with maturation towards cell lineages other than the neutrophil lineage, for example, mast cells and potentially also other minor myeloid lineages such as the eosinophil and basophil lineages.^{12,32} In line with this hypothesis, although a significant correlation was found between the percentage of bone marrow maturing neutrophils (and CD34⁺ hematopoietic stem and precursor cells) and the proportion of peripheral blood leukocytes carrying the *KIT* mutation, such correlation was only marginal. These results further suggest that cell compartments other than the neutrophils and CD34⁺ hematopoietic stem and precursor cells also contribute to the peripheral blood allele burden. Alternatively, the lack of association between the presence of the *KIT* mutation in bone marrow CD34⁺ hematopoietic stem and precursor cells and maturing neutrophils or peripheral blood leukocytes could be due to contamination of bone marrow CD34⁺ hematopoietic stem and precursor cells samples by low numbers of bone marrow mast cells carrying the *KIT* mutation, which seems unlikely since this was systematically ruled out for all sorted cell populations.

Altogether, these results might also contribute to explain the different degree of association observed between each of the two (peptide nucleic acid-mediated PCR and qualitative allele-specific oligonucleotide-qPCR) methods and multilineage bone

marrow involvement by the *KIT* mutation. Thus, the *KIT*-mutated cell fractions detected by the allele-specific oligonucleotide-qPCR method could consist of minor circulating peripheral blood cells such as CD34⁺ hematopoietic stem and precursor cells, circulating mast cells progenitors and/or basophils, which were not systematically investigated to define multilineage bone marrow involvement by the peptide nucleic acid-mediated PCR method. At the same time, our results suggest that a minimum number of mutated cells circulating in peripheral blood may be required to identify bone marrow multilineage involvement in peripheral blood, as suggested by the better results found once the qualitative results of the allele-specific oligonucleotide-qPCR technique were replaced by a quantitative (allele burden) threshold. In line with this, Hoermann *et al.*¹⁴ recently showed that systemic mastocytosis with a higher bone marrow allele burden (>2%) have a greater probability of showing disease progression. However, it should be noted that, despite the higher allele burden for the *KIT* mutation observed in our series in the peripheral blood of cases showing multilineage vs mast cell-restricted *KIT* mutation, still half of systemic mastocytosis patients who showed multilineage bone marrow involvement had *KIT* allele burden values in peripheral blood below the most specific cutoff identified (6% *KIT*-mutated peripheral blood cells). These results did not allow us to validate the peripheral blood allele burden (6%) to stratify systemic mastocytosis patients according to their probability of showing multilineage bone marrow involvement by the *KIT* mutation. Therefore, further studies in large series of indolent systemic mastocytosis patients with a long follow-up are required to establish the prognostic value of the peripheral blood allele burden.

In summary, our results confirm the presence of the *KIT* mutation in peripheral blood of most systemic mastocytosis patients by the allele-specific oligonucleotide-qPCR method, particularly among indolent systemic mastocytosis with skin lesions and aggressive systemic mastocytosis cases, and also in the majority of indolent systemic mastocytosis without skin lesions patients. In addition, we also show that the allele burden of *KIT*-mutated peripheral blood cells by this method or the established peptide nucleic acid-mediated PCR approach can accurately predict for the presence of multilineage involvement of bone marrow hematopoiesis by the *KIT* mutation and may therefore be used as a surrogate marker for multilineage disease.

Acknowledgments

This work was supported in part by grants from the Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS; grant number PI11/02399, FEDER) and Red Temática de Investigación Cooperativa en Cáncer (RTICC; grant

number RD12/0036/0048, FEDER) of the Instituto de Salud Carlos III (Ministry of Economy and Competitiveness, Madrid, Spain), from Fundación Ramon Areces (Madrid, Spain; grant number CIVP16A1806) and from Ayudas a Proyectos de Investigación en Salud de la Fundación Mutua Madrileña 2014 and Asociación Española de Enfermos de Mastocitosis (AEDM 2014). The National DNA Bank is supported by grants from the Instituto de Salud Carlos III of the Ministerio de Economía y Competitividad of Spain (grant numbers PT13/0001/0037 and PT13/0010/0067, FEDER). AM was supported by RTICC.

Disclosure/conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- 1 Valent P, Horny HP, Escribano L *et al.* Diagnostic criteria and classification of mastocytosis: a consensus proposal. *Leuk Res* 2001;25:603–625.
- 2 Horny HP, Metcalfe DD, Bennet JM *et al.* Mastocytosis. In: Swerdlow SHCE, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman JW (eds). *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. IARC Press: Lyon, France, 2008, pp 54–63.
- 3 Sanchez-Munoz L, Alvarez-Twose I, Garcia-Montero AC *et al.* Evaluation of the WHO criteria for the classification of patients with mastocytosis. *Mod Pathol* 2011;24:1157–1168.
- 4 Alvarez-Twose I, Gonzalez de Olano D, Sanchez-Munoz L *et al.* Clinical, biological, and molecular characteristics of clonal mast cell disorders presenting with systemic mast cell activation symptoms. *J Allergy Clin Immunol* 2010;125:1269–1278.
- 5 Alvarez-Twose I, Gonzalez-de-Olano D, Sanchez-Munoz L *et al.* Validation of the REMA score for predicting mast cell clonality and systemic mastocytosis in patients with systemic mast cell activation symptoms. *Int Arch Allergy Immunol* 2012;157: 275–280.
- 6 Garcia-Montero AC, Jara-Acevedo M, Teodosio C *et al.* *KIT* mutation in mast cells and other bone marrow hematopoietic cell lineages in systemic mast cell disorders: a prospective study of the Spanish Network on Mastocytosis (REMA) in a series of 113 patients. *Blood* 2006;108:2366–2372.
- 7 Teodosio C, Garcia-Montero AC, Jara-Acevedo M *et al.* Mast cells from different molecular and prognostic subtypes of systemic mastocytosis display distinct immunophenotypes. *J Allergy Clin Immunol* 2010;125: 719–726.
- 8 Escribano L, Garcia Montero AC, Nunez R *et al.* Flow cytometric analysis of normal and neoplastic mast cells: role in diagnosis and follow-up of mast cell disease. *Immunol Allergy Clin N Am* 2006;26: 535–547.
- 9 Kristensen T, Vestergaard H, Bindslev-Jensen C *et al.* Sensitive *KIT* D816V mutation analysis of blood as a diagnostic test in mastocytosis. *Am J Hematol* 2014;89: 493–498.

- 10 Escribano L, Alvarez-Twose I, Sanchez-Munoz L *et al*. Prognosis in adult indolent systemic mastocytosis: a long-term study of the Spanish Network on Mastocytosis in a series of 145 patients. *J Allergy Clin Immunol* 2009;124:514–521.
- 11 Akin C, Kirshenbaum AS, Semere T *et al*. Analysis of the surface expression of c-kit and occurrence of the c-kit Asp816Val activating mutation in T cells, B cells, and myelomonocytic cells in patients with mastocytosis. *Exp Hematol* 2000;28:140–147.
- 12 Yavuz AS, Lipsky PE, Yavuz S *et al*. Evidence for the involvement of a hematopoietic progenitor cell in systemic mastocytosis from single-cell analysis of mutations in the *c-kit* gene. *Blood* 2002;100:661–665.
- 13 Kristensen T, Vestergaard H, Moller MB. Improved detection of the *KIT* D816V mutation in patients with systemic mastocytosis using a quantitative and highly sensitive real-time qPCR assay. *J Mol Diagn* 2011;13:180–188.
- 14 Hoermann G, Gleixner KV, Dinu GE *et al*. The *KIT* D816V allele burden predicts survival in patients with mastocytosis and correlates with the WHO type of the disease. *Allergy* 2014;69:810–813.
- 15 Broesby-Olsen S, Kristensen T, Vestergaard H *et al*. *KIT* D816V mutation burden does not correlate to clinical manifestations of indolent systemic mastocytosis. *J Allergy Clin Immunol*. 2013;132:723–728.
- 16 Akin C, Valent P, Metcalfe DD. Mast cell activation syndrome: proposed diagnostic criteria. *J Allergy Clin Immunol* 2010;126:1099–1104.
- 17 Sotlar K, Escribano L, Landt O *et al*. One-step detection of c-kit point mutations using peptide nucleic acid-mediated polymerase chain reaction clamping and hybridization probes. *Am J Pathol* 2003;162:737–746.
- 18 Valent P, Escribano L, Broesby-Olsen S *et al*. Proposed diagnostic algorithm for patients with suspected mastocytosis: a proposal of the European Competence Network on Mastocytosis. *Allergy* 2014;69:1267–1274.
- 19 Teodosio C, Garcia-Montero AC, Jara-Acevedo *et al*. An immature immunophenotype of bone marrow mast cells predicts for multilineage D816V *KIT* mutation in systemic mastocytosis. *Leukemia* 2012;26:951–958.
- 20 Matito A, Morgado JM, Alvarez-Twose I *et al*. Serum tryptase monitoring in indolent systemic mastocytosis: association with disease features and patient outcome. *PLoS One* 2013;8:e76116.
- 21 Teodosio C, Garcia-Montero AC, Jara-Acevedo M *et al*. Gene expression profile of highly purified bone marrow mast cells in systemic mastocytosis. *J Allergy Clin Immunol* 2013;131:24 e1–24 e4.
- 22 Alvarez-Twose I, Zanotti R, Gonzalez-de-Olano D *et al*. Nonaggressive systemic mastocytosis (SM) without skin lesions associated with insect-induced anaphylaxis shows unique features versus other indolent SM. *J Allergy Clin Immunol* 2014;133:520–528.
- 23 Butterfield JH, Weiler D, Dewald G. Establishment of an immature mast cell line from a patient with mast cell leukemia. *Leuk Res* 1988;12:345–355.
- 24 Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 2001;29:e45.
- 25 Taylor ML, Sehgal D, Raffeld M *et al*. Demonstration that mast cells, T cells, and B cells bearing the activating Kit mutation D816V occur in clusters within the marrow of patients with mastocytosis. *J Mol Diagn* 2004;6:335–342.
- 26 Kocabas CN, Yavuz AS, Lipsky PE *et al*. Analysis of the lineage relationship between mast cells and basophils using the *c-kit* D816V mutation as a biologic signature. *J Allergy Clin Immunol* 2005;115:1155–1161.
- 27 Worobec AS, Semere T, Nagata H *et al*. Clinical correlates of the presence of the Asp816Val c-kit mutation in the peripheral blood mononuclear cells of patients with mastocytosis. *Cancer* 1998;83:2120–2129.
- 28 Arock M, Sotlar K, Akin C, Broesby-Olsen S *et al*. Mutation analysis in mast cell neoplasms: recommendations of the European Competence Network on Mastocytosis. *Leukemia*; advance online publication, 4 February 2015; doi:10.1038/leu.2015.24 (e-pub ahead of print).
- 29 Kristensen T, Broesby-Olsen S, Vestergaard H *et al*. Circulating *KIT* D816V mutation-positive non-mast cells in peripheral blood are characteristic of indolent systemic mastocytosis. *Eur J Haematol* 2012;89:42–46.
- 30 Erben P, Schwaab J, Metzgeroth G *et al*. The *KIT* D816V expressed allele burden for diagnosis and disease monitoring of systemic mastocytosis. *Ann Hematol* 2014;93:81–88.
- 31 Akin C. Clonality and molecular pathogenesis of mastocytosis. *Acta Haematol* 2005;114:61–69.
- 32 Pardanani A, Reeder T, Li CY, Tefferi A. Eosinophils are derived from the neoplastic clone in patients with systemic mastocytosis and eosinophilia. *Leuk Res* 2003;27:883–885.

ARTÍCULO 3

“La presencia de la mutación D816V de *KIT* en células mesenquimales de médula ósea de pacientes con mastocitosis sistémica indolente se asocia con la progresión clínica de la enfermedad”

Introducción: La mutación D816V de *KIT* es la alteración genética más frecuente en la MS, estando presente en más del 95% de los pacientes con MSI y MSA. Además, se ha demostrado que su presencia en varias líneas hematopoyéticas se asocia con la afectación de múltiples células “stem” hematopoyéticas y un mayor riesgo de progresión de la enfermedad. Estos hallazgos ponen de manifiesto la posibilidad de que la mutación pudiera ocurrir, al menos en una parte de estos pacientes, en un precursor común de la célula “stem” mesenquimal (MSC) y de la célula “stem” hematopoyética (CPH). En tal caso, esto se asociaría con una mayor afectación de la hematopoyesis que favorecería la adquisición de (otras) mutaciones secundarias en células ya portadoras de la mutación D816V, lo cual podría explicar el mayor riesgo de progresión de este grupo de pacientes.

Objetivo: En este trabajo nos propusimos investigar la posible presencia de la mutación D816V de *KIT* en MSC de MO de pacientes con MSI y mutación multilineal con el fin de determinar el posible impacto que tendría este hallazgo en la progresión clínica y el pronóstico de los pacientes con MSI.

Pacientes, materiales y métodos: En conjunto, analizamos la presencia de la mutación D816V de *KIT* en gADN proveniente de poblaciones celulares purificadas de MO de 83 pacientes con MSI. La mediana de seguimiento de estos pacientes en el momento de cerrar este estudio era de 116 meses. El análisis de la mutación D816V de *KIT* se realizó en paralelo mediante técnica de PCR específica de alelo (ASO-qPCR) y técnica de PCR con bloqueo de la secuencia silvestre de *KIT* mediante un oligonucleótido de PNA (PNA-PCR). Además, se comprobó el patrón de clonalidad de los mastocitos patológicos mediante un test de inactivación del cromosoma X (test Humara) en 26 de las 46 mujeres con MSI incluidas en el estudio.

Resultados: Nuestros resultados mostraron que todos aquellos pacientes en los que se detectó la presencia de la mutación D816V de *KIT* en MSC de MO (22/83; 27%) tenían también afectadas por la mutación otras líneas celulares hematopoyéticas de la MO. En este sentido, también cabe resaltar que el grado de afectación de la hematopoyesis por la mutación D816V de *KIT* en pacientes con alteración de las MSC incluía, con elevada frecuencia, la afectación simultánea de las líneas mieloide y linfoide (59% vs. 22% en los pacientes con afectación multilineal en ausencia de la mutación en las MSC; $P=0.03$). Por otra parte, los pacientes con MSC negativas para la mutación de *KIT* presentaban un patrón clonal (100%) de inactivación del cromosoma X en sus mastocitos patológicos, mientras que los sujetos que presentaban MSC mutadas mostraban en su mayoría (64%) un patrón policlonal ($P=0.01$). Desde el punto de vista clínico, los pacientes con mutación de *KIT* en las MSC presentaban también características clínicas y biológicas asociadas a mayor riesgo de progresión de la enfermedad, incluyendo una supervivencia libre de progresión significativamente más corta.

Conclusiones: En este trabajo demostramos por primera vez, la presencia de la mutación D816V de *KIT* en MSC de una proporción significativa de pacientes con MSI, asociándose con frecuencia a un patrón policlonal de inactivación del cromosoma X en los mastocitos patológicos. Estos hallazgos sugieren que en estos pacientes el evento mutagénico podría ocurrir en una célula precursora común, capaz de diferenciarse a CPH y MSC, de forma previa a la inactivación del cromosoma X en mujeres. Desde un punto de vista clínico, la presencia de la mutación D816V de *KIT* en un precursor temprano de la CPH constituye un importante factor de riesgo de progresión de la enfermedad al estar asociado a una supervivencia libre de progresión significativamente más corta.

TITLE: *KIT* D816V mutated bone marrow mesenchymal stem cells in indolent systemic mastocytosis are associated with disease progression.

RUNNING HEAD: *KIT* D816V MUTATED MESENCHYMAL STEM CELLS IN SM

AUTHORS:

Andres C Garcia-Montero, PhD^{*.1};

Maria Jara-Acevedo, MSc^{*.2};

Ivan Alvarez-Twose, MD⁴;

Cristina Teodosio, PhD³;

Laura Sanchez-Muñoz, MD, PhD⁴;

Carmen Muñoz, MSc¹;

Javier I Muñoz-Gonzalez, MSc¹;

Andrea Mayado, PhD¹;

Almudena Matito, MD, PhD⁴;

Carolina Caldas, MSc¹;

Jose M Morgado, MSc⁴;

Luis Escribano, MD, PhD¹;

Alberto Orfao, MD, PhD¹

INSTITUTIONS: ¹Servicio General de Citometría (NUCLEUS), Centro de Investigación del Cáncer (IBMCC-CSIC/USAL and IBSAL) and Departamento de Medicina, Universidad de Salamanca, Spain; ²Servicio de Secuenciación de ADN, Centro de Investigación del Cáncer (IBMCC-CSIC/USAL and IBSAL) and Departamento de Medicina, Universidad de Salamanca, Spain; ³Department of Immunology, Erasmus MC, University Medical Center Rotterdam, Rotterdam, The Netherlands; ⁴Instituto de Estudios de Mastocitosis de Castilla La Mancha (CLMast), Hospital Virgen del Valle, Toledo, Spain; ^{*}These authors have contributed equally to this work and they should be both considered as 'first author'.

CORRESPONDING AUTHORS: Professor **Alberto Orfao**. Centro de Investigación del Cáncer, Campus Miguel de Unamuno, 37007 Salamanca, Spain. Phone: +34 923 29 48 11. Fax: +34 923 29 47 95. e-mail: orfao@usal.es; Dr **Andrés C Garcia-Montero**. Centro de Investigación del Cáncer, Campus Miguel de Unamuno, 37007 Salamanca, Spain. Phone: +34 923 29 45 00 Ext: 5475. e-mail: angarmon@usal.es

TOTAL TEXT WORD COUNT: 3915

ABSTRACT WORD COUNT: 249

NUMBER OF FIGURES: 1

NUMBER OF TABLES: 4

REFERENCE COUNT: 64

SCIENTIFIC HEADING: Myeloid Neoplasia

KEY POINTS:

- Acquisition of the *KIT* D816V mutation in an early pluripotent progenitor cell confers ISM cases a greater risk for disease progression.
- Despite the early acquisition of the *KIT* mutation, onset of clinical symptoms of ISM is often delayed to the middle-adulthood.

ABSTRACT

Multilineage involvement of bone marrow (BM) hematopoiesis by the somatic *KIT* D816V mutation is present in a subset of adult indolent systemic mastocytosis (ISM) patients in association with a poorer prognosis. Here we investigated the potential

involvement of BM mesenchymal stem cells (MSC) from ISM patients by the *KIT* D816V mutation and its potential impact on disease progression and outcome. The *KIT* D816V mutation was investigated in highly-purified BM MSC and other BM cell populations from 83 ISM patients followed for a median of 116 months. *KIT* D816V-mutated MSC were detected in 22/83 (27%) cases. All MSC-mutated patients had multilineage *KIT* mutation (100% vs 30%, $p=0.0001$) and they more frequently showed involvement of lymphoid plus myeloid BM cells (59% vs 22%; $P=.03$) and a polyclonal pattern of inactivation of the X-chromosome of *KIT*-mutated BM mast cells (64% vs 0%; $P=0.01$) vs other multilineage ISM cases. Moreover, presence of *KIT*-mutated MSC was associated with more advanced disease features of ISM, a greater rate of disease progression (50% vs 17%; $P=.04$) and a shorter progression-free survival at 10, 20 and 30 years ($P\leq.003$). Overall, these results support the notion that ISM patients with mutated MSC may have acquired the *KIT* mutation in a common pluripotent progenitor cell, prior to differentiation into MSC and hematopoietic precursor cells, before the X-chromosome inactivation process occurs. From a clinical point of view, acquisition of the *KIT* mutation in an earlier BM precursor cell confers a significantly greater risk for disease progression and a poorer outcome.

INTRODUCTION

The *KIT* D816V mutation¹ is the most common genetic alteration of systemic mastocytosis (SM)^{2,3} being present in >95% of adults with indolent (ISM) and aggressive (ASM) SM⁴. Therefore, on its own this mutation cannot explain the different clinical outcomes⁵ of indolent cases that show a normal life expectancy (e.g. most ISM)^{6,7} versus the more severe forms of SM -i.e. ASM and mast cell leukemia (MCL)- in whom patient's outcome is significantly compromised⁸. Thus, secondary genetic lesions on top of the *KIT* mutation or upon cooperation with a particular genetic background are potentially needed for malignant transformation of ISM into severe disease⁹⁻¹¹.

In recent years, we have shown that around one-third of ISM patients carry multilineage myeloid and/or lymphoid involvement of hematopoiesis by the *KIT* D816V mutation in bone marrow (BM) cell compartments other than mast cells (MC)⁴, this being associated with a higher risk for disease progression⁷. Altogether, these results suggest that occurrence of the *KIT* D816V mutation in an early precursor cell could be associated with higher numbers of mutated hematopoietic progenitors, a greater extent of involvement of hematopoiesis by the mutation and a higher probability of progression of ISM to advanced disease -e.g. ASM, MCL and SM associated to other hematological non-MC diseases (SM-AHNMD)-.

The potential occurrence of the *KIT* mutation in an uncommitted hematopoietic stem and precursor cell (HPC) was first evidenced by the demonstration of this mutation in multiple non-MC myeloid¹²⁻¹⁵ and also lymphoid^{12,15,16} cells, in addition to CD34⁺HPC⁴. In parallel, involvement of a multipotent CD34⁺/CD38⁻ HPC has also been demonstrated in other myeloproliferative neoplasms (MPN), myelodysplastic

syndromes (MDS)¹⁷⁻¹⁹, and acute myeloid leukemia^{20,21}. Moreover, the AHNMD cells from SM-AHNMD patients often carry the *KIT* D816V mutation²²⁻²⁴ supporting a common clonal origin for both disease components in an HPC with multilineage potential.

Despite the above, at present it still remains to be established whether in SM the somatic *KIT* D816V mutation occurs at the level of CD34+HPC or at an earlier precursor cell. Most likely, early (indolent) forms of SM are accumulative diseases with limited proliferation and expansion of clonal MC²⁵⁻²⁷; in aggressive cases, additional secondary genetic alterations⁹ are likely to occur in *KIT* D816V⁺ precursors. The earlier the *KIT* mutation would emerge, the greatest extent of involvement of hematopoiesis would occur with a potentially greater risk for additional secondary genetic alterations and progression of the disease. In this regard, mesenchymal stem cells (MSC) have been long described as precursor cells that have the ability for differentiation into various mesodermal lineages and tissues²⁸. MSC are present in the BM stroma to provide microenvironmental support to HPC with whom they share an ontogenic link^{29,30}. Despite MSC share cytogenetic alterations with HPC in MPN, MDS and other hematological conditions³¹⁻³⁴, no study has been reported so far in which the presence of the *KIT* D816V mutation is investigated in BM MSC from ISM patients.

Here we investigated the potential involvement of BM MSC by the *KIT* D816V mutation in a cohort of 83 ISM patients in order to determine its potential impact on disease progression and patient outcome.

METHODS

Patients. Eighty-three patients (37 men and 46 women; median age at diagnosis of 42 years) diagnosed with ISM at the reference centres of the Spanish Network on Mastocytosis (REMA, Toledo, Spain) were selected from a series of 169 consecutive ISM patients (43 cases having MC-restricted and 40 multilineage *KIT* mutation according to previously defined criteria⁷) and prospectively included in this study. Patient selection (n=83) was based on the availability of sufficient ($\geq 3 \times 10^3$) highly-purified BM MSC to perform further molecular analyses. Diagnosis and classification of SM was made according to the World Health Organization (WHO) 2008³⁵ and the more recent European Competence Network on Mastocytosis³⁶ criteria. Prior to entering the study, patients gave their written informed consent to participate according to the Declaration of Helsinki; the study was approved by the local institutional Ethics Committees.

Follow-up studies and disease progression. At diagnosis, and subsequently every 6-12 months, or whenever disease progression was suspected, a complete clinical and physical examination, including a BM study, a skin biopsy, evaluation of serum baseline tryptase levels and bone lesions, were performed, as previously described⁷.

Disease progression was defined as transformation of ISM into a more aggressive subtype of mastocytosis^{35,36} including smoldering SM (SSM), ASM and/or SM-AHNMD, after a median follow-up from disease onset of 116 months (range: 28 to 544 months). In detail this included emergence of ≥ 2 "B" findings (i.e. organomegaly without impaired organ function; BM infiltration with $>30\%$ of focal and dense aggregates of MC; serum tryptase $>20\text{ng/ml}$; dysplasia or myeloproliferation with non AHNMD and normal blood counts) in the absence (e.g. SSM) or in the presence (ASM)

of ≥ 1 "C" findings (i.e. organomegaly with organ failure; BM dysfunction with cytopenia; large osteolytic lesions and/or pathological fractures; malabsorption with weight loss) according to the WHO criteria.³⁵

Immunophenotypic characterization of BM cell populations. Fresh EDTA-anticoagulated BM aspirated samples collected from the iliac crest, were used for multiparameter flow cytometry immunophenotypic analysis of BM cell populations, after they had been stained with a large panel of monoclonal antibodies (MoAbs) (Table 1), following previously described protocols³⁷.

Purification of MC, MSC and other BM cell populations. Isolation of antibody-stained (Table 1) BM cell populations was performed using well established stain-and-then-lyse-and-wash procedures³⁸ and a 4-way fluorescence-activated cell sorter (FACSARIA III, Becton/Dickinson Biosciences, San Jose, CA), as described elsewhere⁴. For BM cell isolation purposes, MC were identified as $CD117^{high}/CD45^{+}/CD34^{-}/CD3^{-}/CD14^{-}/CD105^{-}$ cells, monocytes as $CD45^{high}/CD14^{high}/CD34^{-}/CD117^{-}/CD3^{-}$ cells, maturing neutrophils were defined as $CD45^{+}/CD34^{-}/CD117^{-}/CD3^{-}/CD14^{-}$ cells, eosinophils as $CD45^{+}/CD13^{+}/CD34^{-}/CD117^{-}/CD3^{-}/CD105^{-}/CD14^{-}$ sideward scatter (SSC)^{high} with high green and orange autofluorescence cells, $CD34^{+}HPC$ were identified as cells with a $CD34^{+}/CD45^{low}/CD117^{-/+}/CD13^{-/+}/CD105^{-/+}/CD3^{-}/CD14^{-}$ phenotype and SSC^{low/int}, and T cells were defined as $CD3^{+}/CD45^{high}/CD34^{-}/CD13^{-}/CD14^{-}/CD105^{-}/CD117^{-}$ cells. Identification and purification of MSC was based on a $CD105^{+}/CD13^{high}/CD45^{-}/CD34^{-}/CD14^{-}/CD3^{-}$ immunophenotype³⁹. The purity of each of the isolated BM cell populations was systematically $>98\%$ in the absence of cross-contamination by MC ($<0.001\%$) or any other $KIT D816V^{+}$ BM cell population.

Validation of the CD105/CD13/CD45/CD34/CD14/CD3 antibody combination for the identification of MSCs was performed in each individual sample, by further evaluating their immunophenotypic profile using a broad panel of MoAbs (e.g. CD10, CD13, CD34, CD45, CD73, CD90, CD105, CD117, CD146, HLA-DR) including MoAbs for those proteins currently required for the definition of MSC^{40,41} (Table 1). In a subgroup of 7 ISM patients, the identity of the isolated CD105⁺/CD13^{high}/CD45⁻/CD34⁻/CD14⁻/CD3⁻ MSCs population was confirmed using an expanded MoAb panel containing additional MSC-associated markers such as the homing cell adhesion glycoprotein (CD44), the platelet-derived growth factor receptor beta (CD140b), the nerve growth factor receptor (CD271), the mesenchymal stem cell antigen (MSCA-1), the stage-specific embryonic antigen-4 (SSEA-4), and the stromal cell precursor antigen (STRO-1). Furthermore, the functionality of the isolated CD105⁺/CD13^{high}/CD45⁻ MSC population, was validated in 4 ISM patients carrying both myeloid plus lymphoid multilineage involvement of hematopoiesis by the *KIT* D816V mutation and mutated MSCs, through *in vitro* culture and expansion of the isolated MSC and evaluation of their ability to undergo adipogenic and osteogenic differentiation, following previously described culture and staining conditions.³⁹

DNA extraction and molecular studies. Genomic DNA (gDNA) was extracted from purified cell populations using previously described methods⁴. Positivity for the *KIT* D816V mutation was determined in gDNA of FACS-purified BM cell populations using a peptide-nucleic acid (PNA)-mediated PCR-clamping technique⁴. In order to validate those findings and to rule out any false positive result due to potential contamination of purified MSC by other *KIT* D816V mutated BM cells, the *KIT* mutational status of MSC was also investigated in parallel by a quantitative real-time allele-specific oligonucleotide qPCR (ASO-qPCR) method⁴² that provided an accurate measurement of

the mutated allele burden of the isolated MSC populations under study. Cases carrying *KIT* mutated MSC systematically showed a mutated allele burden greater than the contamination of the purified MSC by other BM cells. Multilineage (vs MC-restricted) *KIT* mutation was defined by the presence of the *KIT* mutation in maturing/matured BM cell compartments other than MC (e.g. neutrophils, monocytes, eosinophils, and/or lymphocytes, plus the CD34⁺HPC) vs only the MC. MC clonality was further assayed on gDNA from 26/46 female patients by the human-androgen receptor (HUMARA) X-chromosome inactivation test⁴³.

Statistical analyses. To assess the statistical significance (set at P -values<.05) of differences observed between groups, either the Mann-Whitney U or the Pearson's Chi-square and the Fisher's exact tests were used for continuous and categorical variables, respectively (SPSS 20.0, SPSS, Chicago, IL, USA). Progression-free survival (PFS) curves were estimated according to the Kaplan-Meier method and compared with the Breslow (i.e. generalized Wilcoxon) test (SPSS 20.0).

RESULTS

Immunophenotypic and functional characterization of BM MSCs from ISM patients. All purified CD105⁺/CD13^{high+}/CD45⁻ BM cells showed immunophenotypic features which were fully consistent with previously defined criteria for MSC³⁹⁻⁴¹, such as: absence of CD11b, CD14, CD19, CD34 and CD45 expression; heterogeneous reactivity for CD10 and HLA-DR, and; expression of the CD44, CD73, CD90, CD105, CD140b, CD146, CD271, MSCA-1, SSEA-4 and STRO-1 MSC-associated markers (Supplemental Figure 1).

Ex vivo culture and expansion of purified CD105⁺/CD13^{high}/CD45⁻ MSCs in 4 ISM cases carrying *KIT* D816V⁺ MSC (median allele burden of 17%, range: 9%-34%) confirmed the presence of the *KIT* mutation in cultured MSC from all 4 cases in the first culture passage (median of 17 days of culture; range: 14-26 days) with a median *KIT* D816V mutated allele burden of 11% (range: 6-26%). In contrast, no *KIT* D816V mutated MSCs were detected after passage 3 (median of 39 days of culture; range: 27-47 days). After passage 4 (median of 45 days of culture; range: 32-55 days), in 3/4 cases enough cultured cells were obtained to evaluate the adipogenic and osteogenic differentiation of cultured MSC. Two cases showed normal adipogenic and osteogenic differentiation while the third case reached senescence prior to differentiating (Supplemental Figure 2).

Presence of the *KIT* D816V mutation in BM MSC and its association with ISM disease features at diagnosis. Overall, 22/83 ISM patients (27%) had the *KIT* D816V mutation in purified BM MSC (Table 2). All *KIT* D816V mutated-MSC patients showed a mutated allele burden >8% for the purified MSC population (median 18%; range: 8%-100%). Despite patients who had mutated MSC had a similar median follow-

up and distribution by sex and age at onset, to cases having non-mutated MSC, both patient groups showed markedly different disease features at diagnosis (Table 2). Thus, patients that had *KIT* D816V⁺ MSC displayed higher levels of BM MC infiltration (median: 0.49% vs 0.08%; $P=0.008$) and greater serum baseline tryptase (median: 170ng/ml vs 31.1ng/ml; $P=0.001$), together with an increased frequency of bone lesions (39% vs 8%; $P=0.002$), organomegalies (39% vs 7%; $P=0.006$), multilineage *KIT* mutation (100% vs 30%; $P<0.0001$) and, within multilineage cases, a greater number of cases with *KIT* mutated myeloid and lymphoid cells (59% vs 22%; $P=0.03$) (Table 2). Interestingly, HUMARA analysis showed a polyclonal X-chromosome inactivation pattern (XCIP) in purified BM MC from 7/11 female patients who carried *KIT* D816V⁺ MSC; by contrast, all 15 female patients analyzed who showed *KIT* D816V⁻ MSC had BM MC with a clonal pattern of X-chromosome inactivation by HUMARA (Table 2).

Association between the presence of *KIT* D816V⁺ BM MSC and patient outcome.

Overall, 14 ISM cases showed disease progression: 8 (57%) ISM evolved to ASM, 4 (29%) to SSM and 2 (14%) to SM-AHNMD (an MPN and a B-cell non-Hodgkin lymphoma) (Table 3). Median time from disease onset to progression was of 15 years. Except for a patient who progressed to ASM and displayed features associated with a moderate BM MC load (0.13% BM MC and 52.6ng/mL of serum baseline tryptase), all other patients displayed very high serum baseline tryptase levels (median: 275ng/mL; range: 144ng/mL to 2,036ng/mL) and/or of BM MC percentages (median: 3.1%; range: 0.06% to 18%) at progression. Of note, all ISM patients that progressed showed multilineage involvement of hematopoiesis by the *KIT* D816V mutation already at diagnosis.

From those 14 ISM cases that showed progression, 11 belonged to the *KIT* D816V⁺ MSC group (11/22, 50%), while only 3/61 ISM cases with non-mutated MSC showed disease progression (5%; $P=.0005$) (Table 2). Moreover, ISM patients with *KIT* D816V⁺ MSC also showed a significantly ($P<.001$) shorter PFS vs patients who had non-mutated MSC (75% PFS of 13 years vs not reached; $P<.001$) (Figure 1A) with significantly lower PFS rates at 10- (82%±8% vs 98%±2%; $P=.003$), 20- (63%±12% vs 98%±2%; $P<.001$) and 30-years (54%±13% vs 78%±18%; $P=.001$) (Table 4).

In order to determine whether the presence of *KIT* D816V⁺ MSC would be a better predictor for disease progression than the occurrence of multilineage involvement of BM hematopoiesis by the *KIT* mutation, we further restricted the comparison between patients with (n=22) vs without (n=18) *KIT* D816V⁺ MSC to multilineage cases (n=40). Once again, ISM cases with *KIT* D816V⁺ MSC more frequently had disease progression (50% vs 17%; $P=.04$) (Table 2). The adverse impact of having *KIT* D816V⁺ MSC also translated into progressively shorter PFS rates (vs ISM cases having non-mutated MSC) at 10- (82%±8% vs 94%±5%), 20- (63%±12% vs 94%±5%) and 30-years (54%±13% vs 63%±26%), although differences only reached marginal statistical significance at 20- and 30-years ($P\leq.08$) (Table 4). Despite the above differences in PFS rates, no statistically significant differences were found as regards overall survival between patients with vs without *KIT* D816V mutated MSC (overall survival rate at 10 years of 93.8% vs 100%, respectively). This is probably due to the fact that at the moment of closing this study, only 3/83 patients (3.6%) had died 7, 13 and 40 years after disease onset. Of note 2/3 cases had multilineage *KIT* mutation with *KIT* mutated MSC, the other patient having non-mutated MSC died from sepsis 40 years after disease onset.

DISCUSSION

Presence of the somatic *KIT* D816V mutation^{1,44} in BM MC is a molecular hallmark of adult SM⁴⁵ and a (minor) diagnostic criterion of the disease^{22,35,36}. Additionally, detection of the *KIT* D816V mutation is thoroughly applied to establish the clonal nature of the disease^{3,22,46}, and it has also been used as a molecular marker to track the clonal origin of different hematological cell lineages within a patient (i.e. through the definition of MC-restricted vs multilineage involvement of hematopoiesis) and to establish the clonal relationship between SM MC and the AHNMD tumor cells in SM-AHNMD^{12,13,15,16,23,47,48}. Around half of all 83 ISM cases here analyzed showed multilineage involvement of BM cells by the *KIT* D816V mutation and half of these multilineage cases also had *KIT* mutated MSC. Most interestingly, the presence of mutated MSC in the BM of ISM patients was associated with features of more advanced disease, a greater rate of disease progression and a shorter PFS. Of note, the greater frequency of multilineage *KIT* mutation among our cases vs previously published series from our group was due to the need for enough purified BM MSC for further molecular analyses, as discussed above in the methods section.

Interestingly, purified pathological *KIT* D816V⁺ BM MC from a significant proportion of female ISM cases here analyzed showed a “polyclonal” XCIP, despite these cells most likely have a “clonally”-related origin. The cellular mosaicism resulting from the analysis of the XCIP in females has long been used as a marker to investigate clonal development and relationship among distinct cell compartments in different human hematopoietic disorders^{19,49,50}; thus, a polyclonal XCIP in the absence of other genotypic markers (i.e. *KIT* D816V), could be interpreted as an accumulation of otherwise reactive, non-clonal MC. The apparent discrepancy observed between the genotypic clonality defined by the *KIT* D816V mutation and the polyclonal XCIP could

be explained either by a hypothetical reactivation of the inactive X-chromosome⁵¹ at any stage after the occurrence of the mutation in a committed HPC, or by the emergence of the *KIT* mutation in an uncommitted precursor/stem cell at relatively early stages of development (i.e. embryogenesis), prior to the inactivation of the X-chromosome during hematopoiesis. Since in human somatic cells XCIP appears to be rather stable⁵², the second hypothesis seems most feasible. Thus, occurrence of the *KIT* D816V mutation during ontogeny would potentially target an early precursor/stem cell leading to multiple (instead of one) involved HPC; most likely, this would more frequently lead to multilineage involvement of hematopoiesis (and potentially also other tissues) by the *KIT* mutation. In line with this hypothesis, all ISM cases that displayed a polyclonal XCIP for their BM MC, also had multilineage involvement of hematopoiesis by the *KIT* mutation. These findings support previous observations in advanced SM about the origin of clonal MC in a pluripotent HPC with the ability to differentiate to other non-MC myeloid and even lymphoid lineages^{12-16,45}. Most interestingly, this polyclonal XCIP found across multilineage ISM cases was restricted to two-thirds of the ISM female patients carrying *KIT* mutated MSC, while absent among ISM female patients with wild-type *KIT* MSC. MSC are multipotent mesodermal progenitor cells present in the BM stroma which diverged from the hematopoietic lineages early during embryogenesis²⁸; thereby, these results would support the notion that in these patients, the *KIT* mutation could have been acquired in a common pluripotent progenitor cell early during ontogeny, prior to differentiation into MSC and HPC. This hypothesis is also consistent with a report of two monozygotic twins with adult-onset ISM carrying the somatic *KIT* D816V mutation⁵³ who both presented a mosaic pattern for the *KIT* mutation compatible with multilineage involvement of hematopoiesis. Noteworthy, despite the (potentially) very early acquisition of this mutation during ontogeny, onset

of typical clinical symptoms of mastocytosis was delayed to their middle-adulthood, one of the twins progressing from ISM to an SM-AHNMD 30 years after skin lesions had appeared⁵³; this is in line with our observations and those of other groups^{7,54}.

As a consequence of the occurrence of the *KIT* mutation in a common mesodermal ancestor of MSC and HPC, a mosaic of the mutated pluripotent precursor cell progeny would also carry the *KIT* genetic alteration, including both myeloid and lymphoid committed HPC, as found in our cases. The more frequent (simultaneous) involvement of myeloid and lymphoid cells observed among ISM cases with mutated vs wild-type BM MSC may be due to a greater number of involved HPC and the more extended involvement of hematopoiesis in the former vs the latter group. In turn, the existence of a subset of MSC-mutated ISM patients showing only involvement of myeloid BM cells, could be explained by preferential signaling of the mutated *KIT* in HPC to the myeloid rather than the lymphoid lineages, the significantly different production and renewal rates of mature lymphocytes vs monocytes and neutrophils (longer vs shorter turnover times, respectively) or both⁵⁵⁻⁵⁸. In addition, occurrence of a sporadic *KIT* D816V mutation that constitutively activates the SCF/*KIT* signaling pathway could lend those CD117⁺ precursor cells with a proliferative and/or survival advantage. Thereby, the ability of a *KIT* D816V⁺ myeloid-committed HPC to colonize the patient's BM will be faster than that of the mutated lymphoid-committed precursors, which would not have a proliferative advantage because of the activating *KIT* D816V mutation, due to loss of CD117 expression early during commitment to the lymphoid lineage⁵⁹. In turn, the presence of the *KIT* D816V mutation in BM MSC should impair their function and potentially affect their role in supporting hematopoiesis and bone turnover. Even though we have not found any evidence of differences in bone lesions between patients with vs without mutated MSC, purified CD105⁺/CD13^{high}/CD45⁻ BM

MSC from SM patients showed slower growth *in vitro* vs MSC from healthy donors³⁹. These results are in line with recent observations by Nemeth K et al. who described the presence of abnormal MSC with slow proliferation, signs of senescence and impaired osteogenic function (vs normal MSC colonies) in SM patients.⁶⁰ Of note, these authors do not find the *KIT* D816V mutation in cultured BM MSC from any of the 5 SM patients they analyzed. The apparent discrepancy between these findings and our observations could be due to the relatively low number of patient analyzed or to a preferential growth of normal vs mutated MSC after medium to long term *in vitro* culture. In this regard, our results also showed that while the *KIT* D816V mutation was initially detected in cultured (purified) CD105⁺/CD13^{high} /CD45⁻ MSC, it became negative *in vitro* after 3 culture passages further supporting a survival/proliferative advantage *in vitro* for normal vs *KIT*-mutated MSC from ISM patients.

Overall, one might expect that the greater number of *KIT*-mutated HPC, the greatest level of BM involvement by the *KIT* mutation, which would most likely contribute to pave the way for secondary (driver) genetic lesions and more frequent disease progression. In line with this, all cases having *KIT*-mutated MSC also showed multilineage *KIT* mutation with a greater frequency of myeloid plus lymphoid (vs only myeloid) involvement of hematopoiesis. Moreover, such MSC-mutated ISM cases showed a greater frequency of progression to more advanced disease and shorter PFS rates, together with significantly greater levels of BM MC infiltration and serum baseline tryptase, and a greater frequency of organomegalies and bone lesions already at diagnosis. Of note, the rate of disease progression among multilineage cases, was also significantly higher for patients with *KIT*-mutated vs non-mutated MSC. Altogether, these results are consistent with recent observations in a mouse model with conditional expression of a constitutively active D814V mutated *KIT* which showed a greater MC

disease severity when the mutation was expressed in undifferentiated HPC vs (only) more mature cells⁶¹. In addition, our findings might also contribute to explain why ISM patients with MC-restricted *KIT* mutation in the BM have a normal life expectancy and very rarely progress to more aggressive disease⁷. Of note, here we reported a higher rate of progression of ISM patients than that observed in previous (large) series of ISM patients^{7,54,62}; this is probably due to the preferential selection of cases with multilineage involvement of hematopoiesis by the *KIT* D816V mutation vs MC-restricted *KIT* D816V mutation, since the latter cases typically showed very low rate of disease progression⁷ and/or a longer follow-up in this vs other previously reported series.

Overall, the above findings suggest that the clinical impact of constitutive activation of the SCF/*KIT* signaling pathway critically depends on the stage of development at which the somatic *KIT* D816V mutation has been acquired, and the extent of involvement of the CD34⁺HPC compartment (and therefore of the whole hematopoietic compartment). Thus, occurrence of the *KIT* mutation in an early progenitor cell during ontogeny will potentially lead to greater involvement of hematopoiesis, providing clonal cells an increased probability of acquiring secondary (driver) mutations/genetic alterations, particularly after long periods of time⁹; such genetic lesions might more frequently lead to progression and/or transformation of ISM to more severe disease and/or to the development of secondary myeloid (most frequently) and lymphoid neoplasias. Of note, acquisition and maintenance of these secondary mutations could be facilitated by the anti-apoptotic and survival pathways which are differentially activated within the pathological MC due to the *KIT* D816V mutation^{25,27}, in association with the more immature immunophenotype of BM MC from patients carrying multilineage vs MC-restricted *KIT* D816V mutation³⁷. In line with this hypothesis, it has been recently shown in a murine model of SM, as well as

among advanced SM patients⁶³, that coexistence of the *KIT* D816V mutation and loss of function of TET2 (or other mutations) in progenitor cells causes a more aggressive phenotype, typically mimicking advanced disease (i.e. ASM)⁶⁴.

In summary, the results here presented demonstrate the occurrence of the *KIT* D816V mutation in BM MSC from a substantial fraction of ISM patients that systematically showed multilineage involvement of hematopoiesis, in association with a greater risk for disease progression and shorter PFS. These findings suggest that among ISM cases, occurrence of the *KIT* D816V mutation in an earlier precursor cell is associated with a poorer outcome.

AUTHORSHIP CONTRIBUTIONS:

AC. G-M. designed the research, analyzed the data, interpreted results, made the figures and wrote the paper; M. J-A performed experiments, analyzed the data, interpreted results, made the figures and wrote the paper; I. A-T collected the samples, performed the clinical follow-up of the patients and critically reviewed the paper; C. T performed experiments and critically reviewed the paper; C. M performed MSC experiments and critically reviewed the paper; L. S-M performed experiments and critically reviewed the paper; JI. M-G performed experiments and critically reviewed the paper; A. M performed experiments and critically reviewed the paper; A. M performed the clinical follow-up of the patients and critically reviewed the paper; C. C, contributed with technical support and critically reviewed the paper; JM. M. collected the samples and critically reviewed the paper; L.E. supervised the study, performed clinical follow-up of the patients and critically reviewed the paper; A. O. designed the research, supervised the study and wrote the paper.

DISCLOSURE/CONFLICTS OF INTEREST: The authors declare no competing financial interest.

ACKNOWLEDGEMENTS:

This work was supported in part by grants from the Fondo de Investigaciones Sanitarias –FIS– (grant number PI11/02399, FEDER) and Red Temática de Investigación Cooperativa en Cancer –RTICC– (grant number RD12/0036/0048, FEDER) of the Instituto de Salud Carlos III (Ministry of Economy and Competitivity, Madrid, Spain), from Fundacion Ramon Areces (Madrid, Spain; grant number CIVP16A1806), from Fundación Samuel Solorzano (Salamanca, Spain; gran number FS/22-2014) and from Ayudas a Proyectos de Investigación en Salud de la Fundacion Mutua Madrileña 2014

Garcia-Montero AC

and Asociacion Española de Enfermos de Mastocitosis (AEDM 2014). AM was supported by RTICC. CM was supported by the Spanish Net on Aging and Frailty (RETICEF), Instituto de Salud Carlos III.

CORRESPONDENCE:

Professor Alberto Orfao. Centro de Investigación del Cáncer, Campus Miguel de Unamuno, 37007 Salamanca, Spain. Phone: +34 923 29 48 11. Fax: +34 923 29 47 95.

e-mail: orfao@usal.es

Dr Andrés C Garcia-Montero. Centro de Investigación del Cáncer, Campus Miguel de Unamuno, 37007 Salamanca, Spain. Phone: +34 923 29 45 00 Ext: 5475. Fax: +34 923 29 47 95.

e-mail: angarmon@usal.es

REFERENCES

1. Nagata H, Worobec AS, Oh CK, et al. 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. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92(23):10560-10564.
2. Orfao A, Garcia-Montero AC, Sanchez L, Escribano L. Recent advances in the understanding of mastocytosis: the role of KIT mutations. *Br J Haematol*. 2007;138(1):12-30.
3. Arock M, Sotlar K, Akin C, et al. KIT mutation analysis in mast cell neoplasms: recommendations of the European Competence Network on Mastocytosis. *Leukemia*. 2015;29(6):1223-1232.
4. Garcia-Montero AC, Jara-Acevedo M, Teodosio C, et al. KIT mutation in mast cells and other bone marrow hematopoietic cell lineages in systemic mast cell disorders: a prospective study of the Spanish Network on Mastocytosis (REMA) in a series of 113 patients. *Blood*. 2006;108(7):2366-2372.
5. Metcalfe DD, Akin C. Mastocytosis: molecular mechanisms and clinical disease heterogeneity. *Leuk Res*. 2001;25(7):577-582.
6. Pardanani A, Tefferi A. Systemic mastocytosis in adults: a review on prognosis and treatment based on 342 Mayo Clinic patients and current literature. *Curr Opin Hematol*. 2010;17(2):125-132.
7. Escribano L, Alvarez-Twose I, Sanchez-Munoz L, et al. Prognosis in adult indolent systemic mastocytosis: a long-term study of the Spanish Network on Mastocytosis in a series of 145 patients. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2009;124(3):514-521.
8. Gotlib J, Pardanani A, Akin C, et al. International Working Group-Myeloproliferative Neoplasms Research and Treatment (IWG-MRT) & European Competence Network on Mastocytosis (ECNM) consensus response criteria in advanced systemic mastocytosis. *Blood*. 2013;121(13):2393-2401.
9. Schwaab J, Schnittger S, Sotlar K, et al. Comprehensive mutational profiling in advanced systemic mastocytosis. *Blood*. 2013;122(14):2460-2466.
10. Bibi S, Arslanhan MD, Langenfeld F, et al. Co-operating STAT5 and AKT signaling pathways in chronic myeloid leukemia and mastocytosis: possible new targets of therapy. *Haematologica*. 2014;99(3):417-429.
11. Wilson TM, Maric I, Simakova O, et al. Clonal analysis of NRAS activating mutations in KIT-D816V systemic mastocytosis. *Haematologica*. 2011;96(3):459-463.
12. Yavuz AS, Lipsky PE, Yavuz S, Metcalfe DD, Akin C. Evidence for the involvement of a hematopoietic progenitor cell in systemic mastocytosis from single-cell analysis of mutations in the c-kit gene. *Blood*. 2002;100(2):661-665.
13. Pardanani A, Reeder T, Li CY, Tefferi A. Eosinophils are derived from the neoplastic clone in patients with systemic mastocytosis and eosinophilia. *Leuk Res*. 2003;27(10):883-885.
14. Afonja O, Amorosi E, Ashman L, Takeshita K. Multilineage involvement and erythropoietin-"independent" erythroid progenitor cells in a patient with systemic mastocytosis. *Ann Hematol*. 1998;77(4):183-186.
15. Akin C, Kirshenbaum AS, Semere T, Worobec AS, Scott LM, Metcalfe DD. Analysis of the surface expression of c-kit and occurrence of the c-kit Asp816Val activating mutation in T cells, B cells, and myelomonocytic cells in patients with mastocytosis. *Exp Hematol*. 2000;28(2):140-147.

16. Taylor ML, Sehgal D, Raffeld M, et al. Demonstration that mast cells, T cells, and B cells bearing the activating kit mutation D816V occur in clusters within the marrow of patients with mastocytosis. *J Mol Diagn.* 2004;6(4):335-342.
17. Elias HK, Schinke C, Bhattacharyya S, Will B, Verma A, Steidl U. Stem cell origin of myelodysplastic syndromes. *Oncogene.* 2014;33(44):5139-5150.
18. Nilsson L, Eden P, Olsson E, et al. The molecular signature of MDS stem cells supports a stem-cell origin of 5q myelodysplastic syndromes. *Blood.* 2007;110(8):3005-3014.
19. Tsukamoto N, Morita K, Maehara T, et al. Clonality in myelodysplastic syndromes: demonstration of pluripotent stem cell origin using X-linked restriction fragment length polymorphisms. *Br J Haematol.* 1993;83(4):589-594.
20. Edwards RH, Wasik MA, Finan J, et al. Evidence for early hematopoietic progenitor cell involvement in acute promyelocytic leukemia. *Am J Clin Pathol.* 1999;112(6):819-827.
21. Haase D, Feuring-Buske M, Konemann S, et al. Evidence for malignant transformation in acute myeloid leukemia at the level of early hematopoietic stem cells by cytogenetic analysis of CD34+ subpopulations. *Blood.* 1995;86(8):2906-2912.
22. Valent P, Horny HP, Escribano L, et al. Diagnostic criteria and classification of mastocytosis: a consensus proposal. *Leuk Res.* 2001;25(7):603-625.
23. Sotlar K, Colak S, Bache A, et al. Variable presence of KITD816V in clonal haematological non-mast cell lineage diseases associated with systemic mastocytosis (SM-AHNMD). *J Pathol.* 2010;220(5):586-595.
24. Jawhar M, Schwaab J, Schnittger S, et al. Molecular profiling of myeloid progenitor cells in multi-mutated advanced systemic mastocytosis identifies KIT D816V as a distinct and late event. *Leukemia.* 2015;29(5):1115-1122.
25. Teodosio C, Garcia-Montero AC, Jara-Acevedo M, et al. Gene expression profile of highly purified bone marrow mast cells in systemic mastocytosis. *J Allergy Clin Immunol.* 2013;131(4):1213-1224, 1224 e1211-1214.
26. Hartmann K, Artuc M, Baldus SE, et al. Expression of Bcl-2 and Bcl-xL in cutaneous and bone marrow lesions of mastocytosis. *Am J Pathol.* 2003;163(3):819-826.
27. Baldus SE, Zirbes TK, Thiele J, Eming SA, Henz BM, Hartmann K. Altered apoptosis and cell cycling of mast cells in bone marrow lesions of patients with systemic mastocytosis. *Haematologica.* 2004;89(12):1525-1527.
28. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science.* 1999;284(5411):143-147.
29. Ratajczak MZ. A novel view of the adult bone marrow stem cell hierarchy and stem cell trafficking. *Leukemia.* 2015;29(4):776-782.
30. Slukvin, II, Vodyanik M. Endothelial origin of mesenchymal stem cells. *Cell Cycle.* 2011;10(9):1370-1373.
31. Chandia M, Sayagues JM, Gutierrez ML, et al. Involvement of primary mesenchymal precursors and hematopoietic bone marrow cells from chronic myeloid leukemia patients by BCR-ABL1 fusion gene. *Am J Hematol.* 2014;89(3):288-294.
32. Fang B, Zheng C, Liao L, et al. Identification of human chronic myelogenous leukemia progenitor cells with hemangioblastic characteristics. *Blood.* 2005;105(7):2733-2740.
33. Kastrinaki MC, Pontikoglou C, Klaus M, Stavroulaki E, Pavlaki K, Papadaki HA. Biologic characteristics of bone marrow mesenchymal stem cells in myelodysplastic syndromes. *Curr Stem Cell Res Ther.* 2011;6(2):122-130.
34. Campioni D, Voltan R, Tisato V, Zauli G. Heterogeneity of mesenchymal stromal cells in lymphoproliferative disorders. *Front Biosci (Landmark Ed).* 2014;19:139-151.
35. Horny HP, Metcalfe, D.D, Bennet J.M, Bain B.J, Akin C, Escribano L Mastocytosis. In: Swerdlow SH, Campo, E, Harris N.L, Jaffe E.S, Pileri S.A, Stein H, Thiele J, Vardiman J.W, ed. *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues.* Lyon: IARC; 2008:54-63.

36. Valent P, Escribano L, Broesby-Olsen S, et al. Proposed diagnostic algorithm for patients with suspected mastocytosis: a proposal of the European Competence Network on Mastocytosis. *Allergy*. 2014;69(10):1267-1274.
37. Teodosio C, Garcia-Montero AC, Jara-Acevedo M, et al. An immature immunophenotype of bone marrow mast cells predicts for multilineage D816V KIT mutation in systemic mastocytosis. *Leukemia*. 2012;26(5):951-958.
38. Sanchez M, Arroyo-Pardo E. Comparison of populations as a function of confidence intervals of gene probability. *Hum Biol*. 2002;74(5):707-723.
39. Muniz C, Teodosio C, Mayado A, et al. Ex vivo identification and characterization of a population of CD13(high) CD105(+) CD45(-) mesenchymal stem cells in human bone marrow. *Stem Cell Res Ther*. 2015;6(1):169.
40. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8(4):315-317.
41. Jones EA, Kinsey SE, English A, et al. Isolation and characterization of bone marrow multipotential mesenchymal progenitor cells. *Arthritis Rheum*. 2002;46(12):3349-3360.
42. Kristensen T, Vestergaard H, Moller MB. Improved detection of the KIT D816V mutation in patients with systemic mastocytosis using a quantitative and highly sensitive real-time qPCR assay. *J Mol Diagn*. 2011;13(2):180-188.
43. Kopp P, Jaggi R, Tobler A, et al. Clonal X-inactivation analysis of human tumours using the human androgen receptor gene (HUMARA) polymorphism: a non-radioactive and semiquantitative strategy applicable to fresh and archival tissue. *Mol Cell Probes*. 1997;11(3):217-228.
44. Longley BJ, Tyrrell L, Lu SZ, et al. Somatic c-KIT activating mutation in urticaria pigmentosa and aggressive mastocytosis: establishment of clonality in a human mast cell neoplasm. *Nat Genet*. 1996;12(3):312-314.
45. Jara-Acevedo M, Teodosio C, Sanchez-Munoz L, et al. Detection of the KIT D816V mutation in peripheral blood of systemic mastocytosis: diagnostic implications. *Mod Pathol*. 2015;28(8):1138-1149.
46. Akin C. Clonality and molecular pathogenesis of mastocytosis. *Acta Haematol*. 2005;114(1):61-69.
47. Tefferi A, Lasho TL, Brockman SR, Elliott MA, Dispenzieri A, Pardanani A. FIP1L1-PDGFR α and c-kit D816V mutation-based clonality studies in systemic mast cell disease associated with eosinophilia. *Haematologica*. 2004;89(7):871-873.
48. Kocabas CN, Yavuz AS, Lipsky PE, Metcalfe DD, Akin C. Analysis of the lineage relationship between mast cells and basophils using the c-kit D816V mutation as a biologic signature. *J Allergy Clin Immunol*. 2005;115(6):1155-1161.
49. Chen GL, Prchal JT. X-linked clonality testing: interpretation and limitations. *Blood*. 2007;110(5):1411-1419.
50. Prchal JT, Prchal JF, Belickova M, et al. Clonal stability of blood cell lineages indicated by X-chromosomal transcriptional polymorphism. *J Exp Med*. 1996;183(2):561-567.
51. Ohhata T, Wutz A. Reactivation of the inactive X chromosome in development and reprogramming. *Cell Mol Life Sci*. 2013;70(14):2443-2461.
52. Brown CJW, H.F. Molecular and genetic studies of human X chromosome inactivation. *Advances in Developmental Biology*. 1993;2:37-76.
53. Broesby-Olsen S, Kristensen TK, Moller MB, Bindslev-Jensen C, Vestergaard H. Adult-onset systemic mastocytosis in monozygotic twins with KIT D816V and JAK2 V617F mutations. *J Allergy Clin Immunol*. 2012;130(3):806-808.
54. Lim KH, Tefferi A, Lasho TL, et al. Systemic mastocytosis in 342 consecutive adults: survival studies and prognostic factors. *Blood*. 2009;113(23):5727-5736.
55. Whitelaw DM. Observations on human monocyte kinetics after pulse labeling. *Cell Tissue Kinet*. 1972;5(4):311-317.

56. Koeffler HP, Gale RP, Golde DW. Myeloid colony-forming cell kinetics in man. *Exp Hematol*. 1980;8(3):271-277.
57. Alexanian R, Donohue DM. Neutrophilic granulocyte kinetics in normal man. *J Appl Physiol*. 1965;20(4):803-808.
58. Perry S, Craddock CG, Jr., Paul G, Lawrence JS. Lymphocyte production and turnover. *AMA Arch Intern Med*. 1959;103(2):224-230.
59. Matarraz S, Lopez A, Barrena S, et al. The immunophenotype of different immature, myeloid and B-cell lineage-committed CD34+ hematopoietic cells allows discrimination between normal/reactive and myelodysplastic syndrome precursors. *Leukemia*. 2008;22(6):1175-1183.
60. Nemeth K, Wilson TM, Ren JJ, et al. Impaired function of bone marrow stromal cells in systemic mastocytosis. *Stem Cell Res*. 2015;15(1):42-53.
61. Gerbault A, Wickenhauser C, Scholten J, et al. Mast cell hyperplasia, B-cell malignancy, and intestinal inflammation in mice with conditional expression of a constitutively active kit. *Blood*. 2011;117(6):2012-2021.
62. Hoermann G, Gleixner KV, Dinu GE, et al. The KIT D816V allele burden predicts survival in patients with mastocytosis and correlates with the WHO type of the disease. *Allergy*. 2014;69(6):810-813.
63. Soucie E, Hanssens K, Mercher T, et al. In aggressive forms of mastocytosis, TET2 loss cooperates with c-KITD816V to transform mast cells. *Blood*. 2012;120(24):4846-4849.
64. De Vita S, Schneider RK, Garcia M, et al. Loss of function of TET2 cooperates with constitutively active KIT in murine and human models of mastocytosis. *PLoS One*. 2014;9(5):e96209.

Table 1: Immunophenotypic markers used for the identification and characterization of bone marrow mesenchymal stem cells and other bone marrow cell populations.

MARKER	FLUOROCHROME	CLONE	SOURCE
CD3	PB	UCHT1	BD Bioscience ¹
CD10	APC-H7	HI10A	BD Bioscience ¹
CD11b	FITC	Bear1	BeckmanCoulter ⁶
CD13	APC / PE	WM15 / L138	BD Bioscience ¹
CD14	APC-H7	MIIP9	BD Bioscience ¹
CD19	APC-H7	SJ25C1	BD Bioscience ¹
CD34	PerCPCy5.5 / APC	8G12	BD Bioscience ¹
CD44	PerCP-Cy5.5	IM7	eBioscience ²
CD45	PO / OC515	HI30 / GA90	Invitrogen ⁴ / Cytognos ³
CD73	PE	AD2	BD Bioscience ¹
CD90	PE	5E10	BD Bioscience ¹
CD105	FITC / PE	166707 / 1G2	R&D Systems ⁵ / BeckmanCoulter ⁶
CD117	PECy7	104D2D1	BeckmanCoulter ⁶
CD140b	PE	28D4	BD Bioscience ¹
CD146	PE	P1H12	BD Bioscience ¹
CD271	PE Cy7	ME20.4	Biolegend ⁷
HLA-DR	PB	L243	Biolegend ⁷
MSCA-1	PE	W8B2	Miltenyi Biotec ⁸
SSEA-4	PE	MC-813-70	Biolegend ⁷
STRO-1	FITC	STRO-1	Biolegend ⁷

APC, allophycocyanin; Cy7, cyanin7; FITC, fluorescein isothiocyanate; H7, Hilite7; OC515, Orange Cytognos 515; PB, pacific blue; PO, pacific orange; PE, phycoerythrin; PE Cy7, phycoerythrin cyanine 7; PerCPCy5.5, peridinin chlorophyll protein–cyanin5.5. ¹BD Biosciences, San Diego, CA, USA; ²eBioscience, San Diego, CA, USA; ³Cytognos SL, Salamanca, Spain; ⁴Invitrogen, Carlsbad, CA, USA; ⁵R&D Systems, Minneapolis, MN, USA; ⁶Beckman Coulter, Brea, CA, USA; ⁷Biolegend, San Diego, CA, USA. ⁸Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Germany)

Table 2.- ISM (n=83): disease features at diagnosis according to the presence vs absence of the *KIT* D816V mutation in bone marrow mesenchymal stem cells.

DISEASE FEATURES	<i>KIT</i> D816V+ Mesenchymal stem cells	<i>KIT</i> D816V-negative Mesenchymal stem cells			
	(n=22)	All cases (n=61)	P-value	Cases with multilineage <i>KIT</i> mutation (n=18)	P-value
Gender (M/F)	45%/55%	44%/56%	NS	40%/60%	NS
Age at onset (years) ⁺	34 (0-76)	37 (9-63)	NS	34 (9-63)	NS
Follow-up (years) ⁺	15.2 (2.4-45)	7.4 (3.6-37)	NS	15.5 (5.5-37)	NS
% of BM MC ⁺	0.49% (0.03%-4.3%)	0.08% (0.004%-0.4%)	.008	0.16% (0.01%-0.4%)	NS
Serum tryptase(ng/mL) ⁺	170 (12.1-404)	31.1 (8.6-182)	.001	55.5 (8.6-136)	NS
Bone lesions*	39%	8%	.002	22%	NS
Cytopenias	0%	2%	NS	6%	NS
Organomegalies [#]	39%	7%	.006	19%	NS
% of Multilineage <i>KIT</i> D816V+ mutation	100%	30%	.0001	100%	NS
% Myeloid plus lymphoid multilineage <i>KIT</i> D816V+ mutation	59%	7%	.0001	22%	.03
MC with a clonal X-chromosome inactivation pattern ^a	36%	100%	.0005	100%	.01
Disease progression	50%	5%	.0001	17%	.04

Results expressed as percentage of cases or as ⁺median (range). *Bone lesions include osteoporosis and/or diffuse bone sclerosis due to SM. [#]Organomegaly includes palpable hepatomegaly and/or splenomegaly without organ failure. ^aPercentage of female cases with clonal MC as assessed by the human androgen receptor (HUMARA) X chromosome inactivation test. BM MC, bone marrow mast cells. NS, statistically not-significantly different.

Table 3.- Relevant clinical and biological features at progression of ISM patients that progressed to more advanced disease.

	Patient ID.													
	#1	#7	#8	#10	#15	#22	#30	#34	#38	#41	#47	#102	#104	#108
Age at onset/ at progression (years)	35/60	76/78	24/64	0/31	63/76	73/76	33/61	25/37	64/69	30/64	28/46	50/51	48/49	31/62
Sex	M	M	F	M	M	F	F	F	M	M	M	M	F	M
Disease subtype at progression	SM- AHNIMD (NHL)	SM- AHNIMD (MPN)	ASM	ASM	SSM	ASM	SSM	SSM	ASM	ASM	SSM	ASM	ASM	ASM
Organomegalies	Yes*	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes*	Yes*	Yes	No	Yes*	Yes*
Cytopenias	No	No	No	Yes	No	Yes	No	No	Yes	No	No	Yes	Yes	Yes
Bone lesions	O+F	O	O+F	O, DBS	No	DBS	DBS	DBS	O	No	DBS	O	DBS	DBS
Serum tryptase (ng/mL)	182	144	239	430	170	357	173	329	52.6	151	310	238	312	2036
% of BM MC	0.4	0.6	9	11	3.2	18	0.06	0.35	0.13	0.5	3.1	0.47	3.7	4.8
% of <i>KIT</i> D816V ⁺ MSC	100%	100%	17%	49%	11%	21%	-	9%	-	-	31%	10%	24%	41%
<i>KIT</i> D816V ⁺ BM hematopoietic cell compartments	MC+ M+L	MC+ M+L	MC+ M+L	MC+ M+L	MC+ M+L	MC+M	MC+M	MC+M	MC+M	MC+M	MC+M	MC+M	MC+ M+L	MC+M

ASM, aggressive systemic mastocytosis; BM MC, bone marrow mast cells; DBS, diffuse bone sclerosis; MC+M, MC plus other myeloid lineage cells; MC+M+L, MC plus other myeloid and lymphoid lineage cells; MPN, myeloproliferative neoplasm; NHL, non-Hodgkin lymphoma; O, osteoporosis; O+F, small size osteolysis and/or osteoporosis with pathologic fractures; SM-AHNIMD, systemic mastocytosis associated with a clonal hematological non-mast cell lineage disease; SSM, smoldering systemic mastocytosis. *with organ failure.

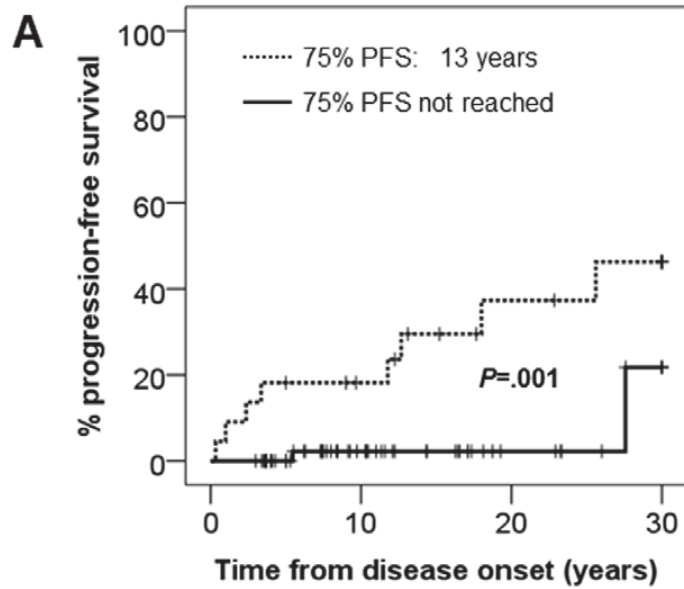
Table 4.- ISM (n=83): cumulative probability of disease progression from disease onset according to the presence vs absence of the D816V *KIT* mutation in bone marrow mesenchymal stem cells.

Progression free survival rate	<i>KIT</i> D816V-positive mesenchymal stem cells	<i>KIT</i> D816V-negative mesenchymal stem cells			
	(n=22)	All cases	<i>P</i> -value	Cases with	<i>P</i> -value
		(n=61)		multilineage <i>KIT</i> mutation	
		(n=18)			
10-year PFS	82% ± 8%	98% ± 2%	.003	94% ± 5%	.19
20-year PFS	63% ± 12%	98% ± 2%	<.001	94% ± 5%	.07
30-year PFS	54% ± 13%	78% ± 18%	.001	63% ± 26%	.08

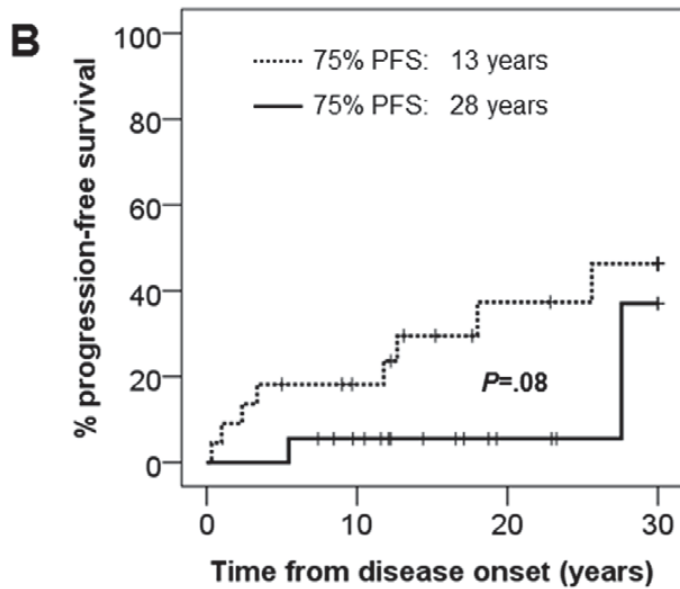
Results expressed as percentage of cases ± one standard deviation. PFS: progression free survival.

FIGURE LEGENDS

Figure 1.- Progression-free survival (PFS) of ISM patients classified according to the presence (dotted line) vs absence (full line) of the D816V *KIT* mutation in bone marrow mesenchymal stem cells (MSC). Panel **A** shows PFS from disease onset for all (n=83) patients analyzed, while in panel **B**, analysis of PFS is restricted to patients (n=40) with multilineage involvement of hematopoiesis by the *KIT* D816V mutation with (n=22) or without (n=18) D816V *KIT* mutated MSC.



N. of MSC ⁺ cases	22	15	8	6
N. of MSC ⁻ cases	61	29	9	3



N. of MSC ⁺ cases	22	15	8	6
N. of MSC ⁻ cases	18	14	5	2

Figure 1.-

FIGURE LEGENDS

Figure S1.- Immunophenotypic features of bone marrow mesenchymal stem cells (MSC) identified as $CD105^+/CD13^{high}/CD45^-$ cells. Panels **A-D** depict the gating strategy used for the identification of MSC vs mast cells (MC) (Panel **D**). Panels **E-T** show the immunophenotypic features of MSC from a representative SM patient. Baseline autofluorescence and expression levels for each protein are indicated in the histogram plot in *gray* and *black*, respectively, using the overlay histogram function of the Infinicyt software (Cytognos SL, Salamanca, Spain). Panel **U** shows the pattern of expression of MSC-associated markers in purified BM $CD105^+/CD13^{high}/CD45^-$ MSC from 7 SM patients. Normalized median fluorescence intensity values are displayed after subtracting the background autofluorescence levels observed for each individual marker-associated fluorochrome channel. Open circles represent individual samples, short horizontal and vertical lines display median values and 95% CI of the levels of antigen expression (MFI values), respectively. *SSC*, sideward light scatter; *MFI*, median fluorescence intensity (arbitrary units scaled from 0 to 262 000).

Figure S2.- Functional features of bone marrow mesenchymal stem cells identified as $CD105^+/CD13^{high}/CD45^-$ cells. Panels **A-F** display the functional features of cultured FACS-sorted $CD105^+/CD13^{high}/CD45^-$ BM MSC which have been induced to differentiate *in vitro* towards the adipose tissue (panels **A-B**) as assessed by the Oil red O staining (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), and the bone tissue as assessed by the alkaline phosphatase (Panels **C-D**) and the alizarin red S (Sigma-Aldrich) (Panels **E-F**) stainings. For each staining technique, undifferentiated control FACS-sorted BM MSC counterstained with hematoxylin are also displayed (Panels **A**, **C** and **E**). Images were acquired in an Eclipse Ti-s inverted microscope (Nikon, Tokyo, Japan) equipped with a ProgRes® C3 camera (Jenoptik Optical Systems, Jena, Germany). Magnification x200 (Panels **A** and **B**), x100 (Panels **C-D**) and x40 (Panels **E-F**).

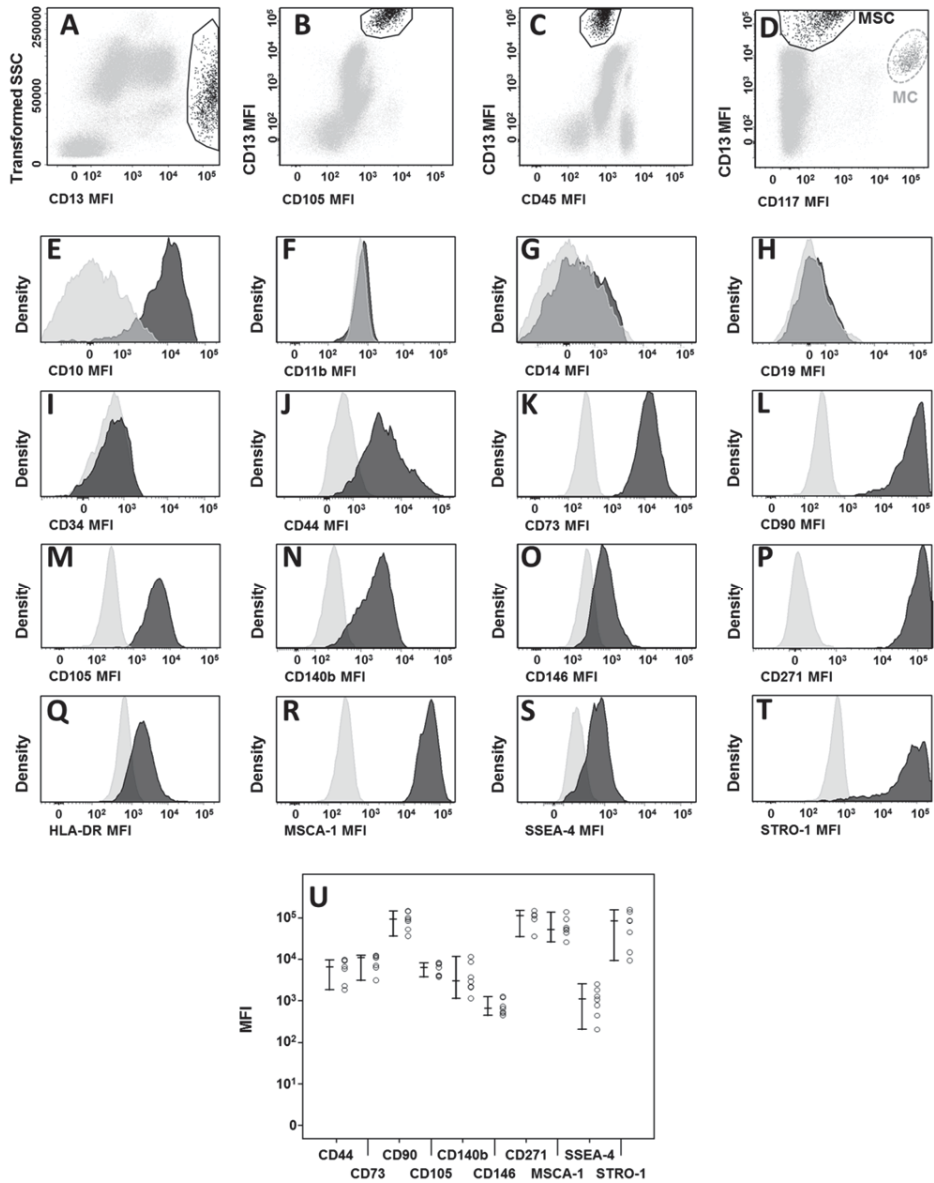


Figure S1.-

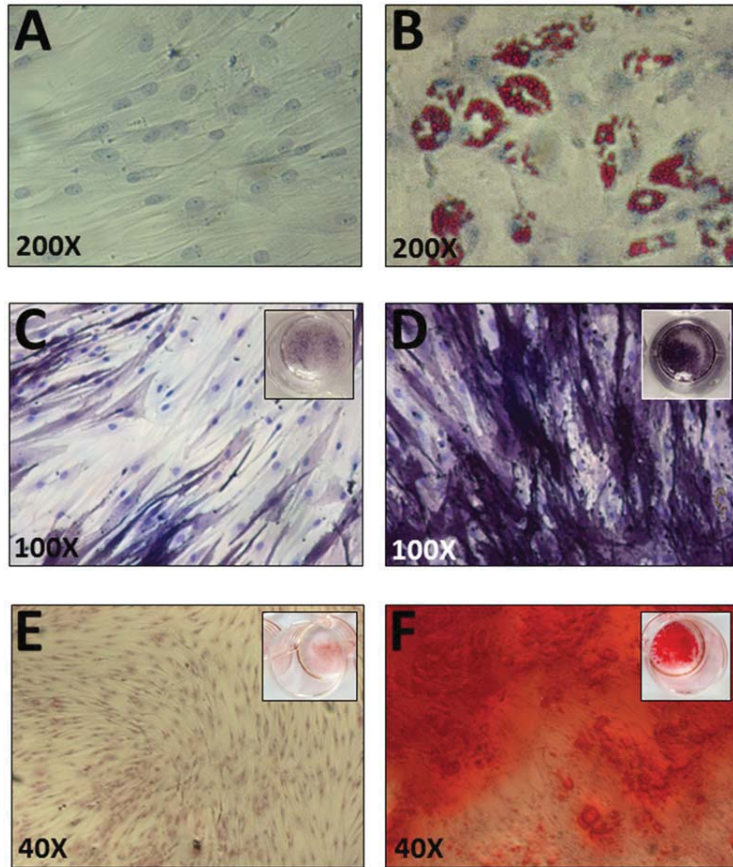


Figure S2.-

DISCUSIÓN



Tras la identificación inicial de la presencia de la mutación D816V de *KIT* en una línea celular humana derivada de una leucemia de mastocitos¹²⁸, y la posterior comprobación de la presencia de dicha mutación en una proporción importante de pacientes con MS^{136,142,159}, esta mutación ha pasado a considerarse como un marcador genético de la enfermedad¹⁷. La reciente demostración de la posibilidad de identificar la presencia de la mutación D816V de *KIT* en SP²⁴⁵, en ausencia de mastocitos circulantes, ha permitido además incluir esta determinación en los algoritmos diagnósticos de la MS²⁰⁴ de forma previa al estudio de MO. Aun así, en el momento de iniciar este trabajo seguía sin definirse con precisión la frecuencia exacta con la que esta mutación está presente en pacientes con mastocitosis tanto a nivel de MO como de SP, así como la posible asociación entre la presencia de la mutación D816V de *KIT* en SP con el grado de afectación de la MO por la misma. Por otra parte, a pesar del efecto que esta mutación activante de *KIT* tiene sobre la proliferación y supervivencia de las células afectadas que expresan *KIT* (*i.e.* mastocitos), su presencia no justifica por sí sola la importante heterogeneidad clínica, biológica y evolutiva²⁴⁶ de la enfermedad, que oscila desde el comportamiento indolente de las formas más benignas¹⁸⁴ al comportamiento agresivo asociado a una supervivencia significativamente acortada en las formas más agresivas de la enfermedad (MSA y MCL)²⁴⁷.

Recientemente se ha demostrado que tanto en las MS que muestran un comportamiento clínico más agresivo (MSA y MCL)^{145,178,242,244,253-255} como en casi un tercio de las MSI²⁶⁹, la mutación D816V de *KIT* está presente en una o varias líneas celulares hematopoyéticas, además de en la línea mastocitaria; esta circunstancia (afectación multilineal de la hematopoyesis por la mutación D816V de *KIT*) se ha asociado con un riesgo incrementado de progresión de MSI a formas más agresivas de la enfermedad¹⁸⁴. Además, estos hallazgos sugieren la posible afectación por la mutación D816V de *KIT*, en este subgrupo de pacientes con MSI, de un número importante de CPH^{181,248,249}, lo cual podría reflejar a su vez la afectación de un precursor ancestral más inmaduro. Más aún, la existencia del trasfondo genético de la mutación de *KIT* en múltiples células “stem” hematopoyéticas facilitaría la acumulación de alteraciones genéticas adicionales

que podrían contribuir a conferir un mayor riesgo de progresión y transformación maligna de la enfermedad.

La implicación de las CPH CD34⁺ de MO en las primeras fases de la ontogenia tumoral constituye un hecho contrastado en varias hemopatías, como las NMP, los SMD²⁵⁰⁻²⁵² y las LMA^{253,254}. El hallazgo de la presencia de mutaciones de *KIT* en pacientes con MS-AHNMD, tanto en el componente de MS como de AHNMD^{215,255}, junto con los estudios realizados por Akin *et al.*¹⁸¹ sobre poblaciones purificadas de células CD34⁺ de MO de pacientes con MS, apoyan además del origen común de ambas hemopatías en un subgrupo importante de pacientes con MS-AHNMD, el origen de la MS en una célula “stem” hematopoyética.

A pesar de los hallazgos descritos anteriormente, en la actualidad sigue sin conocerse si el origen de la mutación D816V de *KIT* se sitúa a nivel de células CD34⁺ de MO, o si podría llegar incluso a afectar a una célula precursora de la célula “stem” hematopoyética. Este aspecto resulta de especial interés en el conocimiento de la patogénesis de la MS puesto que cuanto más temprana sea la aparición de la mutación D816V de *KIT* en la ontogenia, mayor sería el grado de afectación de la hematopoyesis por dicha mutación y, teóricamente también, mayor el riesgo de acumular alteraciones genéticas adicionales que pudiesen favorecer y explicar la progresión desde formas indolentes de MS a formas más agresivas de la enfermedad.

Frecuencia de la mutación D816V de *KIT* en los mastocitos y otras líneas celulares hematopoyéticas de MO en distintos subtipos diagnósticos de MS.

Actualmente son muchos los estudios en los que se ha analizado la presencia de la mutación D816V de *KIT* en adultos con MS. No obstante, en la mayoría de ellos se centran en las formas más agresivas de la enfermedad^{136,159,248,249,256-258} y habitualmente están basados en el análisis de casos individuales^{152,259,260} o en series relativamente cortas de pacientes. Todo ello, asociado al empleo de distintos métodos de detección de la mutación con diferente sensibilidad, hace que existan importantes discrepancias en la

literatura^{136,159,191,248,249,256-258,261} en relación con la frecuencia de aparición de la mutación D816V de *KIT* en pacientes con mastocitosis. Así, mientras los métodos de secuenciación convencional apenas detectan la mutación en un 14%²⁵⁸ de los pacientes analizados, el uso de métodos más sensibles incrementa el porcentaje de casos positivos hasta el 100%¹⁵⁹ de los pacientes. Estas diferencias pueden explicarse tanto por el empleo de métodos con diferentes sensibilidades como por el grado variable de infiltración de la MO por mastocitos existente en los distintos subtipos diagnósticos de MS (más elevado en las formas agresivas de la enfermedad respecto a las mastocitosis indolentes)^{159,261,262}. Con el fin de zanjar la controversia existente hace unos años en relación con la incidencia real de las mutaciones de *KIT* en pacientes con MS, el primer objetivo de este trabajo se centró en el análisis de la frecuencia de las mutaciones del exón 17 de *KIT* sobre una serie amplia de pacientes recogidos de forma prospectiva y que incluían una representación de los distintos subgrupos diagnósticos de la enfermedad. Además, en este apartado del trabajo empleamos una aproximación metodológica que combinaba la purificación de los mastocitos de MO mediante citometría de flujo con la detección de la mutación mediante técnicas de PCR altamente específicas¹⁹¹; con esta metodología obtuvimos una sensibilidad suficientemente elevada como para identificar la mutación, incluso en aquellos pacientes que presentaban una baja carga de mastocitos patológicos en MO. El método empleado permitía también identificar en ADN genómico mutaciones de *KIT* diferentes de la mutación D816V, siempre que éstas afectaran a los codones 814 a 819 de *KIT*.

Nuestros resultados muestran por primera vez que la práctica totalidad (>90%) de los pacientes con MS presentan la mutación D816V de *KIT*, independientemente del subtipo diagnóstico de mastocitosis. Sólo existía un subgrupo de MS en el que la frecuencia observada de esta mutación fue relativamente baja (14%), la MSBD. Estos resultados confirmarían la hipótesis de que los rasgos fenotípicos aberrantes característicos del mastocito de MO de pacientes con MS (p. ej. la expresión de CD25 y/o CD2) podrían estar asociados a la lesión genética subyacente (p. ej. la mutación D816V de *KIT*), puesto que los mastocitos de la MSBD habitualmente carecen de esta mutación además de la

expresión de CD25 y CD2, a diferencia de lo que sucede en los demás subtipos diagnósticos de mastocitosis analizados¹⁹⁷. Por otra parte, estos hallazgos apuntan a que el uso de Imatinib como inhibidor de la actividad TK de *KIT* estaría en principio contraindicado con fines terapéuticos en la gran mayoría de los pacientes con MS, al haberse demostrado una eficacia limitada de este fármaco (tanto “*in vitro*” como “*in vivo*”) en pacientes con MS y la mutación D816V de *KIT*^{139,227,229}; por el contrario, podría convertirse en tratamiento de elección para pacientes con MSBD asociada a mutaciones de *KIT* localizadas en regiones genómicas diferentes del exón 17.

Precisamente, otro hallazgo interesante de nuestro trabajo está relacionado con la identificación de mutaciones de *KIT* distintas de la mutación D816V, localizadas también en el “loop” de activación de *KIT*. Aunque su incidencia fue inferior al 5% de los casos, confirmando observaciones de otros autores^{191,263}, algunas de las mutaciones encontradas constituían la primera descripción de las mismas. En relación con este aspecto, la mutación D816Y ya había sido descrita previamente en pacientes con MS^{136,191} y LMA¹⁶¹, mientras que las otras dos mutaciones encontradas (la insVI815-816 y la mutación I817V) no se habían descrito en la literatura con anterioridad. De ellas, la mutación I817V, se identificó en un paciente con MSBD, lo cual, unido a la descripción de otros casos con este subtipo de MS y otras mutaciones de *KIT*, como por ejemplo la mutación F522C¹⁵² y la mutación K509I¹⁴⁹, sugiere que este subgrupo de pacientes con MSBD es genéticamente heterogéneo y claramente distinto de los demás subtipos diagnósticos de la enfermedad.

La capacidad para investigar de forma sistemática la posibilidad de que la mutación D816V de *KIT* estuviese presente además de en los mastocitos de MO, en distintas líneas celulares hematopoyéticas mieloides y linfoides, y en las CPH CD34⁺, tras su purificación mediante citometría de flujo, nos ha permitido confirmar que con relativa frecuencia (>20% de los pacientes con MSI y la mayoría de las MSA, SM-AHNMD y MCL) la mutación está presente en células de otras líneas celulares mieloides (o mieloides y linfoides) diferentes del mastocito y en las CPH CD34⁺ de MO. En conjunto, estos resultados confirman y amplían observaciones previas de otros autores que describieron la afectación de varias

líneas hematopoyéticas por la mutación D816V de *KIT*^{29,181,248,249,258,264}, estableciendo de forma más precisa la frecuencia con la que se ven involucrados diferentes compartimentos madurativos de células hematopoyéticas de MO en los distintos subgrupos diagnósticos de MS. Así, de los compartimentos celulares de MO distintos del mastocito, las CPH CD34⁺ fueron aquellas que con mayor frecuencia (más de un tercio de los casos) mostraban compromiso mutacional, seguidos en frecuencia por los granulocitos eosinófilos (~30%), las células monocíticas y de la serie de granulocito neutrófilo (~20% de los casos) y finalmente, la línea eritroide y los linfocitos T. Merece destacar que en la mayoría de los pacientes que presentaban la mutación D816V de *KIT* en precursores CD34⁺ de MO, ésta se acompañaba de la afectación simultánea de otras líneas hematopoyéticas. Asimismo, cabe señalar que la presencia de la mutación D816V de *KIT* en los granulocitos eosinófilos de MO, no solo se identificó en aquellos pacientes que presentaban eosinofilia²⁶⁴, sino que también estaba presente en pacientes con un número normal de eosinófilos, lo cual indicaría que esta mutación por sí sola no sería la responsable del incremento del número de eosinófilos entre los pacientes con MSI asociada a eosinofilia. Por otra parte, la mayor frecuencia de afectación por la mutación de los granulocitos eosinófilos respecto a las demás líneas celulares hematopoyéticas derivadas de la CPH CD34⁺, podría reflejar un origen más próximo entre el mastocito y el eosinófilo durante la diferenciación hematopoyética, o una expresión más prolongada de CD117 en esta línea celular, yendo en contra del origen común para mastocito y monocito, sugerido por algunos autores²¹.

Según el subtipo diagnóstico de MS, cabe señalar que la mayoría de los pacientes que presentaban MCL o MSA mostraron mutación D816V de *KIT* en la casi totalidad de las distintas poblaciones de células mieloides de MO analizadas, así como en los linfocitos T. Por el contrario, entre los pacientes con MSIs⁺ la incidencia de afectación multilineal era claramente inferior, no llegando a detectarse en ninguno de los pacientes con MSIs⁻ o con MSBD portadores de la mutación D816V de *KIT*. En cuanto a las MS-AHNMD, encontramos diferencias en función del subtipo de MS de base (MSI vs. MSA), tanto en el número de líneas celulares hematopoyéticas afectadas por la mutación D816V de *KIT*, como en

relación a la coexistencia de la mutación de *KIT* en las células tumorales de la otra hemopatía (AHNMD). Así, por regla general, las MSA-AHNMD presentaban la mutación D816V de *KIT* simultáneamente en los mastocitos y las células tumorales de la otra hemopatía; en cambio, en la mayoría de las MSI-AHNMD la mutación D816V de *KIT* solo se detectó en los mastocitos. Estos resultados sugieren que en pacientes con MSI-AHNMD podrían coexistir dos clones celulares independientes, relacionados con dos trastornos hematológicos distintos, si bien no podemos descartar que ambas neoplasias compartan un fondo genético común que haya facilitado el desarrollo y la aparición de las alteraciones genéticas características de la MS (mutación D816V de *KIT*) y de la hemopatía asociada a ésta. En conjunto, estos hallazgos sugieren que en las formas más agresivas de mastocitosis y en algunas MSI, la presencia de la mutación D816V de *KIT* en la CPH CD34⁺ podría estar asociada a una ventaja competitiva que facilitaría la expansión de diferentes poblaciones celulares hematopoyéticas portadoras de la mutación de *KIT*. Alternativamente, podría reflejar también una mayor masa tumoral, reflejada en un mayor número de CPH CD34⁺ portadores de la mutación de *KIT*, lo cual incrementaría la probabilidad de aparición, sobre estas células, de lesiones genéticas adicionales, incluidas lesiones características de la MSA y de la AHNMD.

Identificación de la mutación D816V de *KIT* en SP de pacientes con MS: correlación con la presencia de afectación multilineal de la hematopoyesis en MO.

Como consecuencia de los resultados obtenidos en el capítulo anterior quedó demostrado que la gran mayoría de los pacientes con MS presentan la mutación D816V de *KIT* en los mastocitos patológicos de MO y que además, esta mutación puede afectar también a otras líneas celulares hematopoyéticas. A su vez, la presencia de la mutación en otras líneas celulares de MO distintas del mastocito se observaba de forma preferente en los subtipos diagnósticos de MS que habitualmente muestran un comportamiento clínico más agresivo, aunque se

detectaba también en aproximadamente un tercio de las MSI, en las que se ha demostrado se asociaría a peor pronóstico^{184,261,265}.

Esto, unido a la posibilidad de que la mutación D816V de *KIT* sea también detectable en la SP de la mayoría de los pacientes con MS, siempre y cuando se empleen técnicas moleculares de alta sensibilidad^{188,245,266} (p. ej. ASO-qPCR), ha planteado, por un lado, la posibilidad de incluir esta determinación en los nuevos algoritmos diagnósticos de MS²⁰⁴ y, por otra parte, un interrogante acerca de su significado fisiopatológico. No obstante, en la literatura se han referido resultados muy variables en cuanto al porcentaje de pacientes con MS en los que se detectaría la presencia de la mutación en SP, incluso cuando se emplean técnicas de PCR de alta sensibilidad. En este sentido, se cree que las diferencias observadas con dichas técnicas podrían estar relacionadas con el tipo de muestra analizada; así, cuando se emplea ADN genómico el porcentaje de pacientes con la mutación D816V de *KIT* se acerca al 100%^{188,245}, mientras que el análisis de ADN complementario (generado a partir de ARN mensajero) proporciona porcentajes muy inferiores (46%)²⁶⁷. Con el fin de aclarar estas discrepancias, en nuestro estudio realizamos el análisis de la mutación de forma sistemática sobre ADN genómico, empleando en paralelo los dos métodos moleculares más sensibles y ampliamente utilizados en los laboratorios que realizan esta determinación¹⁸³: PCR con bloqueo de la amplificación del ADN silvestre mediante PNA (PNA-PCR)¹⁹¹ y PCR cuantitativa específica de alelo (ASO-qPCR)¹⁸⁸.

Globalmente, nuestros resultados confirmaron que el método de ASO-qPCR utilizado de forma cualitativa (resultado positivo vs. negativo) permitía identificar la presencia de la mutación D816V de *KIT* en un 85% de los pacientes, en línea con lo publicado hasta ese momento^{245,268}. Por el contrario, la técnica de PNA-PCR solo fue positiva en menos de la mitad de esas muestras, lo cual confirmaría la mayor utilidad de la ASO-qPCR para la identificación de la mutación D816V de *KIT* en el rastreo diagnóstico de MS^{204,245}. Por otra parte, tanto el método de ASO-qPCR cuantitativa (porcentaje de células portadoras de la mutación) como el método de PNA-PCR permitían predecir con elevada eficiencia el grado de afectación de la hematopoyesis medular por la mutación. En este sentido merece destacar que, ambos métodos mantenían su elevado valor predictivo para la

presencia de mutación multilíneal cuando el análisis se restringía a pacientes con MSI. Estos resultados sugieren que la presencia de afectación multilíneal de la hematopoyesis se asocia con niveles más elevados de células portadoras de la mutación en SP, independientemente del subtipo diagnóstico de MS y del método empleado para definir la existencia de afectación multilíneal en MO. Definitivamente, estos hallazgos apoyarían la inclusión del análisis de la mutación D816V de *KIT* en SP en el rastreo diagnóstico de MS, si bien un resultado negativo, especialmente cuando se observa en pacientes con síntomas de activación mastocitaria (p. ej. anafilaxia), en ausencia de lesiones cutáneas (MSI⁻), debería ser corroborado con un análisis de MO; esto es debido a que alrededor de un tercio de los pacientes con MSI⁻ fueron negativos para la mutación D816V de *KIT* en SP, a pesar de que en estos casos los mastocitos patológicos de MO presentaban la mutación.

Con el objetivo de esclarecer el motivo por el cual una proporción significativa de pacientes con mutación restringida a mastocito en MO, mostraban la mutación en SP (mediante técnica de ASO-qPCR), analizamos de forma específica la presencia de la mutación D816V de *KIT* en células CD34⁺ y en la serie granulocítica de MO con el mismo método. Como era de esperar, mediante el método ASO-qPCR se detectó la presencia de la mutación D816V en ambos compartimentos celulares en un mayor porcentaje de casos respecto al encontrado mediante PNA-PCR. Asimismo, el número de pacientes en los que se detectó la mutación en las células CD34⁺ de MO, en ausencia de afectación de otras líneas hematopoyéticas distintas del mastocito, se incrementó de forma notable con esta estrategia. Estos hallazgos apoyarían la hipótesis de que la MS es una enfermedad de la célula “stem” hematopoyética, pudiendo tener la mutación su origen en CPH en la gran mayoría de los pacientes^{248,269,270}. Además, la ausencia de una correlación significativa entre el porcentaje de células CD34⁺ portadoras de la mutación y el porcentaje de granulocitos neutrófilos positivos para la mutación, sugiere que la maduración de las células CD34⁺ mutadas podría dirigirse hacia tipos celulares distintos del granulocito neutrófilo, como serían el granulocito eosinófilo y/o basófilo, y/o el propio mastocito^{248,271}. Esta hipótesis queda reforzada por la ausencia de correlación directa entre el porcentaje de

células de la serie granulocítica de MO positivas para la mutación D816V de *KIT* y el número de células mutadas circulantes en SP. En su conjunto estos hallazgos sugieren que deben existir otros compartimentos celulares que contribuyan a la carga alélica de la mutación detectada en SP, especialmente cuando ésta es baja. No obstante, cabe pensar también que esta discrepancia podría explicarse por una posible contaminación de la población CD34⁺ en grado variable con mastocitos portadores de la mutación; sin embargo, esta última posibilidad es poco probable debido a que de forma sistemática durante el proceso de separación de las células CD34⁺ se excluyó la posible contaminación de esta fracción por otras poblaciones celulares mutadas, como los mastocitos patológicos.

La presencia de la mutación en SP de pacientes con afectación de la hematopoyesis restringida a mastocito (y células CD34⁺ cuando se aplica la técnica de ASO-qPCR), contribuiría también a explicar las diferencias observadas entre el método cualitativo de ASO-qPCR y el método de PNA-PCR a la hora de identificar la presencia de la mutación en SP, ya que las células mutadas presentes en la circulación periférica y detectadas mediante ASO-qPCR, pero no mediante PNA-PCR, corresponderían a poblaciones celulares circulantes minoritarias, como pueden ser los precursores CD34⁺, los mastocitos o los granulocitos basófilos. Solo cuando se supere ese mínimo de células mutadas circulantes, la técnica de PNA-PCR pasaría a ser también positiva, estableciéndose ese mínimo en alrededor del 6% de la celularidad de SP. A partir de ese umbral ambos métodos (ASO-qPCR cuantitativa y PNA-PCR) serían específicos a la hora de identificar con elevada probabilidad la existencia de afectación multilineal de la hematopoyesis por la mutación D816V de *KIT*. Sin embargo, cabe señalar que la mitad de los pacientes que presentan afectación multilineal en MO estarían por debajo de este umbral en SP. Esto estaría de acuerdo con los resultados de Hoerman *et al.*²⁶⁶ que identifican un umbral más bajo (2%) de células mutadas en MO asociado a mayor probabilidad de progresión. Por todo ello pensamos que son necesarios nuevos estudios, en series más amplias de pacientes con MSI y con un tiempo de seguimiento más largo, para poder establecer con mayor precisión el nivel mínimo de células mutadas presentes en SP necesario para

detectar de forma inequívoca la presencia de mutación multilíneal en SP y establecer un sistema de estratificación pronóstica para predecir, con una elevada probabilidad, la progresión a corto, medio y largo plazo desde MSI a formas más agresivas de la enfermedad.

En resumen, nuestros resultados muestran que mediante el empleo de la técnica de ASO-qPCR se detecta la presencia de la mutación D816V de *KIT* en la SP de la mayoría de los pacientes con MS que muestran esta mutación en los mastocitos patológicos de MO. Además, mediante el uso tanto de la técnica de ASO-qPCR cuantitativa como del método de PNA-PCR, se puede predecir con elevada precisión la presencia de afectación multilíneal de la hematopoyesis en MO por la mutación D816V de *KIT*. Estos hallazgos sugieren que el análisis de la presencia de la mutación D816V de *KIT* en SP podría emplearse tanto para el diagnóstico de MS como para la clasificación pronóstica de los pacientes con MSI, en función del grado de afectación de la MO (mutación multilíneal vs. mutación restringida al mastocito).

Afectación de células mesenquimales de MO por la mutación D816V de *KIT*: implicación en la ontogenia y el comportamiento clínico y evolutivo de la enfermedad.

Nuestros resultados muestran que alrededor de la mitad de los pacientes que presentan afectación multilíneal de la hematopoyesis en MO por la mutación D816V de *KIT*, la mutación está presente también en las células “stem” mesenquimales (MSC) medulares. Curiosamente, los pacientes con MSI que mostraban positividad para la mutación en sus MSC de MO, mostraban características clínicas típicas de mastocitosis avanzada, asociadas además a una elevada tasa de progresión a formas más agresivas de la enfermedad, incluso cuando se compararon con MSI con mutación multilíneal pero con MSC silvestres para el gen *KIT*.

La célula “stem” MSC es una célula progenitora mesodérmica multipotencial con capacidad de diferenciarse de la línea hematopoyética en etapas relativamente tempranas del desarrollo embrionario¹⁰ para dar lugar a células del

tejido adiposo, cartílago y hueso. En este sentido, el que la mutación D816V de *KIT* esté presente simultáneamente en células “stem” hematopoyéticas (*i.e.* CPH) y MSC indicaría que dicha mutación podría ocurrir en un precursor temprano (*i.e.* embrionario) común a ambos linajes tisulares. De acuerdo con esta hipótesis, cuando analizamos la clonalidad de los mastocitos de MO, empleando como marcador genético de clonalidad el patrón de inactivación del receptor de andrógenos codificado en el cromosoma X^{252,272,273}, observamos que las mujeres con MSI que presentaban un patrón policlonal constituían un subgrupo (mayoritario) de los pacientes que presentaban la mutación D816V de *KIT* en las MSC de MO, no presentando ninguna de ellas *KIT* silvestre en MSC; esto, unido a la presencia de la mutación D816V en los mastocitos patológicos, descartaría por una parte la acumulación de mastocitos reactivos y por otro lado apoyaría la hipótesis de que en este subgrupo de pacientes la mutación D816V apareciera de forma temprana durante el desarrollo embrionario, antes incluso de la inactivación del cromosoma X. La posible reactivación²⁷⁴ del cromosoma X inactivo (con posterioridad a la aparición de la mutación D816V) en un CPH comprometido ya a mastocito (y a las líneas mieloides y/o linfoides) es menos probable, debido a la gran estabilidad que el patrón de inactivación del cromosoma X tiene en células somáticas humanas²⁷⁵.

Así, en su conjunto, nuestros resultados apoyarían la hipótesis de que la mutación D816V podría ocurrir, al menos en algunos pacientes, en una célula precursora totipotencial^{12,210,248} capaz de diferenciarse a las distintas líneas celulares hematopoyéticas, además de a MSC. Esta hipótesis viene avalada por observaciones previas de otros autores que describen el caso de dos gemelos monocigóticos que desarrollaron MSI en la edad adulta con afectación de varias líneas hematopoyéticas por la mutación D816V de *KIT*²⁷⁶. Curiosamente, y a pesar de la teórica aparición temprana durante la ontogenia de la mutación, los síntomas típicos de MSI solo aparecieron en ambos pacientes alrededor de la cuarta década de vida (38 y 40 años, respectivamente), observándose incluso en uno de los gemelos progresión a MS-AHNMD treinta años después de la aparición de las primeras lesiones cutáneas. La aparición tardía de los síntomas de la

enfermedad estaría de acuerdo con lo observado en nuestro estudio y con nuestra experiencia previa¹⁸⁴, así como con lo descrito por otros grupos^{184,211}.

En la mayoría de los pacientes que presentaban afectación de MSC, observamos presencia de la mutación tanto en las líneas mieloides como linfoides, lo cual apoyaría que en estos casos la mutación podría ocurrir en una célula totipotencial mesodérmica, dando lugar a la afectación de un mayor número de CPH, además de las MSC. No obstante, existiría un grupo de pacientes con MSC positivas para la mutación D816V de *KIT* en los que la mutación sólo se detectaba en precursores de líneas mieloides de MO, mientras que estaba ausente en el compartimento linfoide. Esto último podría ser debido a una baja carga de células mutadas con predominio de diferenciación a las líneas mieloides y/o porque los precursores mieloides (p. ej. PGM y PME) expresen *KIT*, a diferencia de lo que sucede con los precursores linfoides (p. ej. células Pro-B y Pro-T)^{94,97,98,22}, por lo que la mutación D816V les conferiría una ventaja competitiva frente a los precursores que presentan *KIT* silvestre. Por otra parte, este hallazgo podría estar relacionado con el hecho bien conocido de que los tiempos de producción y renovación de linfocitos maduros son más largos que los tiempos de renovación de monocitos y granulocitos neutrófilos²⁷⁷⁻²⁸⁰. Además, debido a esta ventaja proliferativa y/o de supervivencia asociada a la activación constitutiva de la ruta de señalización SCF/*KIT*, los precursores hematopoyéticos mieloides tendrían una ventaja acumulativa en la colonización de la MO frente a los precursores linfoides, ya que en las vías de diferenciación celular de estos últimos la expresión de *KIT* desaparece de forma más temprana^{94,97,98,22}.

La aparición temprana de la mutación D816V en una célula progenitora común a la CPH y la MSC podría a su vez facilitar la adquisición de lesiones genéticas adicionales que, asociadas a la mutación de *KIT*, pudieran incrementar la probabilidad de progresión de la enfermedad. De acuerdo con esta hipótesis, en nuestra serie observamos cómo aquellos pacientes en los que la mutación estaba presente en las MSC presentaban con mayor frecuencia características clínicas asociadas a fases avanzadas de la enfermedad: mayor carga de mastocitos en MO y niveles de triptasa sérica elevados, junto a una mayor

incidencia de organomegalias y lesiones óseas. Además, estos pacientes presentaban una tasa de progresión de la enfermedad significativamente mayor, asociada a una supervivencia libre de progresión más corta. Estos resultados concuerdan con lo descrito recientemente en un modelo murino con expresión condicional de la mutación D814V de *KIT* (mutación análoga de la mutación D816V humana)²⁸¹. Así, en este modelo se observó que el grado de severidad de la enfermedad era mayor cuando la mutación se expresaba en una CPH temprana (indiferenciada), respecto a cuando se expresaba en células maduras²⁸². Además, nuestros resultados corroboran observaciones previas sobre la baja tasa de progresión de la enfermedad en aquellos pacientes en los que la mutación afecta únicamente al mastocito¹⁸⁴ y explicarían porqué la esperanza de vida de estos pacientes es similar a la de la población general²¹¹.

Pese a que no hemos encontrado diferencias significativas en la frecuencia y tipo de lesiones óseas entre los pacientes con MSI y afectación multilineal de la hematopoyesis, según presentasen o no la mutación D816V de *KIT* en MSC, la simple presencia de esta mutación activante de *KIT* podría tener algún efecto sobre la función que estas células desempeñan como soporte a la hematopoyesis y en el recambio óseo. En este sentido, mediante cultivo “*ex vivo*” de MSC de MO de pacientes con MSI positivas para la mutación D816V, observamos que estas células presentaban un crecimiento más lento que las MSC de donantes sanos²⁸³. Estos resultados concuerdan con lo referido recientemente por Nemeth *et al.*²⁸⁴ quienes describen también que las MSC de MO de pacientes con MS proliferan a un ritmo más lento que las MSC de sujetos sanos, mostrando además signos de senescencia y de una función osteogénica deteriorada²⁸⁴. A pesar de que nuestros resultados son concordantes con los referidos por Nemeth *et al.*, estos autores no detectaron la presencia de la mutación D816V de *KIT* en las MSC de ninguno de los 5 pacientes con MS que analizaron tras cultivo. Esta aparente discrepancia podría ser debida al bajo número de pacientes analizados, y por lo tanto de casos portadores de la mutación en MSC, y/o a diferencias en los métodos de obtención y análisis de la muestra y de la fracción de las MSC mutadas. Así, mientras que Nemeth *et al.* obtuvieron MSC siguiendo el esquema clásico de cultivo “*ex vivo*” de células mononucleadas de MO y posterior análisis

de la mutación en células procedentes de la fase final del cultivo, en nuestro estudio las MSC se purificaron directamente por citometría de flujo a partir de MO fresca, analizándose la mutación inmediatamente sobre las MSC purificadas. De hecho, cuando cultivamos “*ex vivo*” MSC purificadas, y analizamos la presencia de la mutación D816V de *KIT* tanto al inicio como en cada uno de los pases del cultivo, no se detectó en ningún caso la mutación en las MSC cultivadas a partir del tercer pase del cultivo; esto probablemente es debido a que las MSC normales puedan tener una ventaja competitiva “*in vitro*” frente a las MSC portadoras de la mutación D816V. Estos hallazgos coinciden con las observaciones realizadas por Nemeth *et al.* al describir la coexistencia en sus cultivos de subpoblaciones normales y anormales de MSC, donde las MSC anormales crecían a un ritmo más lento y expresaban marcadores celulares de senescencia, a diferencia de lo que ocurría con las MSC normales²⁸⁴.

En conjunto, en relación con la presencia de la mutación D816V de *KIT* en MSC, nuestros resultados sugieren que el impacto clínico de la mutación D816V de *KIT* depende fundamentalmente de la etapa del desarrollo en la que se adquiere la mutación, y por consiguiente, de la célula diana de la mutación, que coincidiría con un mayor o menor grado de afectación de los CPH. En otras palabras, la aparición de la mutación D816V de *KIT* en un precursor temprano en la ontogenia celular del organismo, conduciría a una mayor afectación de la hematopoyesis y, tras largos periodos de tiempo, a un mayor riesgo de adquisición de alteraciones genéticas secundarias adicionales²⁸⁵. Estas lesiones genéticas secundarias, cuya adquisición y mantenimiento en células “stem” podría verse facilitado por la activación de las vías anti-apoptóticas y de supervivencia inducidas por la presencia de la mutación D816V de *KIT*^{286,287}, podrían contribuir a su vez a facilitar la progresión (y/o transformación) de la enfermedad indolente (MSI) a formas más graves de MS y/o asociarse al desarrollo de otras neoplasias hematológicas de tipo mieloide y/o linfoide.

CONCLUSIONES

En relación a la frecuencia de mutaciones de *KIT*, y en especial de la mutación D816V, en mastocitos de MO de pacientes con mastocitosis, y al grado de afectación del resto de líneas celulares hematopoyéticas de la MO:

1.- La gran mayoría de los pacientes con MS, a excepción de la MSBD, presentan mutación de *KIT* en los mastocitos de MO, siendo la mutación D816V de *KIT* de lejos la más frecuente, por lo que su presencia puede considerarse un marcador diagnóstico de MS.

2.- La afectación de las CPH CD34⁺ y de otras líneas celulares hematopoyéticas de MO por la mutación de *KIT* muestra una estrecha correlación con los subtipos diagnósticos de MS con comportamiento clínico más agresivo, aunque está presente también en una proporción significativa de los pacientes con MSIs⁺, lo que apoyaría el origen de la enfermedad en una célula “stem” hematopoyética.

En relación con la frecuencia con la que se detecta la mutación D816V de *KIT* en la SP de pacientes con MS y su posible relación con el grado de afectación de la hematopoyesis medular:

3.- El empleo de técnicas moleculares de elevada sensibilidad permite detectar la mutación D816V de *KIT* en la SP de la gran mayoría de los pacientes con MS, por lo que esta estrategia es útil en el rastreo diagnóstico de MS de forma previa a la realización del estudio de MO.

4.- La existencia de niveles de infiltración en SP por células portadoras de la mutación D816V de *KIT* superiores al 6% se asocia con un patrón de afectación multilineal de la hematopoyesis en MO, lo que apoya además el posible valor pronóstico de este tipo de determinación.

5.- El grado de afectación por la mutación D816V de *KIT* de las CPH CD34⁺ de MO muestra una baja correlación tanto con la afectación de la línea de granulocito neutrófilo en MO como con el porcentaje de células mutadas en SP, lo que sugiere que las CPH CD34⁺ mutados podrían diferenciarse de forma

preferencial a otras líneas celulares como las de granulocito eosinófilo y/o de granulocito basófilo, además de la línea mastocitaria.

En relación a la posibilidad de que la mutación D816V de *KIT* esté presente en las células MSC de MO y su posible impacto en la evolución a medio y largo plazo de la enfermedad:

6.- Una proporción significativa de pacientes con MSI presenta la mutación D816V de *KIT* en las MSC de MO, habitualmente asociada a afectación multilineal de la hematopoyesis por la mutación y a un patrón policlonal de inactivación del cromosoma X en los mastocitos patológicos, lo que apoyaría la aparición de esta mutación en un precursor común a los CPH CD34⁺ y a las MSC durante las etapas tempranas del desarrollo.

7.- La presencia de la mutación D816V de *KIT* en MSC de pacientes con MSI, se asocia a un mayor riesgo de progresión de la enfermedad y a una supervivencia libre de progresión significativamente más corta respecto a los demás pacientes con MSI; estos hallazgos sugieren que la adquisición de la mutación D816V de *KIT* en un precursor totipotencial común a la CPH y la MSC, conferiría un mayor riesgo de adquisición de alteraciones genéticas adicionales en células portadores de la mutación D816V de *KIT*, hecho que podría favorecer la progresión y/o transformación de la enfermedad a formas más agresivas de la misma.

BIBLIOGRAFÍA

1. Crivellato E, Beltrami C, Mallardi F, Ribatti D. Paul Ehrlich's doctoral thesis: a milestone in the study of mast cells. *British journal of haematology*. 2003;123(1):19-21.
2. Kitamura Y, Go S, Hatanaka K. Decrease of mast cells in W/W^v mice and their increase by bone marrow transplantation. *Blood*. 1978;52(2):447-452.
3. Crivellato E, Beltrami CA, Mallardi F, Ribatti D. The mast cell: an active participant or an innocent bystander? *Histology and histopathology*. 2004;19(1):259-270.
4. Irani AA, Schechter NM, Craig SS, DeBlois G, Schwartz LB. Two types of human mast cells that have distinct neutral protease compositions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1986;83(12):4464-4468.
5. Boyce JA. Mast cells: beyond IgE. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2003;111(1):24-32; quiz 33.
6. Metcalfe DD, Baram D, Mekori YA. Mast cells. *Physiological reviews*. 1997;77(4):1033-1079.
7. Galloway JL, Zon LI. Ontogeny of hematopoiesis: examining the emergence of hematopoietic cells in the vertebrate embryo. *Curr Top Dev Biol*. 2003;53:139-158.
8. Jagannathan-Bogdan M, Zon LI. Hematopoiesis. *Development*. 2013;140(12):2463-2467.
9. Ratajczak MZ. A novel view of the adult bone marrow stem cell hierarchy and stem cell trafficking. *Leukemia*. 2015;29(4):776-782.
10. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 1999;284(5411):143-147.
11. Slukvin II, Vodyanik M. Endothelial origin of mesenchymal stem cells. *Cell Cycle*. 2011;10(9):1370-1373.
12. Chandia M, Sayagues JM, Gutierrez ML, et al. Involvement of primary mesenchymal precursors and hematopoietic bone marrow cells from chronic myeloid leukemia patients by BCR-ABL1 fusion gene. *American journal of hematology*. 2014;89(3):288-294.
13. Kirshenbaum AS, Kessler SW, Goff JP, Metcalfe DD. Demonstration of the origin of human mast cells from CD34+ bone marrow progenitor cells. *Journal of immunology*. 1991;146(5):1410-1415.
14. Okayama Y, Kawakami T. Development, migration, and survival of mast cells. *Immunologic research*. 2006;34(2):97-115.
15. Williams DE, Eisenman J, Baird A, et al. Identification of a ligand for the c-kit proto-oncogene. *Cell*. 1990;63(1):167-174.

16. Tsai M, Takeishi T, Thompson H, et al. Induction of mast cell proliferation, maturation, and heparin synthesis by the rat c-kit ligand, stem cell factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1991;88(14):6382-6386.
17. Valent P, Spanblochl E, Sperr WR, et al. Induction of differentiation of human mast cells from bone marrow and peripheral blood mononuclear cells by recombinant human stem cell factor/kit-ligand in long-term culture. *Blood*. 1992;80(9):2237-2245.
18. Austen KF, Boyce JA. Mast cell lineage development and phenotypic regulation. *Leukemia research*. 2001;25(7):511-518.
19. Rottem M, Okada T, Goff JP, Metcalfe DD. Mast cells cultured from the peripheral blood of normal donors and patients with mastocytosis originate from a CD34+/Fc epsilon RI- cell population. *Blood*. 1994;84(8):2489-2496.
20. Rodewald HR, Dessing M, Dvorak AM, Galli SJ. Identification of a committed precursor for the mast cell lineage. *Science*. 1996;271(5250):818-822.
21. Kirshenbaum AS, Goff JP, Semere T, Foster B, Scott LM, Metcalfe DD. Demonstration that human mast cells arise from a progenitor cell population that is CD34(+), c-kit(+), and expresses aminopeptidase N (CD13). *Blood*. 1999;94(7):2333-2342.
22. Matarraz S, Lopez A, Barrena S, et al. The immunophenotype of different immature, myeloid and B-cell lineage-committed CD34+ hematopoietic cells allows discrimination between normal/reactive and myelodysplastic syndrome precursors. *Leukemia*. 2008;22(6):1175-1183.
23. Falcone FH, Haas H, Gibbs BF. The human basophil: a new appreciation of its role in immune responses. *Blood*. 2000;96(13):4028-4038.
24. Buhring HJ, Simmons PJ, Pudney M, et al. The monoclonal antibody 97A6 defines a novel surface antigen expressed on human basophils and their multipotent and unipotent progenitors. *Blood*. 1999;94(7):2343-2356.
25. Arinobu Y, Iwasaki H, Gurish MF, et al. Developmental checkpoints of the basophil/mast cell lineages in adult murine hematopoiesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005;102(50):18105-18110.
26. Gurish MF, Boyce JA. Mast cells: ontogeny, homing, and recruitment of a unique innate effector cell. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2006;117(6):1285-1291.
27. Chen CC, Grimbaldeston MA, Tsai M, Weissman IL, Galli SJ. Identification of mast cell progenitors in adult mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005;102(32):11408-11413.
28. Kitamura Y, Oboki K, Ito A. Molecular mechanisms of mast cell development. *Immunology and allergy clinics of North America*. 2006;26(3):387-405; v.

29. Kocabas CN, Yavuz AS, Lipsky PE, Metcalfe DD, Akin C. Analysis of the lineage relationship between mast cells and basophils using the c-kit D816V mutation as a biologic signature. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2005;115(6):1155-1161.
30. Kitamura Y, Ito A. Mast cell-committed progenitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005;102(32):11129-11130.
31. Takemoto CM, Lee YN, Jegga AG, et al. Mast cell transcriptional networks. *Blood cells, molecules & diseases*. 2008;41(1):82-90.
32. Nakahata T, Toru H. Cytokines regulate development of human mast cells from hematopoietic progenitors. *International journal of hematology*. 2002;75(4):350-356.
33. Shiohara M, Koike K. Regulation of mast cell development. *Chemical immunology and allergy*. 2005;87:1-21.
34. Nilsson G, Miettinen U, Ishizaka T, Ashman LK, Irani AM, Schwartz LB. Interleukin-4 inhibits the expression of Kit and tryptase during stem cell factor-dependent development of human mast cells from fetal liver cells. *Blood*. 1994;84(5):1519-1527.
35. Hamaguchi Y, Kanakura Y, Fujita J, et al. Interleukin 4 as an essential factor for in vitro clonal growth of murine connective tissue-type mast cells. *The Journal of experimental medicine*. 1987;165(1):268-273.
36. Saito H. Culture of human mast cells from hemopoietic progenitors. *Methods Mol Biol*. 2006;315:113-122.
37. Ochi H, Hirani WM, Yuan Q, Friend DS, Austen KF, Boyce JA. T helper cell type 2 cytokine-mediated comitogenic responses and CCR3 expression during differentiation of human mast cells in vitro. *The Journal of experimental medicine*. 1999;190(2):267-280.
38. Matsuzawa S, Sakashita K, Kinoshita T, Ito S, Yamashita T, Koike K. IL-9 enhances the growth of human mast cell progenitors under stimulation with stem cell factor. *Journal of immunology*. 2003;170(7):3461-3467.
39. Kaieda S, Shin K, Nigrovic PA, et al. Synovial fibroblasts promote the expression and granule accumulation of tryptase via interleukin-33 and its receptor ST-2 (IL1RL1). *The Journal of biological chemistry*. 2010;285(28):21478-21486.
40. Sawai N, Koike K, Mwantemi HH, et al. Thrombopoietin augments stem cell factor-dependent growth of human mast cells from bone marrow multipotential hematopoietic progenitors. *Blood*. 1999;93(11):3703-3712.
41. Kirshenbaum AS, Worobec AS, Davis TA, Goff JP, Semere T, Metcalfe DD. Inhibition of human mast cell growth and differentiation by interferon gamma-1b. *Experimental hematology*. 1998;26(3):245-251.

42. Kinoshita T, Sawai N, Hidaka E, Yamashita T, Koike K. Interleukin-6 directly modulates stem cell factor-dependent development of human mast cells derived from CD34(+) cord blood cells. *Blood*. 1999;94(2):496-508.
43. Saito H, Ebisawa M, Tachimoto H, et al. Selective growth of human mast cells induced by Steel factor, IL-6, and prostaglandin E2 from cord blood mononuclear cells. *Journal of immunology*. 1996;157(1):343-350.
44. Liu C, Liu Z, Li Z, Wu Y. Molecular regulation of mast cell development and maturation. *Molecular biology reports*. 2010;37(4):1993-2001.
45. Dahl C, Hoffmann HJ, Saito H, Schiotz PO. Human mast cells express receptors for IL-3, IL-5 and GM-CSF; a partial map of receptors on human mast cells cultured in vitro. *Allergy*. 2004;59(10):1087-1096.
46. Harigae H, Takahashi S, Suwabe N, et al. Differential roles of GATA-1 and GATA-2 in growth and differentiation of mast cells. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms*. 1998;3(1):39-50.
47. Taghon T, Yui MA, Rothenberg EV. Mast cell lineage diversion of T lineage precursors by the essential T cell transcription factor GATA-3. *Nature immunology*. 2007;8(8):845-855.
48. Walsh JC, DeKoter RP, Lee HJ, et al. Cooperative and antagonistic interplay between PU.1 and GATA-2 in the specification of myeloid cell fates. *Immunity*. 2002;17(5):665-676.
49. Kitamura Y, Morii E, Jippo T, Ito A. Regulation of mast cell phenotype by MITF. *International archives of allergy and immunology*. 2002;127(2):106-109.
50. Tsujimura T, Morii E, Nozaki M, et al. Involvement of transcription factor encoded by the mi locus in the expression of c-kit receptor tyrosine kinase in cultured mast cells of mice. *Blood*. 1996;88(4):1225-1233.
51. Qi X, Hong J, Chaves L, et al. Antagonistic regulation by the transcription factors C/EBPalpha and MITF specifies basophil and mast cell fates. *Immunity*. 2013;39(1):97-110.
52. Abraham SN, Malaviya R. Mast cells in infection and immunity. *Infection and immunity*. 1997;65(9):3501-3508.
53. Marshall JS, King CA, McCurdy JD. Mast cell cytokine and chemokine responses to bacterial and viral infection. *Curr Pharm Des*. 2003;9(1):11-24.
54. Orinska Z, Maurer M, Mirghomizadeh F, et al. IL-15 constrains mast cell-dependent antibacterial defenses by suppressing chymase activities. *Nature medicine*. 2007;13(8):927-934.
55. Galli SJ, Maurer M, Lantz CS. Mast cells as sentinels of innate immunity. *Current opinion in immunology*. 1999;11(1):53-59.
56. Kumar V, Sharma A. Mast cells: emerging sentinel innate immune cells with diverse role in immunity. *Molecular immunology*. 2010;48(1-3):14-25.

57. Supajatura V, Ushio H, Nakao A, Okumura K, Ra C, Ogawa H. Protective roles of mast cells against enterobacterial infection are mediated by Toll-like receptor 4. *Journal of immunology*. 2001;167(4):2250-2256.
58. Varadaradjalou S, Feger F, Thieblemont N, et al. Toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 differentially activate human mast cells. *European journal of immunology*. 2003;33(4):899-906.
59. Feger F, Varadaradjalou S, Gao Z, Abraham SN, Arock M. The role of mast cells in host defense and their subversion by bacterial pathogens. *Trends in immunology*. 2002;23(3):151-158.
60. Zhang Y, Ramos BF, Jakschik BA. Neutrophil recruitment by tumor necrosis factor from mast cells in immune complex peritonitis. *Science*. 1992;258(5090):1957-1959.
61. Mazzoni A, Siraganian RP, Leifer CA, Segal DM. Dendritic cell modulation by mast cells controls the Th1/Th2 balance in responding T cells. *Journal of immunology*. 2006;177(6):3577-3581.
62. Moon TC, St Laurent CD, Morris KE, et al. Advances in mast cell biology: new understanding of heterogeneity and function. *Mucosal immunology*. 2010;3(2):111-128.
63. Saluja R, Metz M, Maurer M. Role and relevance of mast cells in fungal infections. *Front Immunol*. 2012;3:146.
64. Malaviya R, Twesten NJ, Ross EA, Abraham SN, Pfeifer JD. Mast cells process bacterial Ags through a phagocytic route for class I MHC presentation to T cells. *Journal of immunology*. 1996;156(4):1490-1496.
65. Poncet P, Arock M, David B. MHC class II-dependent activation of CD4+ T cell hybridomas by human mast cells through superantigen presentation. *Journal of leukocyte biology*. 1999;66(1):105-112.
66. Frandji P, Tkaczyk C, Oskeritzian C, David B, Desaymard C, Mecheri S. Exogenous and endogenous antigens are differentially presented by mast cells to CD4+ T lymphocytes. *European journal of immunology*. 1996;26(10):2517-2528.
67. Mekori YA, Metcalfe DD. Mast cell-T cell interactions. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 1999;104(3 Pt 1):517-523.
68. Nakajima T, Inagaki N, Tanaka H, et al. Marked increase in CC chemokine gene expression in both human and mouse mast cell transcriptomes following Fcepsilon receptor I cross-linking: an interspecies comparison. *Blood*. 2002;100(12):3861-3868.
69. Ott VL, Cambier JC, Kappler J, Marrack P, Swanson BJ. Mast cell-dependent migration of effector CD8+ T cells through production of leukotriene B4. *Nature immunology*. 2003;4(10):974-981.
70. Lewis RA, Austen KF. Mediation of local homeostasis and inflammation by leukotrienes and other mast cell-dependent compounds. *Nature*. 1981;293(5828):103-108.

71. Rao KN, Brown MA. Mast cells: multifaceted immune cells with diverse roles in health and disease. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2008;1143:83-104.
72. Henz BM. Exploring the mast cell enigma: a personal reflection of what remains to be done. *Experimental dermatology*. 2008;17(2):91-99.
73. Metz M, Maurer M. Mast cells--key effector cells in immune responses. *Trends in immunology*. 2007;28(5):234-241.
74. Ishizaka T, Ishizaka K. Activation of mast cells for mediator release through IgE receptors. *Progress in allergy*. 1984;34:188-235.
75. Kiener HP, Baghestanian M, Dominkus M, et al. Expression of the C5a receptor (CD88) on synovial mast cells in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis and rheumatism*. 1998;41(2):233-245.
76. Theoharides TC, Conti P. Mast cells: the Jekyll and Hyde of tumor growth. *Trends in immunology*. 2004;25(5):235-241.
77. Stone KD, Prussin C, Metcalfe DD. IgE, mast cells, basophils, and eosinophils. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2010;125(2 Suppl 2):S73-80.
78. Yarden Y, Kuang WJ, Yang-Feng T, et al. Human proto-oncogene c-kit: a new cell surface receptor tyrosine kinase for an unidentified ligand. *The EMBO journal*. 1987;6(11):3341-3351.
79. Besmer P, Murphy JE, George PC, et al. A new acute transforming feline retrovirus and relationship of its oncogene v-kit with the protein kinase gene family. *Nature*. 1986;320(6061):415-421.
80. Anderson DM, Lyman SD, Baird A, et al. Molecular cloning of mast cell growth factor, a hematopoietin that is active in both membrane bound and soluble forms. *Cell*. 1990;63(1):235-243.
81. Roskoski R, Jr. Structure and regulation of Kit protein-tyrosine kinase--the stem cell factor receptor. *Biochemical and biophysical research communications*. 2005;338(3):1307-1315.
82. Lemmon MA, Pinchasi D, Zhou M, Lax I, Schlessinger J. Kit receptor dimerization is driven by bivalent binding of stem cell factor. *The Journal of biological chemistry*. 1997;272(10):6311-6317.
83. Zhang Z, Zhang R, Joachimiak A, Schlessinger J, Kong XP. Crystal structure of human stem cell factor: implication for stem cell factor receptor dimerization and activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2000;97(14):7732-7737.
84. Lev S, Blechman J, Nishikawa S, Givol D, Yarden Y. Interspecies molecular chimeras of kit help define the binding site of the stem cell factor. *Molecular and cellular biology*. 1993;13(4):2224-2234.
85. Mol CD, Lim KB, Sridhar V, et al. Structure of a c-kit product complex reveals the basis for kinase transactivation. *The Journal of biological chemistry*. 2003;278(34):31461-31464.

86. Orfao A, Garcia-Montero AC, Sanchez L, Escribano L. Recent advances in the understanding of mastocytosis: the role of KIT mutations. *British journal of haematology*. 2007;138(1):12-30.
87. Huang EJ, Nocka KH, Buck J, Besmer P. Differential expression and processing of two cell associated forms of the kit-ligand: KL-1 and KL-2. *Molecular biology of the cell*. 1992;3(3):349-362.
88. Miyazawa K, Williams DA, Gotoh A, Nishimaki J, Broxmeyer HE, Toyama K. Membrane-bound Steel factor induces more persistent tyrosine kinase activation and longer life span of c-kit gene-encoded protein than its soluble form. *Blood*. 1995;85(3):641-649.
89. Blechman JM, Lev S, Barg J, et al. The fourth immunoglobulin domain of the stem cell factor receptor couples ligand binding to signal transduction. *Cell*. 1995;80(1):103-113.
90. Mol CD, Dougan DR, Schneider TR, et al. Structural basis for the autoinhibition and STI-571 inhibition of c-Kit tyrosine kinase. *The Journal of biological chemistry*. 2004;279(30):31655-31663.
91. Agarwal S, Kazi JU, Ronnstrand L. Phosphorylation of the activation loop tyrosine 823 in c-Kit is crucial for cell survival and proliferation. *The Journal of biological chemistry*. 2013;288(31):22460-22468.
92. Pawson T. Protein modules and signalling networks. *Nature*. 1995;373(6515):573-580.
93. Ronnstrand L. Signal transduction via the stem cell factor receptor/c-Kit. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 2004;61(19-20):2535-2548.
94. Lennartsson J, Jelacic T, Linnekin D, Shivakrupa R. Normal and oncogenic forms of the receptor tyrosine kinase kit. *Stem cells*. 2005;23(1):16-43.
95. Yuzawa S, Opatowsky Y, Zhang Z, Mandiyan V, Lax I, Schlessinger J. Structural basis for activation of the receptor tyrosine kinase KIT by stem cell factor. *Cell*. 2007;130(2):323-334.
96. Ogawa M, Matsuzaki Y, Nishikawa S, et al. Expression and function of c-kit in hemopoietic progenitor cells. *The Journal of experimental medicine*. 1991;174(1):63-71.
97. Linnekin D. Early signaling pathways activated by c-Kit in hematopoietic cells. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 1999;31(10):1053-1074.
98. Li CL, Johnson GR. Stem cell factor enhances the survival but not the self-renewal of murine hematopoietic long-term repopulating cells. *Blood*. 1994;84(2):408-414.
99. Majumder S, Brown K, Qiu FH, Besmer P. c-kit protein, a transmembrane kinase: identification in tissues and characterization. *Molecular and cellular biology*. 1988;8(11):4896-4903.

100. Irani AM, Nilsson G, Miettinen U, et al. Recombinant human stem cell factor stimulates differentiation of mast cells from dispersed human fetal liver cells. *Blood*. 1992;80(12):3009-3021.
101. Broudy VC, Kovach NL, Bennett LG, Lin N, Jacobsen FW, Kidd PG. Human umbilical vein endothelial cells display high-affinity c-kit receptors and produce a soluble form of the c-kit receptor. *Blood*. 1994;83(8):2145-2152.
102. Grabbe J, Welker P, Dippel E, Czarnetzki BM. Stem cell factor, a novel cutaneous growth factor for mast cells and melanocytes. *Archives of dermatological research*. 1994;287(1):78-84.
103. Stoop H, Honecker F, Cools M, de Krijger R, Bokemeyer C, Looijenga LH. Differentiation and development of human female germ cells during prenatal gonadogenesis: an immunohistochemical study. *Human reproduction*. 2005;20(6):1466-1476.
104. Huizinga JD, Thuneberg L, Kluppel M, Malysz J, Mikkelsen HB, Bernstein A. W/kit gene required for interstitial cells of Cajal and for intestinal pacemaker activity. *Nature*. 1995;373(6512):347-349.
105. Lewis TS, Shapiro PS, Ahn NG. Signal transduction through MAP kinase cascades. *Advances in cancer research*. 1998;74:49-139.
106. Thommes K, Lennartsson J, Carlberg M, Ronnstrand L. Identification of Tyr-703 and Tyr-936 as the primary association sites for Grb2 and Grb7 in the c-Kit/stem cell factor receptor. *The Biochemical journal*. 1999;341 (Pt 1):211-216.
107. Dorsey JF, Cunnick JM, Mane SM, Wu J. Regulation of the Erk2-Elk1 signaling pathway and megakaryocytic differentiation of Bcr-Abl(+) K562 leukemic cells by Gab2. *Blood*. 2002;99(4):1388-1397.
108. Duronio V, Welham MJ, Abraham S, Dryden P, Schrader JW. p21ras activation via hemopoietin receptors and c-kit requires tyrosine kinase activity but not tyrosine phosphorylation of p21ras GTPase-activating protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1992;89(5):1587-1591.
109. Luciano F, Jacquet A, Colosetti P, et al. Phosphorylation of Bim-EL by Erk1/2 on serine 69 promotes its degradation via the proteasome pathway and regulates its proapoptotic function. *Oncogene*. 2003;22(43):6785-6793.
110. Ishizuka T, Kawasome H, Terada N, et al. Stem cell factor augments Fc epsilon RI-mediated TNF-alpha production and stimulates MAP kinases via a different pathway in MC/9 mast cells. *Journal of immunology*. 1998;161(7):3624-3630.
111. Kitamura Y, Hirota S. Kit as a human oncogenic tyrosine kinase. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 2004;61(23):2924-2931.
112. Weiler SR, Mou S, DeBerry CS, et al. JAK2 is associated with the c-kit proto-oncogene product and is phosphorylated in response to stem cell factor. *Blood*. 1996;87(9):3688-3693.

113. Morales JK, Falanga YT, Depcrynski A, Fernando J, Ryan JJ. Mast cell homeostasis and the JAK-STAT pathway. *Genes and immunity*. 2010;11(8):599-608.
114. Blume-Jensen P, Janknecht R, Hunter T. The kit receptor promotes cell survival via activation of PI 3-kinase and subsequent Akt-mediated phosphorylation of Bad on Ser136. *Current biology : CB*. 1998;8(13):779-782.
115. Serve H, Yee NS, Stella G, Sepp-Lorenzino L, Tan JC, Besmer P. Differential roles of PI3-kinase and Kit tyrosine 821 in Kit receptor-mediated proliferation, survival and cell adhesion in mast cells. *The EMBO journal*. 1995;14(3):473-483.
116. Moller C, Alfredsson J, Engstrom M, et al. Stem cell factor promotes mast cell survival via inactivation of FOXO3a-mediated transcriptional induction and MEK-regulated phosphorylation of the proapoptotic protein Bim. *Blood*. 2005;106(4):1330-1336.
117. Timokhina I, Kissel H, Stella G, Besmer P. Kit signaling through PI 3-kinase and Src kinase pathways: an essential role for Rac1 and JNK activation in mast cell proliferation. *The EMBO journal*. 1998;17(21):6250-6262.
118. Blume-Jensen P, Ronnstrand L, Gout I, Waterfield MD, Heldin CH. Modulation of Kit/stem cell factor receptor-induced signaling by protein kinase C. *The Journal of biological chemistry*. 1994;269(34):21793-21802.
119. Linnekin D, DeBerry CS, Mou S. Lyn associates with the juxtamembrane region of c-Kit and is activated by stem cell factor in hematopoietic cell lines and normal progenitor cells. *The Journal of biological chemistry*. 1997;272(43):27450-27455.
120. Price DJ, Rivnay B, Fu Y, Jiang S, Avraham S, Avraham H. Direct association of Csk homologous kinase (CHK) with the diphosphorylated site Tyr568/570 of the activated c-KIT in megakaryocytes. *The Journal of biological chemistry*. 1997;272(9):5915-5920.
121. Koike T, Hirai K, Morita Y, Nozawa Y. Stem cell factor-induced signal transduction in rat mast cells. Activation of phospholipase D but not phosphoinositide-specific phospholipase C in c-kit receptor stimulation. *Journal of immunology*. 1993;151(1):359-366.
122. Gommerman JL, Sittaro D, Klebasz NZ, Williams DA, Berger SA. Differential stimulation of c-Kit mutants by membrane-bound and soluble Steel Factor correlates with leukemic potential. *Blood*. 2000;96(12):3734-3742.
123. Plo I, Lautier D, Casteran N, Dubreuil P, Arock M, Laurent G. Kit signaling and negative regulation of daunorubicin-induced apoptosis: role of phospholipase Cgamma. *Oncogene*. 2001;20(46):6752-6763.
124. Maddens S, Charruyer A, Plo I, et al. Kit signaling inhibits the sphingomyelin-ceramide pathway through PLC gamma 1: implication in stem cell factor radioprotective effect. *Blood*. 2002;100(4):1294-1301.
125. Lennartsson J, Blume-Jensen P, Hermanson M, Ponten E, Carlberg M, Ronnstrand L. Phosphorylation of Shc by Src family kinases is necessary for stem

cell factor receptor/c-kit mediated activation of the Ras/MAP kinase pathway and c-fos induction. *Oncogene*. 1999;18(40):5546-5553.

126. Wollberg P, Lennartsson J, Gottfridsson E, Yoshimura A, Ronnstrand L. The adapter protein APS associates with the multifunctional docking sites Tyr-568 and Tyr-936 in c-Kit. *The Biochemical journal*. 2003;370(Pt 3):1033-1038.

127. Wisniewski D, Strife A, Clarkson B. c-kit ligand stimulates tyrosine phosphorylation of the c-Cbl protein in human hematopoietic cells. *Leukemia*. 1996;10(9):1436-1442.

128. Furitsu T, Tsujimura T, Tono T, et al. Identification of mutations in the coding sequence of the proto-oncogene c-kit in a human mast cell leukemia cell line causing ligand-independent activation of c-kit product. *The Journal of clinical investigation*. 1993;92(4):1736-1744.

129. Spritz RA. Molecular basis of human piebaldism. *The Journal of investigative dermatology*. 1994;103(5 Suppl):137S-140S.

130. He WB, Hu X, Tang WL, Li LY, Lu GX, Li W. [Identification of novel KIT gene mutations in two Chinese families with piebaldism]. *Zhonghua yi xue yi chuan xue za zhi = Zhonghua yixue yichuanxue zazhi = Chinese journal of medical genetics*. 2013;30(4):385-388.

131. Wasag B, Chmara M, Legius E. Molecular characterization of two novel KIT mutations in patients with piebaldism. *Journal of dermatological science*. 2012;66(1):78-79.

132. Lee H, Oh SH, Koo KY, Suzuki T, Lee JS. Novel mutations of KIT gene in two Korean patients: variegated shades of phenotypes in tyrosine kinase 1 domain. *Journal of dermatological science*. 2014;76(1):74-76.

133. Jia WX, Xiao XM, Wu JB, et al. A novel missense KIT mutation causing piebaldism in one Chinese family associated with cafe-au-lait macules and intertriginous freckling. *Therapeutics and clinical risk management*. 2015;11:635-638.

134. Murakami T, Fukai K, Oiso N, et al. New KIT mutations in patients with piebaldism. *Journal of dermatological science*. 2004;35(1):29-33.

135. Wen GD, Zhou C, Yu C, et al. A novel mutation of the KIT gene in a Chinese family with piebaldism. *Chinese medical journal*. 2013;126(12):2325-2328.

136. Longley BJ, Jr., Metcalfe DD, Tharp M, et al. Activating and dominant inactivating c-KIT catalytic domain mutations in distinct clinical forms of human mastocytosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1999;96(4):1609-1614.

137. Kitayama H, Tsujimura T, Matsumura I, et al. Neoplastic transformation of normal hematopoietic cells by constitutively activating mutations of c-kit receptor tyrosine kinase. *Blood*. 1996;88(3):995-1004.

138. Longley BJ, Reguera MJ, Ma Y. Classes of c-KIT activating mutations: proposed mechanisms of action and implications for disease classification and therapy. *Leukemia research*. 2001;25(7):571-576.
139. Ma Y, Zeng S, Metcalfe DD, et al. The c-KIT mutation causing human mastocytosis is resistant to STI571 and other KIT kinase inhibitors; kinases with enzymatic site mutations show different inhibitor sensitivity profiles than wild-type kinases and those with regulatory-type mutations. *Blood*. 2002;99(5):1741-1744.
140. Hirota S, Isozaki K, Moriyama Y, et al. Gain-of-function mutations of c-kit in human gastrointestinal stromal tumors. *Science*. 1998;279(5350):577-580.
141. Miettinen M, Majidi M, Lasota J. Pathology and diagnostic criteria of gastrointestinal stromal tumors (GISTs): a review. *European journal of cancer*. 2002;38 Suppl 5:S39-51.
142. Akin C, Metcalfe DD. Systemic mastocytosis. *Annual review of medicine*. 2004;55:419-432.
143. Beghini A, Ripamonti CB, Cairoli R, et al. KIT activating mutations: incidence in adult and pediatric acute myeloid leukemia, and identification of an internal tandem duplication. *Haematologica*. 2004;89(8):920-925.
144. Fontalba A, Real PJ, Fernandez-Luna JL, Agirre X, Prosper F, Richard C. Identification of c-Kit gene mutations in patients with polycythemia vera. *Leukemia research*. 2006;30(10):1325-1326.
145. Lennartsson J, Ronnstrand L. Stem cell factor receptor/c-Kit: from basic science to clinical implications. *Physiological reviews*. 2012;92(4):1619-1649.
146. Akin C, Metcalfe DD. The biology of Kit in disease and the application of pharmacogenetics. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2004;114(1):13-19; quiz 20.
147. Gari M, Goodeve A, Wilson G, et al. c-kit proto-oncogene exon 8 in-frame deletion plus insertion mutations in acute myeloid leukaemia. *British journal of haematology*. 1999;105(4):894-900.
148. Hartmann K, Wardelmann E, Ma Y, et al. Novel germline mutation of KIT associated with familial gastrointestinal stromal tumors and mastocytosis. *Gastroenterology*. 2005;129(3):1042-1046.
149. Zhang LY, Smith ML, Schultheis B, et al. A novel K509I mutation of KIT identified in familial mastocytosis-in vitro and in vivo responsiveness to imatinib therapy. *Leukemia research*. 2006;30(4):373-378.
150. Wang HJ, Lin ZM, Zhang J, Yin JH, Yang Y. A new germline mutation in KIT associated with diffuse cutaneous mastocytosis in a Chinese family. *Clinical and experimental dermatology*. 2014;39(2):146-149.
151. Valent P, Berger J, Cerny-Reiterer S, et al. Chronic mast cell leukemia (MCL) with KIT S476I: a rare entity defined by leukemic expansion of mature mast cells and absence of organ damage. *Annals of hematology*. 2015;94(2):223-231.

152. Akin C, Fumo G, Yavuz AS, Lipsky PE, Neckers L, Metcalfe DD. A novel form of mastocytosis associated with a transmembrane c-kit mutation and response to imatinib. *Blood*. 2004;103(8):3222-3225.
153. Tang X, Boxer M, Drummond A, Ogston P, Hodgins M, Burden AD. A germline mutation in KIT in familial diffuse cutaneous mastocytosis. *Journal of medical genetics*. 2004;41(6):e88.
154. Sakuma Y, Sakurai S, Oguni S, Satoh M, Hironaka M, Saito K. c-kit gene mutations in intracranial germinomas. *Cancer science*. 2004;95(9):716-720.
155. Willmore-Payne C, Holden JA, Tripp S, Layfield LJ. Human malignant melanoma: detection of BRAF- and c-kit-activating mutations by high-resolution amplicon melting analysis. *Human pathology*. 2005;36(5):486-493.
156. Nieto MJ, Scalise A, Najfeld V. Cytogenetically normal acute myeloid leukemia with a novel KIT mutation in exon 11 G565V developing a sole trisomy 13 at relapse: a clinical dilemma. *Acta haematologica*. 2015;133(1):1-5.
157. Buttner C, Henz BM, Welker P, Sepp NT, Grabbe J. Identification of activating c-kit mutations in adult-, but not in childhood-onset indolent mastocytosis: a possible explanation for divergent clinical behavior. *The Journal of investigative dermatology*. 1998;111(6):1227-1231.
158. Nakagomi N, Hirota S. Juxtamembrane-type c-kit gene mutation found in aggressive systemic mastocytosis induces imatinib-resistant constitutive KIT activation. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 2007;87(4):365-371.
159. Nagata H, Worobec AS, Oh CK, et al. 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1995;92(23):10560-10564.
160. Longley BJ, Tyrrell L, Lu SZ, et al. Somatic c-KIT activating mutation in urticaria pigmentosa and aggressive mastocytosis: establishment of clonality in a human mast cell neoplasm. *Nature genetics*. 1996;12(3):312-314.
161. Beghini A, Peterlongo P, Ripamonti CB, et al. C-kit mutations in core binding factor leukemias. *Blood*. 2000;95(2):726-727.
162. Tian Q, Frierson HF, Jr., Krystal GW, Moskaluk CA. Activating c-kit gene mutations in human germ cell tumors. *The American journal of pathology*. 1999;154(6):1643-1647.
163. Hongyo T, Li T, Syaifudin M, et al. Specific c-kit mutations in sinonasal natural killer/T-cell lymphoma in China and Japan. *Cancer research*. 2000;60(9):2345-2347.
164. Nakai M, Hashikura Y, Ohkouchi M, et al. Characterization of novel germline c-kit gene mutation, KIT-Tyr553Cys, observed in a family with multiple gastrointestinal stromal tumors. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 2012;92(3):451-457.

165. Spector MS, Iossifov I, Kritharis A, et al. Mast-cell leukemia exome sequencing reveals a mutation in the IgE mast-cell receptor beta chain and KIT V654A. *Leukemia*. 2012;26(6):1422-1425.
166. Georgin-Lavialle S, Lhermitte L, Suarez F, et al. Mast cell leukemia: identification of a new c-Kit mutation, dup(501-502), and response to masitinib, a c-Kit tyrosine kinase inhibitor. *European journal of haematology*. 2012;89(1):47-52.
167. Yamanoi K, Higuchi K, Kishimoto H, et al. Multiple gastrointestinal stromal tumors with novel germline c-kit gene mutation, K642T, at exon 13. *Human pathology*. 2014;45(4):884-888.
168. Alyuruk H, Calibasi G, Cavas L, et al. Protein modelling of a novel KIT mutation (N567Y) in the gastrointestinal stromal tumour. *European journal of cancer*. 2013;49(10):2449-2452.
169. Lim SH, Lee JY, Sun JM, et al. A new KIT gene mutation in thymic cancer and a promising response to imatinib. *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*. 2013;8(10):e91-92.
170. Kim YS, Wu H, Pawlowska AB, et al. Pediatric mast cell sarcoma of temporal bone with novel L799F (2395 C>T) KIT mutation, mimicking histiocytic neoplasm. *Am J Surg Pathol*. 2013;37(3):453-458.
171. Vita M, Tisserand JC, Chauvot de Beauchene I, et al. Characterization of S628N: a novel KIT mutation found in a metastatic melanoma. *JAMA Dermatol*. 2014;150(12):1345-1349.
172. Allegra M, Giaccherio D, Segalen C, et al. A new KIT mutation (N505I) in acral melanoma confers constitutive signaling, favors tumorigenic properties, and is sensitive to imatinib. *The Journal of investigative dermatology*. 2014;134(5):1473-1476.
173. Pollard WL, Beachkofsky TM, Kobayashi TT. Novel R634W c-kit mutation identified in familial mastocytosis. *Pediatr Dermatol*. 2015;32(2):267-270.
174. Yilmaz I, Gamsizkan M, Kucukodaci Z, et al. BRAF, KIT, NRAS, GNAQ and GNA11 mutation analysis in cutaneous melanomas in Turkish population. *Indian J Pathol Microbiol*. 2015;58(3):279-284.
175. Horny H.P Metcalfe D.D BJM, Bain B.J, Akin C, Escribano L et al. Mastocytosis, in WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. In: Swerdlow SH CE HN, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman JW ed. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Vol. 2. Lyon: IARC; 2008:54-63.
176. Kitayama H, Kanakura Y, Furitsu T, et al. Constitutively activating mutations of c-kit receptor tyrosine kinase confer factor-independent growth and tumorigenicity of factor-dependent hematopoietic cell lines. *Blood*. 1995;85(3):790-798.
177. Tsujimura T, Hashimoto K, Kitayama H, et al. Activating mutation in the catalytic domain of c-kit elicits hematopoietic transformation by receptor self-

- association not at the ligand-induced dimerization site. *Blood*. 1999;93(4):1319-1329.
178. Taylor ML, Dastych J, Sehgal D, et al. The Kit-activating mutation D816V enhances stem cell factor--dependent chemotaxis. *Blood*. 2001;98(4):1195-1199.
179. Laine E, Chauvot de Beauchene I, Perahia D, Auclair C, Tchertanov L. Mutation D816V alters the internal structure and dynamics of c-KIT receptor cytoplasmic region: implications for dimerization and activation mechanisms. *PLoS computational biology*. 2011;7(6):e1002068.
180. Chaix A, Arcangeli ML, Lopez S, et al. KIT-D816V oncogenic activity is controlled by the juxtamembrane docking site Y568-Y570. *Oncogene*. 2014;33(7):872-881.
181. Akin C, Kirshenbaum AS, Semere T, Worobec AS, Scott LM, Metcalfe DD. Analysis of the surface expression of c-kit and occurrence of the c-kit Asp816Val activating mutation in T cells, B cells, and myelomonocytic cells in patients with mastocytosis. *Experimental hematology*. 2000;28(2):140-147.
182. Akin C. Multilineage hematopoietic involvement in systemic mastocytosis. *Leukemia research*. 2003;27(10):877-878.
183. Arock M, Sotlar K, Akin C, et al. KIT mutation analysis in mast cell neoplasms: recommendations of the European Competence Network on Mastocytosis. *Leukemia*. 2015;29(6):1223-1232.
184. Escribano L, Alvarez-Twose I, Sanchez-Munoz L, et al. Prognosis in adult indolent systemic mastocytosis: a long-term study of the Spanish Network on Mastocytosis in a series of 145 patients. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2009;124(3):514-521.
185. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1977;74(12):5463-5467.
186. Kristensen T, Broesby-Olsen S, Vestergaard H, Bindslev-Jensen C, Moller MB. Targeted ultradeep next-generation sequencing as a method for KIT D816V mutation analysis in mastocytosis. *European journal of haematology*. 2015.
187. Tan A, Westerman D, McArthur GA, Lynch K, Waring P, Dobrovic A. Sensitive detection of KIT D816V in patients with mastocytosis. *Clin Chem*. 2006;52(12):2250-2257.
188. Kristensen T, Vestergaard H, Moller MB. Improved detection of the KIT D816V mutation in patients with systemic mastocytosis using a quantitative and highly sensitive real-time qPCR assay. *J Mol Diagn*. 2011;13(2):180-188.
189. White. HE SD, Hall. VJ, Waghorn. K, Sanders. R, Foy. CA, Cross. NCP Sensitive and quantitative detection of KIT D816V in patients with systemic mastocytosis. In: Meeting AiMM ed. London; 2010.
190. Lawley W, Hird H, Mallinder P, et al. Detection of an activating c-kit mutation by real-time PCR in patients with anaphylaxis. *Mutation research*. 2005;572(1-2):1-13.

191. Sotlar K, Escribano L, Landt O, et al. One-step detection of c-kit point mutations using peptide nucleic acid-mediated polymerase chain reaction clamping and hybridization probes. *The American journal of pathology*. 2003;162(3):737-746.
192. Nettleship E, Tay W. Rare forms of urticaria. *British Medical Journal*. 1869;2:323-333.
193. Ehrlich P. Beiträge zur Kenntnis der granulierten Bindege-webszellen und der eosinophilen Leukozyten. *Archives in Anatomical Physiology*. 1879;3(3):166-169.
194. Sangster A. An anomalous mottled rash, accompanied by pruritus, factions uticaria and pigmentation, ¿Urticaria pigmentosa? *Trans Clin Soc Lond*. 1878;11:161-166.
195. Unna PG. Beitrage zur anatomie und pathogenese der urticaria simplex und pigmentosa. *Derm Studien*. 1887;3:1-9.
196. Valent P, Akin C, Sperr WR, Horny HP, Metcalfe DD. Smouldering mastocytosis: a novel subtype of systemic mastocytosis with slow progression. *International archives of allergy and immunology*. 2002;127(2):137-139.
197. Alvarez-Twose I, Jara-Acevedo M, Morgado JM, et al. Clinical, immunophenotypic, and molecular characteristics of well-differentiated systemic mastocytosis. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2015.
198. Alvarez-Twose I, Gonzalez de Olano D, Sanchez-Munoz L, et al. Clinical, biological, and molecular characteristics of clonal mast cell disorders presenting with systemic mast cell activation symptoms. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2010;125(6):1269-1278 e1262.
199. Cohen SS, Skovbo S, Vestergaard H, et al. Epidemiology of systemic mastocytosis in Denmark. *British journal of haematology*. 2014;166(4):521-528.
200. Escribano L G-MA, Sanchez-Muñoz L, Teodosio C, Alvarez-Twose I, Jara-Acevedo M, Morgado JM, Almeida J, Orfao A. Diagnosis of Adult Mastocytosis: Role for Bone Marrow Analysis, in Laboratory Hematology Practice. In: Kottke-Marchant K DB ed. Laboratory Hematology Practice. Oxford: Wiley-Blackwell; 2012.
201. Escribano L, Orfao A, Villarrubia J, et al. Immunophenotypic characterization of human bone marrow mast cells. A flow cytometric study of normal and pathological bone marrow samples. *Analytical cellular pathology : the journal of the European Society for Analytical Cellular Pathology*. 1998;16(3):151-159.
202. Valent P, Akin C, Escribano L, et al. Standards and standardization in mastocytosis: consensus statements on diagnostics, treatment recommendations and response criteria. *European journal of clinical investigation*. 2007;37(6):435-453.
203. Sperr WR, Escribano L, Jordan JH, et al. Morphologic properties of neoplastic mast cells: delineation of stages of maturation and implication for cytological grading of mastocytosis. *Leukemia research*. 2001;25(7):529-536.

204. Valent P, Escribano L, Broesby-Olsen S, et al. Proposed diagnostic algorithm for patients with suspected mastocytosis: a proposal of the European Competence Network on Mastocytosis. *Allergy*. 2014;69(10):1267-1274.
205. Morgado JM, Sanchez-Munoz L, Teodosio CG, et al. Immunophenotyping in systemic mastocytosis diagnosis: 'CD25 positive' alone is more informative than the 'CD25 and/or CD2' WHO criterion. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc.* 2012;25(4):516-521.
206. Fried AJ, Akin C. Primary mast cell disorders in children. *Curr Allergy Asthma Rep.* 2013;13(6):693-701.
207. Bodemer C, Hermine O, Palmerini F, et al. Pediatric mastocytosis is a clonal disease associated with D816V and other activating c-KIT mutations. *The Journal of investigative dermatology.* 2010;130(3):804-815.
208. Hartmann K, Escribano L, Grattan C, et al. Cutaneous manifestations in patients with mastocytosis: Consensus report of the European Competence Network on Mastocytosis; the American Academy of Allergy, Asthma & Immunology; and the European Academy of Allergology and Clinical Immunology. *The Journal of allergy and clinical immunology.* 2015.
209. Yanagihori H, Oyama N, Nakamura K, Kaneko F. c-kit Mutations in patients with childhood-onset mastocytosis and genotype-phenotype correlation. *The Journal of molecular diagnostics : JMD.* 2005;7(2):252-257.
210. Pardanani A. Systemic mastocytosis in adults: 2013 update on diagnosis, risk stratification, and management. *American journal of hematology.* 2013;88(7):612-624.
211. Lim KH, Tefferi A, Lasho TL, et al. Systemic mastocytosis in 342 consecutive adults: survival studies and prognostic factors. *Blood.* 2009;113(23):5727-5736.
212. Bonadonna P, Perbellini O, Passalacqua G, et al. Clonal mast cell disorders in patients with systemic reactions to Hymenoptera stings and increased serum tryptase levels. *The Journal of allergy and clinical immunology.* 2009;123(3):680-686.
213. Pardanani A, Akin C, Valent P. Pathogenesis, clinical features, and treatment advances in mastocytosis. *Best practice & research Clinical haematology.* 2006;19(3):595-615.
214. Sanchez-Munoz L, Alvarez-Twose I, Garcia-Montero AC, et al. Evaluation of the WHO criteria for the classification of patients with mastocytosis. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc.* 2011;24(9):1157-1168.
215. Sotlar K, Colak S, Bache A, et al. Variable presence of KITD816V in clonal haematological non-mast cell lineage diseases associated with systemic mastocytosis (SM-AHNMD). *The Journal of pathology.* 2010;220(5):586-595.
216. Valent P, Sotlar K, Sperr WR, et al. Refined diagnostic criteria and classification of mast cell leukemia (MCL) and myelomastocytic leukemia (MML):

- a consensus proposal. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*. 2014;25(9):1691-1700.
217. Weiler CR, Butterfield J. Mast cell sarcoma: clinical management. *Immunology and allergy clinics of North America*. 2014;34(2):423-432.
218. Falletti J, Borgia L, Lalinga AV, et al. Mast cell sarcoma of the scalp: the first sign of undisclosed systemic mastocytosis? *Pathol Res Pract*. 2012;208(11):683-686.
219. Bugalia A, Abraham A, Balasubramanian P, Srivastava A, Nair S. Mast cell sarcoma of the small intestine: a case report. *Journal of clinical pathology*. 2011;64(11):1035-1037.
220. Georgin-Lavialle S, Aguilar C, Guieze R, et al. Mast cell sarcoma: a rare and aggressive entity--report of two cases and review of the literature. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2013;31(6):e90-97.
221. Alvarez-Twose I, Vano-Galvan S, Sanchez-Munoz L, et al. Increased serum baseline tryptase levels and extensive skin involvement are predictors for the severity of mast cell activation episodes in children with mastocytosis. *Allergy*. 2012;67(6):813-821.
222. Escribano L, Akin C, Castells M, Schwartz LB. Current options in the treatment of mast cell mediator-related symptoms in mastocytosis. *Inflammation & allergy drug targets*. 2006;5(1):61-77.
223. Worobec AS, Metcalfe DD. Mastocytosis: current treatment concepts. *International archives of allergy and immunology*. 2002;127(2):153-155.
224. Netzer NC, Kupper T, Voss HW, Eliasson AH. The actual role of sodium cromoglycate in the treatment of asthma--a critical review. *Sleep & breathing = Schlaf & Atmung*. 2012;16(4):1027-1032.
225. Horan RF, Sheffer AL, Austen KF. Cromolyn sodium in the management of systemic mastocytosis. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 1990;85(5):852-855.
226. Wilson TM, Metcalfe DD, Robyn J. Treatment of systemic mastocytosis. *Immunology and allergy clinics of North America*. 2006;26(3):549-573.
227. Akin C, Brockow K, D'Ambrosio C, et al. Effects of tyrosine kinase inhibitor STI571 on human mast cells bearing wild-type or mutated c-kit. *Experimental hematology*. 2003;31(8):686-692.
228. Alvarez-Twose I, Gonzalez P, Morgado JM, et al. Complete response after imatinib mesylate therapy in a patient with well-differentiated systemic mastocytosis. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2012;30(12):e126-129.
229. Frost MJ, Ferrao PT, Hughes TP, Ashman LK. Juxtamembrane mutant V560GKit is more sensitive to Imatinib (STI571) compared with wild-type c-kit whereas the kinase domain mutant D816VKit is resistant. *Mol Cancer Ther*. 2002;1(12):1115-1124.

230. Valent P, Akin C, Sperr WR, et al. Aggressive systemic mastocytosis and related mast cell disorders: current treatment options and proposed response criteria. *Leukemia research*. 2003;27(7):635-641.
231. Dubreuil P, Letard S, Ciufolini M, et al. Masitinib (AB1010), a potent and selective tyrosine kinase inhibitor targeting KIT. *PLoS one*. 2009;4(9):e7258.
232. Gleixner KV, Mayerhofer M, Sonneck K, et al. Synergistic growth-inhibitory effects of two tyrosine kinase inhibitors, dasatinib and PKC412, on neoplastic mast cells expressing the D816V-mutated oncogenic variant of KIT. *Haematologica*. 2007;92(11):1451-1459.
233. Lindauer M, Hochhaus A. Dasatinib. *Recent results in cancer research Fortschritte der Krebsforschung Progres dans les recherches sur le cancer*. 2014;201:27-65.
234. Arock M, Akin C, Hermine O, Valent P. Current treatment options in patients with mastocytosis: status in 2015 and future perspectives. *European journal of haematology*. 2015;94(6):474-490.
235. Jin Y, Ding K, Wang D, Shen M, Pan J. Novel thiazole amine class tyrosine kinase inhibitors induce apoptosis in human mast cells expressing D816V KIT mutation. *Cancer Lett*. 2014;353(1):115-123.
236. Corbin AS, Griswold IJ, La Rosee P, et al. Sensitivity of oncogenic KIT mutants to the kinase inhibitors MLN518 and PD180970. *Blood*. 2004;104(12):3754-3757.
237. Kosmider O, Denis N, Dubreuil P, Moreau-Gachelin F. Semaxinib (SU5416) as a therapeutic agent targeting oncogenic Kit mutants resistant to imatinib mesylate. *Oncogene*. 2007;26(26):3904-3908.
238. Pan J, Quintas-Cardama A, Kantarjian HM, et al. EXEL-0862, a novel tyrosine kinase inhibitor, induces apoptosis in vitro and ex vivo in human mast cells expressing the KIT D816V mutation. *Blood*. 2007;109(1):315-322.
239. Erica K. Evans BLH, Alexandra Gardino, Julia Zhu, Adam Shutes, Alison Davis, Joseph Kim, Kevin Wilson, Doug Wilson, Yulian Zhang, Nancy E. Kohl, Timothy Guzi, and Christoph Lengauer. First Selective KIT D816V Inhibitor for Patients with Systemic Mastocytosis. In: Exposition tAAMa ed. San Francisco; 2014.
240. Valent P, Cerny-Reiterer S, Herrmann H, et al. Phenotypic heterogeneity, novel diagnostic markers, and target expression profiles in normal and neoplastic human mast cells. *Best practice & research Clinical haematology*. 2010;23(3):369-378.
241. Morgado JM, Perbellini O, Johnson RC, et al. CD30 expression by bone marrow mast cells from different diagnostic variants of systemic mastocytosis. *Histopathology*. 2013;63(6):780-787.
242. van Anrooij B, Kluin PM, Oude Elberink JN, Kluin-Nelemans JC. CD30 in systemic mastocytosis. *Immunology and allergy clinics of North America*. 2014;34(2):341-355.

243. Hoermann G, Blatt K, Greiner G, et al. CD52 is a molecular target in advanced systemic mastocytosis. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2014;28(8):3540-3551.
244. Krauth MT, Bohm A, Agis H, et al. Effects of the CD33-targeted drug gemtuzumab ozogamicin (Mylotarg) on growth and mediator secretion in human mast cells and blood basophils. *Experimental hematology*. 2007;35(1):108-116.
245. Kristensen T, Vestergaard H, Bindslev-Jensen C, Moller MB, Broesby-Olsen S. Sensitive KIT D816V mutation analysis of blood as a diagnostic test in mastocytosis. *Am J Hematol*. 2014;89(5):493-498.
246. Metcalfe DD, Akin C. Mastocytosis: molecular mechanisms and clinical disease heterogeneity. *Leukemia research*. 2001;25(7):577-582.
247. Gotlib J, Pardanani A, Akin C, et al. International Working Group-Myeloproliferative Neoplasms Research and Treatment (IWG-MRT) & European Competence Network on Mastocytosis (ECNM) consensus response criteria in advanced systemic mastocytosis. *Blood*. 2013;121(13):2393-2401.
248. Yavuz AS, Lipsky PE, Yavuz S, Metcalfe DD, Akin C. Evidence for the involvement of a hematopoietic progenitor cell in systemic mastocytosis from single-cell analysis of mutations in the c-kit gene. *Blood*. 2002;100(2):661-665.
249. Taylor ML, Sehgal D, Raffeld M, et al. Demonstration that mast cells, T cells, and B cells bearing the activating kit mutation D816V occur in clusters within the marrow of patients with mastocytosis. *The Journal of molecular diagnostics : JMD*. 2004;6(4):335-342.
250. Elias HK, Schinke C, Bhattacharyya S, Will B, Verma A, Steidl U. Stem cell origin of myelodysplastic syndromes. *Oncogene*. 2014;33(44):5139-5150.
251. Nilsson L, Eden P, Olsson E, et al. The molecular signature of MDS stem cells supports a stem-cell origin of 5q myelodysplastic syndromes. *Blood*. 2007;110(8):3005-3014.
252. Tsukamoto N, Morita K, Maehara T, et al. Clonality in myelodysplastic syndromes: demonstration of pluripotent stem cell origin using X-linked restriction fragment length polymorphisms. *British journal of haematology*. 1993;83(4):589-594.
253. Edwards RH, Wasik MA, Finan J, et al. Evidence for early hematopoietic progenitor cell involvement in acute promyelocytic leukemia. *American journal of clinical pathology*. 1999;112(6):819-827.
254. Haase D, Feuring-Buske M, Konemann S, et al. Evidence for malignant transformation in acute myeloid leukemia at the level of early hematopoietic stem cells by cytogenetic analysis of CD34+ subpopulations. *Blood*. 1995;86(8):2906-2912.
255. Valent P, Horny HP, Escribano L, et al. Diagnostic criteria and classification of mastocytosis: a consensus proposal. *Leukemia research*. 2001;25(7):603-625.

256. Fritsche-Polanz R, Jordan JH, Feix A, et al. Mutation analysis of C-KIT in patients with myelodysplastic syndromes without mastocytosis and cases of systemic mastocytosis. *British journal of haematology*. 2001;113(2):357-364.
257. Pullarkat VA, Bueso-Ramos C, Lai R, et al. Systemic mastocytosis with associated clonal hematological non-mast-cell lineage disease: analysis of clinicopathologic features and activating c-kit mutations. *American journal of hematology*. 2003;73(1):12-17.
258. Pardanani A, Reeder TL, Kimlinger TK, et al. Flt-3 and c-kit mutation studies in a spectrum of chronic myeloid disorders including systemic mast cell disease. *Leukemia research*. 2003;27(8):739-742.
259. Escribano L, Garca-Montero A, Nunez-Lopez R, et al. Systemic mastocytosis associated with acute myeloid leukemia: case report and implications for disease pathogenesis. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2004;114(1):28-33.
260. Jordan JH, Fritsche-Polanz R, Sperr WR, et al. A case of 'smouldering' mastocytosis with high mast cell burden, monoclonal myeloid cells, and C-KIT mutation Asp-816-Val. *Leukemia research*. 2001;25(7):627-634.
261. Worobec AS, Semere T, Nagata H, Metcalfe DD. Clinical correlates of the Asp816Val c-kit mutation in the peripheral blood mononuclear cells of patients with mastocytosis. *Cancer*. 1998;83(10):2120-2129.
262. Horny HP, Sotlar K, Sperr WR, Valent P. Systemic mastocytosis with associated clonal haematological non-mast cell lineage diseases: a histopathological challenge. *Journal of clinical pathology*. 2004;57(6):604-608.
263. Valent P, Akin C, Sperr WR, et al. Mastocytosis: pathology, genetics, and current options for therapy. *Leukemia & lymphoma*. 2005;46(1):35-48.
264. Tefferi A, Lasho TL, Brockman SR, Elliott MA, Dispenzieri A, Pardanani A. FIP1L1-PDGFR α and c-kit D816V mutation-based clonality studies in systemic mast cell disease associated with eosinophilia. *Haematologica*. 2004;89(7):871-873.
265. Teodosio C, Garcia-Montero AC, Jara-Acevedo M, et al. Mast cells from different molecular and prognostic subtypes of systemic mastocytosis display distinct immunophenotypes. *J Allergy Clin Immunol*. 2010;125(3):719-726.
266. Hoermann G, Gleixner KV, Dinu GE, et al. The KIT D816V allele burden predicts survival in patients with mastocytosis and correlates with the WHO type of the disease. *Allergy*. 2014;69(6):810-813.
267. Erben P, Schwaab J, Metzgeroth G, et al. The KIT D816V expressed allele burden for diagnosis and disease monitoring of systemic mastocytosis. *Ann Hematol*. 2014;93(1):81-88.
268. Kristensen T, Broesby-Olsen S, Vestergaard H, Bindslev-Jensen C, Moller MB. Circulating KIT D816V mutation-positive non-mast cells in peripheral blood are characteristic of indolent systemic mastocytosis. *Eur J Haematol*. 2012;89(1):42-46.

269. Akin C. Clonality and molecular pathogenesis of mastocytosis. *Acta Haematol.* 2005;114(1):61-69.
270. Garcia-Montero AC, Jara-Acevedo M, Teodosio C, et al. KIT mutation in mast cells and other bone marrow hematopoietic cell lineages in systemic mast cell disorders: a prospective study of the Spanish Network on Mastocytosis (REMA) in a series of 113 patients. *Blood.* 2006;108(7):2366-2372.
271. Pardanani A, Reeder T, Li CY, Tefferi A. Eosinophils are derived from the neoplastic clone in patients with systemic mastocytosis and eosinophilia. *Leuk Res.* 2003;27(10):883-885.
272. Chen GL, Prchal JT. X-linked clonality testing: interpretation and limitations. *Blood.* 2007;110(5):1411-1419.
273. Prchal JT, Prchal JF, Belickova M, et al. Clonal stability of blood cell lineages indicated by X-chromosomal transcriptional polymorphism. *The Journal of experimental medicine.* 1996;183(2):561-567.
274. Ohhata T, Wutz A. Reactivation of the inactive X chromosome in development and reprogramming. *Cellular and molecular life sciences : CMLS.* 2013;70(14):2443-2461.
275. Brown C.J WHF. Molecular and genetic studies of human X chromosome inactivation. In: P.M W ed. *Advances in developmental biology.* Vol. 2: Hampton Hill, JAI Press Inc; 1993:37-72.
276. Broesby-Olsen S, Kristensen TK, Moller MB, Bindslev-Jensen C, Vestergaard H. Adult-onset systemic mastocytosis in monozygotic twins with KIT D816V and JAK2 V617F mutations. *The Journal of allergy and clinical immunology.* 2012;130(3):806-808.
277. Whitelaw DM. Observations on human monocyte kinetics after pulse labeling. *Cell Tissue Kinet.* 1972;5(4):311-317.
278. Koeffler HP, Gale RP, Golde DW. Myeloid colony-forming cell kinetics in man. *Experimental hematology.* 1980;8(3):271-277.
279. Alexanian R, Donohue DM. Neutrophilic granulocyte kinetics in normal man. *J Appl Physiol.* 1965;20(4):803-808.
280. Perry S, Craddock CG, Jr., Paul G, Lawrence JS. Lymphocyte production and turnover. *AMA Arch Intern Med.* 1959;103(2):224-230.
281. Gerbault A, Wickenhauser C, Scholten J, et al. Mast cell hyperplasia, B-cell malignancy, and intestinal inflammation in mice with conditional expression of a constitutively active kit. *Blood.* 2011;117(6):2012-2021.
282. Soucie E, Hanssens K, Mercher T, et al. In aggressive forms of mastocytosis, TET2 loss cooperates with c-KITD816V to transform mast cells. *Blood.* 2012;120(24):4846-4849.
283. Muniz C, Teodosio C, Mayado A, et al. Ex vivo identification and characterization of a population of CD13(high) CD105(+) CD45(-) mesenchymal stem cells in human bone marrow. *Stem cell research & therapy.* 2015;6:169.

284. Nemeth K, Wilson TM, Ren JJ, et al. Impaired function of bone marrow stromal cells in systemic mastocytosis. *Stem Cell Res.* 2015;15(1):42-53.
285. Schwaab J, Schnittger S, Sotlar K, et al. Comprehensive mutational profiling in advanced systemic mastocytosis. *Blood.* 2013;122(14):2460-2466.
286. Teodosio C, Garcia-Montero AC, Jara-Acevedo M, et al. Gene expression profile of highly purified bone marrow mast cells in systemic mastocytosis. *The Journal of allergy and clinical immunology.* 2013;131(4):1213-1224, 1224 e1211-1214.
287. Baldus SE, Zirbes TK, Thiele J, Eming SA, Henz BM, Hartmann K. Altered apoptosis and cell cycling of mast cells in bone marrow lesions of patients with systemic mastocytosis. *Haematologica.* 2004;89(12):1525-1527.