

Aus dem Institut für Pathologie und Neuropathologie der Universität
Tübingen

Abteilung Allgemeine Pathologie und Molekulare Pathologie und
Pathologische Anatomie

Ärztlicher Direktor: Hr. Prof. Dr. med. Falko Fend

**Etablierung der *MYD88*-L265P Mutationsanalyse mittels
Schmelzpunktanalyse am FFPE-Material
lymphoplasmozytischer Lymphome**

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

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

vorgelegt von

Natalie Martina Schindler

2020

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professorin Dr. L. Quintanilla Martinez de Fend

2. Berichterstatter: Professorin Dr. J. Skokowa, Ph.D

Tag der Disputation: 01.10.2020

1 Inhaltsverzeichnis

1 Inhaltsverzeichnis	I
2 Abbildungsverzeichnis	V
3 Tabellenverzeichnis	VI
4 Abkürzungsverzeichnis	VII
5 Einleitung	1
5.1 Lymphoplasmozytisches Lymphom/ Waldenström	
Macroglobulinämie	1
5.1.1 Epidemiologie.....	2
5.1.2 Pathologie	3
5.1.2.1 Morphologie.....	3
5.1.2.2 Immunphänotyp und zytogenetische Veränderungen	4
5.1.3 Pathogenese des LPL.....	4
5.1.3.1 Normale B-Zellreifung.....	4
5.1.3.2 Ursprungszellen des LPL	5
5.1.3.3 Somatische Mutationen beim LPL.....	6
5.1.3.4 Übergang IgM-MGUS zur WM.....	7
5.1.4 Klinische Präsentation.....	8
5.1.5 Diagnostik.....	9
5.1.6 Differentialdiagnose.....	10
5.1.6.1 Marginalzonenlymphom (MZL).....	10
5.1.6.2 Chronisch lymphatische Leukämie.....	12
5.1.6.3 Multiples Myelom.....	14
5.1.7 Therapeutische Möglichkeiten und Prognose	14
5.2 Myeloid Differentiation Primary Response Gene 88 (MYD88)	18
5.2.1 MYD88-Signalwege.....	18
5.2.2 MYD88-L265P Mutation.....	21
5.2.3 MYD88-L265P Mutation bei Patienten mit LPL.....	22

Inhaltsverzeichnis

5.2.4 Klinisch-therapeutische Relevanz der <i>MYD88</i> -L265P Mutation in der Behandlung der WM	24
5.2.5 <i>MYD88</i> Wildtypstatus bei Patienten mit WM	25
5.2.6 <i>MYD88</i> -L265P Mutation bei Patienten mit anderen NHL und IgM-MGUS und deren klinische Bedeutung	27
5.3 Aktuelle Methoden zur <i>MYD88</i>-L265P Mutationsanalyse.....	28
5.3.1 Nachweismethoden der <i>MYD88</i> -L265P Mutation.....	28
5.3.1.1 Sanger-Sequenzierung.....	28
5.3.1.2 Allel-spezifische PCR (AS-PCR).....	29
5.3.1.3 Mutationsanalyse mittels Schmelzpunktanalyse.....	29
5.4 Zielsetzung der Arbeit.....	30
6 Material und Methoden.....	33
6.1 Material.....	33
6.1.1 Patientenproben im Studienkollektiv.....	33
6.1.2 Verzeichnis der verwendeten Reagenzien und Geräte.....	33
6.2 Methoden.....	36
6.2.1 Extraktion und Aufreinigung der DNA aus FFPE-Gewebe.....	36
6.2.2 PCR zur Analyse der Amplifizierbarkeit der DNA.....	38
6.2.3 Agarose Gelelektrophorese.....	39
6.2.4 <i>MYD88</i> -Mutationsanalyse mittels Schmelzpunktanalyse und LNA-basierter Wildtypsuppression.....	40
7 Ergebnisse.....	45
7.1 Zusammensetzung des Studienkollektivs.....	45
7.1.1 Änderung des Studienkollektivs nach erneuter diagnostischer Begutachtung.....	45
7.1.2 Tumorinfiltrationsgehalt der in die Studie eingeschlossenen NHL. .	46
7.2 Amplifizierbarkeit der aus FFPE-Gewebe extrahierten DNA	47
7.3 <i>MYD88</i>-Mutationsanalyse mittels Schmelzpunktanalyse und LNA-basierter Wildtypsuppression.....	50

Inhaltsverzeichnis

7.3.1 Ergebnisse der Patientenproben mit LPL.....	51
7.3.2 Ergebnisse der Patientenproben aus den Kontrollkollektiven.....	53
7.3.2.1 Ergebnisse der Patientenproben mit B-CLL.....	54
7.3.2.2 Ergebnisse der Patientenproben mit MZL.....	54
7.3.2.3 Ergebnisse der Patientenproben mit MM.....	55
7.4 Zusammenfassung der Ergebnisse nach der <i>MYD88</i>-	
Mutationsanalyse mittels Schmelzpunktanalyse.....	56
7.5 Beurteilung der retrospektiven Analyse von Knochenmark FFPE-	
Material.....	57
7.6 Bestimmung des Tumordinfiltrationsgehaltes bis zu dem ein sicherer	
Mutationsnachweis mittels Schmelzpunktanalyse möglich ist.....	57
8 Diskussion.....	59
8.1 Retrospektive Mutationsanalyse mittels FFPE-Knochenmark.....	59
8.1.1 Qualitative Eignung von FFPE-Gewebe zur Mutationsanalyse.....	59
8.1.2 Vergleich von FFPE-Gewebe mit anderen Materialien.....	60
8.2 Schmelzpunktanalyse mittels LightCycler als Möglichkeit zur	
Detektion der <i>MYD88-L265P</i> Mutation.....	61
8.2.1 Nachweisgrenzen durch geringen Tumordinfiltrationsanteil der	
Proben.....	61
8.2.2 Mutationsanalyse mittels Schmelzpunktanalyse als Möglichkeit zum	
Nachweis der <i>MYD88-L265P</i> Mutation bei verschiedenen Tumorentitäten	
.....	63
8.2.2.1 Mutationsanalyse beim LPL.....	64
8.2.2.2 Mutationsanalyse bei der B-CLL.....	64
8.2.2.3 Mutationsanalyse beim MZL.....	65
8.3 Nachweismethoden der <i>MYD88-L265P</i> Mutation.....	65
8.3.1 Sequenzierung.....	66
8.3.2 AS-PCR.....	67
8.3.3 ASO-PCR.....	68

Inhaltsverzeichnis

8.3.4 Vergleich der Nachweismethoden.....	68
8.4 Einsatz der <i>MYD88</i>-L265P Mutationsanalyse als diagnostisches Tool	70
8.4.1 Differentialdiagnostische Möglichkeiten durch den <i>MYD88</i> -L265P Mutationsnachweis.....	70
8.4.2 <i>MYD88</i> -L265P im Rahmen der Diagnostik der IgM-MGUS und dem Übergang zur WM.....	72
8.5 Perspektiven	74
9 Zusammenfassung.....	77
10 Quellenverzeichnis.....	79
11 Ehrenwörtliche Erklärung	100
12 Veröffentlichungen	101
13 Danksagung	102

2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung des MYD88 Signalwegs.....	20
Abbildung 2: Exemplarischer Schmelzpunktverlauf von sechs Patientenproben.	30
Abbildung 3: Übersicht der Infiltrationsgehalte der Proben der einzelnen Tumorentitäten.....	47
Abbildung 4: Exemplarische Darstellung einer Agarose-Gelelektrophorese nach der PCR zur Analyse der Amplifizierbarkeit der DNA.	48
Abbildung 5: Ergebnis der Produktlängenbestimmung mittels Gelelektrophorese nach der PCR-Amplifikation für alle Tumorentitäten.	48
Abbildung 6: Darstellung der maximal amplifizierbaren Fragmentlängen nach der PCR sowie Gelelektrophorese.....	49
Abbildung 7: Beispiel einer durchgeführten Schmelzpunktanalyse mittels LightCycler 480.	51
Abbildung 8: Graphische Darstellung der Ergebnisse der MYD88- Schmelzpunktanalyse.....	56

3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: International scoring system for Waldenström's macroglobulinemia (ISSWM)	17
Tabelle 2: Tabellarische Darstellung des PCR-Protokolls.....	39
Tabelle 3: PCR- Programm zur Analyse der Amplifizierbarkeit der DNA.....	39
Tabelle 4: 20 µl- Ansatz Schmelzpunktanalyse (ohne LNA-Oligomer).....	43
Tabelle 5: 20 µl- Protokoll Schmelzpunktanalyse (mit LNA-Oligomer am Beispiel der LNA-Konzentration 0,1 µM).....	43
Tabelle 6: LightCycler Programm „HypProbe MYD88“.....	44
Tabelle 7: Verteilung der der Tumorentitäten.	45
Tabelle 8: Anzahl der jeweiligen Tumorentitäten LPL, B-CLL, MZL, MM am Gesamtkollektiv nach erneuter histopathologischer Begutachtung und Mutationsanalyse.	46
Tabelle 9: Auflistung der aus dem LPL-Kollektiv verwendeten Patientenproben.....	52
Tabelle 10: Fallübersicht der B-CLL-Proben.	54
Tabelle 11: Darstellung der Schmelzpunktanalyseergebnisse der Patientenproben mit MZL.	55
Tabelle 12: Übersicht der Ergebnisse der Patientenproben mit MM.	55

4 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
<	kleiner als
>	größer als
%	Prozentualer Volumen-/Mengenanteil bezogen auf das Gesamtvolumen
-6q	Deletion am langen Arm des Chromosom 6
A	Adenosin
ABC-DLBCL	diffuses großzelliges B-Zell Lymphom vom aktivierten B-Zell-Typ
AKT	Proteinkinase B, Serin-Theronin spezifische Proteinkinase
anc.	anchor
ARID1A	AT-rich interactive domain-containing protein 1A
ARMS	Amplification refractory mutation system
AS-PCR	Allel-spezifische Polymerasekettenreaktion
ASO	Allel-spezifisches Oligonukleotid
ATM	Ataxia telangiectasia mutated (Serin-Proteinkinase)
B-CLL	Chronisch-lymphatische Leukämie der B-Zellreihe
BIRC3	Baculoviral IAP Repeat Containing 3
BTK	Bruton's tyrosine kinase
BCL2	B-cell lymphoma 2, Suppressor der Apoptose
bp	Basenpaar
ca.	circa
CD	Cluster of differentiation
C	Cytosin
conc.	Konzentration
CRP	C-reaktives Protein

Abkürzungsverzeichnis

CXCL12	CXC-Motiv-Chemokin 12
CXCR4	CXC-Motiv-Chemokinrezeptor Typ 4
dl	Deziliter
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
ddNTP	Didesoxyribonukleotidtriphosphat
ddH ₂ O	destilliertes Wasser
EMZL	extranodales Marginalzonenlymphom
ERK1/2	extracellular signal-regulated kinases 1/2
FISH	Floureszenz-in-situ-Hybridisierung
FMC7	Fast migrating cerebrosid 7
FFPE	In Paraffin eingebettete und in Formalin fixierte Proben
FRET	Floureszenz-Resonanz-Energie-Transfer
g	Gramm
G	Guanin
h	Stunde
Hb-Wert	Hämoglobin-Wert
HCK	hemtopoietic cell kinase
HE-Färbung	Hämatoxylin und Eosin Färbung
HybProbes	Hybridization Probes / Hybridisierungssonden
Ig	Immunglobulin
ISSWM	International Prognostic Scoring System for Waldenström macroglobulinemia
IL	Interleukin
ILR	Interleukin-Rezeptor
INF- β	Interferon β
IRAK	Interleukin-1 receptor-associated kinase
I κ B α	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha

Abkürzungsverzeichnis

IGHV	Schwere Kette des Immunoglobulin Gens
IAA	Isoamylalkohol
JAK	Janus-Kinase
JAK-STAT3	Janus kinase-signal transducer and activator of transcription 3
Ki67	Kiel-67
kl.	klein
KLF2	Kruppel-like factor 2
KM	Knochenmark
LPL	Lymphoplasmozytisches Lymphom
LDH	Laktatdehydrogenase
l	Liter
IkBa	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha
LDH	Laktatdehydrogenase
LEF1	lymphocyte enhancer-binding factor 1
LNA	locked nucleic acid
M	Mol (Maßeinheit)
MAG	Myelin-assoziiertes-Glycoprotein
MALT	Mucosa-associated lymphoid tissue
MAP-Kinase	mitogen activated protein Kinase
MGUS	Monoklonale Gammopathie unklarer Signifikanz
MM	Multiples Myelom
mTOR	mechanistic Target of Rapamycin
MYD88	Myeloid Differentiation Primary Response Gene 8
MYD88-L265P	Punktmutation im <i>MYD88</i> an der Aminosäurenstelle 265 mit Austausch von Leucin zu Prolin auf Proteinebene
MZL	Marginalzonenlymphom
m	Milli- (Maßeinheit)

Abkürzungsverzeichnis

μ	Mikro- (Maßeinheit)
min	Minute
mut.	Mutation
n	Nano (Maßeinheit)
NGS	Next Generation Sequencing
NHL	Non-Hodgin-Lymphom
NF-κB	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
NOTCH1/2	notch receptor 1/2
NMZL	nodales Marginalzonenlymphom
NS	non sense
p50 und p65	Bestanteile von NF-κB
PCR	Polymerasekettenreaktion
PCI	Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol
PAX5	Paired Box 5, Proteinkodierendes Gen
pH	Maß für den sauren oder basischen Charakter einer wässrigen Lösung
PI3K	Phosphatidyl-Inositol-Triphosphat Kinase
PKC	Proteinkinase C
q	Deletion am langen Arm des Chromosoms
REAL-Klassifikation	Revised European-American-Lymphoma-Klassifikation
rpm	Umdrehungen pro Minute
s	Sekunde
SF3B1	Splicing factor 3B subunit 1
SHM	Somatische Hypermutation
SMZL	splenisches Marginalzonen Lymphom
STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3
T	Thymin
Taq	Thermophilus aquaticus

Abkürzungsverzeichnis

TBE-Puffer	TRIS-Borat-EDTA-Puffer
TE-Puffer	Tris-EDTA-Puffer
TIR- Domäne	Toll/II1-Rezeptor-Domäne
TIRAP	TIR domain containing adaptor Protein
TNF	Tumornekrosefaktor
TLR	Toll-like-receptor
TP53	Tumorsuppressorgen 53
TRAF 6	tumor necrosis factor receptor-associated factor 6
UV- Licht	Ultraviolettlicht
WHIM-Syndrom	Warzen-Hypogammaglobulinämie-Immundefizienz- Myelokathexis-Syndrom
WHO	World Health Organization
WM	Waldenström Makroglobulinämie
WT	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem

5 Einleitung

5.1 Lymphoplasmozytisches Lymphom/ Waldenström Macroglobulinämie

Malignome des lymphatischen Systems werden Lymphome genannt. Lymphome lassen sich in Hodgkin-Lymphome und Non-Hodgkin-Lymphome (NHL) einteilen. Die NHL teilen sich wiederum in B- und T-Zell-Lymphome. Zudem lassen sie sich in aggressive und niedrig maligne Lymphome einteilen. Niedrig maligne Lymphome, oder auch indolente Lymphome genannt, haben eine geringere Proliferationsrate als die aggressiven Lymphome und wachsen somit langsamer. Die maligne Entartung der B-Zell-Lymphome kann in verschiedenen Stadien der B-Zellreifung stattfinden (Herold, 2012). Lymphome werden nach dem Klassifikationssystem der WHO nach Morphologie, Zytogenetik, Immunophänotypologie, klinischer Symptomatik, Differentialdiagnose, Therapie und Prognose eingeteilt (Swerdlow et al., 2017).

Das Lymphoplasmozytische Lymphom (LPL) ist eine maligne lymphoplasmoproliferative Erkrankung. Insbesondere im Knochenmark, aber teilweise auch in den peripheren Lymphknoten von erkrankten Patienten, finden sich Zellen aus der B-Zelllinie, die sich in unterschiedlichen Reifestadien befinden. Beim LPL finden sich vor allem kleine Lymphozyten, lymphoplasmazytoide Zellen sowie Plasmazellen (Treon et al., 2005). Das LPL ist ein niedrig malignes oder indolentes B-Zell-Lymphom (Vitolo et al., 2008). Das LPL kann, wie auch andere maligne Entartungen von B-Zellen, unabhängig von der normalen Immunglobulinproduktion, zu einer vermehrten Produktion eines speziellen Immunglobulins führen, welche im Serum nachgewiesen werden kann. Eine solche Erhöhung eines spezifischen Immunglobulins, bedingt durch Tumorzellen, wird als Paraproteinämie

Einleitung

bezeichnet. Diese Antikörper sind beim LPL meistens monoklonale Antikörper vom Immunglobulin-Typ M (IgM) (Swerdlow et al., 2017). Es gibt jedoch auch LPL mit einer monoklonalen Gammopathie mit IgG oder IgA Antikörpern und auch nicht-sekretierende LPL (Xu et al., 2013). Der Morbus Waldenström, oder auch Waldenström Macroglobulinämie (WM) genannt, ist nach der WHO-Klassifikation eine klinisch-pathologische Diagnose, bei der eine Knochenmarkinfiltration eines LPL (von mindestens 10%) sowie eine monoklonale IgM-Gammopathie vorliegen (Swerdlow et al., 2017).

5.1.1 Epidemiologie

Mit einem Anteil von 1-3% der hämatologischen Tumoren ist das LPL eine seltene Tumorentität. Die Inzidenz liegt bei ca. drei pro eine Million Einwohner und Jahr (in den USA), wobei die weiße Bevölkerung häufiger betroffen ist als die schwarze. In der Geschlechterverteilung der Erkrankten liegt eine männliche Prädominanz vor (Inzidenz der Männer in den USA: 3,4 pro eine Million Einwohner und Jahr, Inzidenz der Frauen in den USA: 1,7 pro eine Million Einwohner und Jahr) (Campo et al., 2011; Wang et al., 2012). In einer südenglischen Studie wurde die Inzidenz der europäischen Bevölkerung ermittelt. Dabei betrug die Inzidenz bei Männern 7,3 pro eine Million Einwohner und Jahr und bei Frauen 4,2 pro eine Million Einwohner und Jahr (Phekoo et al., 2008). Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei ca. 70 Jahren (Castillo et al., 2015). In den letzten beiden Jahrzehnten haben sich die Überlebensraten der Patienten mit WM verbessert (Castillo et al., 2016; Castillo et al., 2015). Die mittlere Lebensdauer von Patienten mit WM beträgt ca. 10 Jahre (Campo et al., 2011; Rossi et al., 2014). Normalerweise gilt die WM als eine sporadisch auftretende Erkrankung (Vijay and Gertz, 2007). Patienten mit positiver Familienanamnese hinsichtlich B-Zell-Erkrankungen (WM oder andere Lymphome) haben jedoch eine höhere Wahrscheinlichkeit an einer WM (20-fach erhöhtes Risiko) oder einem anderen NHL (3- bis 5-fach erhöhtes Risiko)

Einleitung

zu erkranken (Kristinsson et al., 2008). Patienten mit positiver Familienanamnese erkranken häufig früher und sie haben eine stärkere Knochenmarkinfiltration. Zudem ist das Therapieansprechen geringer, die Krankheitsprogression rascher und die Mortalität ist um das 1,3-fache höher im Vergleich zu WM Patienten mit sporadisch auftretender Erkrankung (Treon et al., 2012a; Steingrimsdottir et al., 2015).

5.1.2 Pathologie

5.1.2.1 Morphologie

Beim LPL infiltrieren Zellen verschiedener Reifestadien aus der B-Zell-Reihe, wie z.B. kleine Lymphozyten, Plasmazellen und lymphoplasmazytoide Zellen, das Knochenmark und andere lymphatische Organe, wie beispielsweise die Lymphknoten oder die Milz (Abbildung 1). Lymphoplasmazytoide Zellen enthalten den Lymphozyten ähnliche Nuclei sowie viel basophiles Zytoplasma. Die Lymphozyten sind klein, haben hyperchromatische Kerne mit dichtem Chromatin und einen schmalen Zytoplasmasaum (Bassarova et al., 2015). Die Plasmazellen sind reif und enthalten selten Russel Körperchen (zytoplasmatische Globuli) sowie Dutcher Körperchen (PAS-positiv intranukleäre Pseudoeinschlüsse). Das Wachstumsmuster in Lymphknoten ist häufig interfollikulär und spart die Sinus' aus (Vitolo et al., 2008). Im Knochenmark liegt häufig ein intertrabekuläres Wachstumsmuster vor. Die Mastzellzahl im Tumorgewebe ist deutlich erhöht (Campo et al., 2011; Tournilhac et al., 2006; Vijay and Gertz, 2007). Beim LPL liegt häufig ein Begleitinfiltrat mit Cluster of differentiation 70 positiven (CD70⁺) Mastzellen vor. CD70 interagiert mit CD27, wodurch die Mastzellen stimuliert werden. Durch eine nachfolgende Signalkaskade kommt es zur Produktion von Tumornekrose-Faktor(TNF)-Proteinen, welche die WM-Zellen stimulieren (Fonseca et al., 2007; Ho et al., 2008).

5.1.2.2 Immunphänotyp und zytogenetische Veränderungen

In der Durchflusszytometrie und Immunhistochemie kann der Immunphänotyp der Zellen bestimmt werden. Dabei werden die Oberflächenmarker, die CD-Antigene, analysiert. Das typische Expressionsmuster von Tumorzellen des LPL weist die oberflächlichen B-Zell-Marker wie CD19, CD20 und CD22 sowie ein Immunglobulin (v.a. IgM) auf. Darüber hinaus exprimieren die meisten Zellen des LPL die Oberflächenmarker CD25, CD27, FMC7 (Fast migrating cerebrosid 7). Die Antigene CD10, CD23, CD103 und CD108 werden üblicherweise nicht exprimiert. Ebenso werden die Plasmazell-Oberflächenmarker CD38 und CD138 nur von wenigen Zellen des LPL exprimiert (Swerdlow et al., 2017). Von den meisten Zellen des LPL wird das Immunglobulin IgM produziert. Eine geringe Anzahl von LPL (< 5%) sekretieren IgG, IgA oder überhaupt kein Immunglobulin (Xu et al., 2013). Beim LPL kann in ca. 50% der Fälle eine Deletion 6q22-22.1 (Deletion am langen Arm des Chromosoms 6) detektiert werden (Schop et al., 2006; Treon et al., 2006b). Es wird vermutet, dass die Deletion 6q beim Übergang von der Monoklonalen Gammopathie unklarer Signifikanz vom Typ IgM (IgM-MGUS) zur WM eine Rolle spielt (Paiva et al., 2015; Hunter et al., 2014). Der prognostische Einfluss der Deletion 6q ist in der Literatur umstritten (Mazzucchelli et al., 2018). Weitere Chromosomenaberrationen sind beispielsweise die Deletion 13q14, 17p, 11q und Trisomien der Chromosomen 4, 12 und 18 (Nguyen-Khac et al., 2013; Rivera et al., 2002).

5.1.3 Pathogenese des LPL

5.1.3.1 Normale B-Zellreifung

Die B-Zellreifung umfasst den Entwicklungsprozess von der Stammzelle hin zur reifen B-Zelle, welcher durch zahlreiche Transkriptionsfaktoren reguliert wird. Im Knochenmark entwickelt sich aus der Stammzelle über die pro-B-Zelle die prä-

Einleitung

B-Zelle und schließlich die naive B-Zelle. Während dieses Reifungsprozesses kommt es zu Umlagerungen der Gensegmente der schweren und leichten Ketten der Immunglobuline (V(D)J-Rekombination). Durch die Kombination der schweren und leichten Kette der Immunglobuline entsteht schließlich eine unreife B-Zelle mit IgM-Expression. Diese unreifen B-Zellen werden als naive B-Zellen in lymphatisches Gewebe wie z.B. Lymphknoten und die Milz transportiert (Growkova et al., 2017; Perez-Andres et al., 2010). Im Keimzentrum kommen die naiven B-Zellen in Kontakt mit ihrem Antigen. Dieser Kontakt wird durch T-Helfer-Zellen vermittelt (Monteiro et al., 2005). Im Keimzentrum finden zwei weitere Prozesse statt: die somatische Hypermutation und der Immunglobulin Klassenwechsel. Bei der somatischen Hypermutation kommt es zu Punktmutationen in den Genen der Immunglobuline. Dadurch wird die Passung des Antikörpers zum Antigen noch weiter verbessert. Bei dem Klassenwechsel kommt es zum Wechsel in der Antikörperproduktion. Anstatt IgM werden IgG, IgA oder IgD Antikörper produziert (Growkova et al., 2017).

5.1.3.2 Ursprungszellen des LPL

Bei den B-Zell Neoplasien kommt es während der B-Zellentwicklung zu Mutationen in verschiedenen Genen der B-Zelle und somit zur Malignitätsentwicklung. Die Zellen des LPL sind B-Zellen verschiedener Reifestadien (Growkova et al., 2017). Durch die morphologische Heterogenität ist anzunehmend, dass es verschiedene Möglichkeiten der Vorläuferzellen des LPL gibt wie z.B. die CD27⁺/IgM⁺ Gedächtniszellen oder CD20⁺/IgM⁺/IgD⁺ post-Keimzentrumszellen (Janz, 2013, Growkova et al., 2017). Die klonalen Lymphozyten haben einen charakteristischen Immunphänotypus CD25⁺/CD22^{low}, IgM⁺, CD5⁻/CD10⁻ (Growkova et al., 2017). Darüber hinaus liegen bei den meisten Patienten mit LPL auch CD38⁺/CD138⁺ Plasmazellen, die keine typischen B-Zellantigene aufweisen, vor (Growkova et al., 2017; Barakat et al. 2011). Die Plasmazellen beim LPL haben den Immunglobulin Klassenwechsel, der im späten Stadium der Plasmazelldifferenzierung im

Einleitung

Keimzentrum stattfindet, nicht durchlaufen (Growkova et al., 2017). Das Vorhandensein der somatischen Hypermutation und das Vorhandensein von CD27⁺ Zellen bei den Tumorzellen des LPL schließt die B-Gedächtniszelle als möglichen Ursprung mit ein. Die B-Gedächtniszelle hat den Immunglobulin Klassenwechsel jedoch noch nicht durchlaufen. Dennoch gibt es eine Gruppe von Zellen im LPL, die CD27⁻ sind und keine somatische Hypermutation durchlaufen haben. In diesen Fällen könnte der zelluläre Ursprung außerhalb des Keimzentrums liegen (Paiva et al., 2015; Growkova et al., 2017). Eine eindeutige Zuordnung der Ursprungszelle des LPL ist in der Literatur bisher nicht beschrieben.

5.1.3.3 Somatische Mutationen beim LPL

Im Rahmen einer Whole Genome Sequenzierung wurden häufig auftretende Mutationen bei Patienten mit LPL untersucht. Die am häufigsten vorkommende Mutation war eine Mutation des *Myeloid Differentiation Primary Response Gene 88* (*MYD88*) (Treon et al 2012b). Die *MYD88-L265P* Mutation (Punktmutation an der Aminosäureposition 265 mit einem Aminosäureaustausch von Leucin zu Prolin) konnte in 80-100% der untersuchten Fälle mit LPL detektiert werden (Treon et al. 2012b; Poulain et al., 2013; Varettoni et al. 2013; Xu et al. 2013). Da die *MYD88-L265P* Mutation nur in B-Lymphozyten und nicht in T-Lymphozyten nachgewiesen werden konnte, ist davon auszugehen, dass die Mutation eine erworbene, also eine somatische Mutation, und keine Keimzellmutation ist (Poulain et al., 2013).

Die zweithäufigsten detektierbaren Mutationen bei Patienten mit WM sind die Mutationen im *CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4* (*CXCR4*). 30% der Patienten mit WM weisen eine *CXCR4* Mutation auf. *CXCR4* Mutationen sind am C-Terminus, welcher Serin-Phosphorylierungsstellen beinhaltet, lokalisiert. Die Signaltransduktion wird durch die Bindung des Liganden CXC-Motiv-Chemokin 12 (*CXCL12*) reguliert. Bei den *CXCR4* Mutationen kommt es zu einer Zerstörung des C-Terminus, jedoch bleiben die Ligandenbindungsstellen,

Einleitung

welche für die Regulation der G-Protein zuständig sind, erhalten. Durch die Mutation kommt es zu einem Verlust der regulatorischen Funktion, zu einer verminderten Rezeptorinternalisierung und zu einer verlängerten Signaltransduktion (Hunter et al., 2014). Die am häufigsten vorkommenden *CXCR4* Mutationen sind die nonsense Mutationen, die mit einer Kürzung der Aminosäurenketten im Protein einhergehen (v.a. S338X und R334X), und die frameshift Mutationen, bei denen es zur Verschiebung des Leserasters kommt (Hunter et al., 2014). Die nonsense Mutation erhöht über die Aktivierung verschiedener Signalkaskaden die Zellmigration, die Zelladhäsion, das Zellwachstum und das Überleben der Tumorzellen (Treon et al., 2014; Cao et al., 2013; Cao et al., 2014; Roccaro et al., 2013). *CXCR4* Mutationen wurden bisher beim Warzen-Hypogammaglobulinämie-Immundefizienz-Myelokathexis-Syndrom (WHIM-Syndrom), einer autosomal dominant vererbten Erkrankung, beobachtet (Hunter et al., 2014).

Die dritthäufigsten Mutationen (17%) sind Mutationen im *AT-rich interactive domain-containing protein 1A (ARID1A)* (Treon et al., 2012b; Hunter et al., 2014). Mutationen in *ARID1A* sind vor allem nonsense oder frameshift Mutationen. *ARID1A* spielt eine Rolle bei der Regulation der Transkription, DNA-Reparatur, DNA-Rekombination sowie Chromosomensegregation. Bei WM-Patienten mit *ARID1A* Mutationen wurde eine höhere Krankheitslast nachgewiesen. Somit ergibt sich daraus eine mögliche prognostische Rolle der *ARID1A* Mutationen (Treon et al., 2012b; Euskirchen et al., 2011).

5.1.3.4 Übergang IgM-MGUS zur WM

Patienten MGUS weisen eine asymptomatische monokonale Gammopathie auf, wobei weder eine Knochenmarkinfiltration noch sonstige Organmanifestationen vorliegen (Owen et al., 2003). Von besonderer Relevanz bei der Entwicklung eines LPL ist die IgM-MGUS. Die IgG- und IgA-MGUS wiederum sind beispielsweise dem Plasmozytom ähnlicher (Swerdlow et al., 2016a). Die IgM-MGUS weist eine Progression von 1,5- 3% pro Jahr zum LPL und anderen

Einleitung

Lymphomen (z.B. Multiples Myelom) auf (Kyle et al., 2003b; Morra et al., 2004; Baldini et al., 2005). In verschiedenen Studien zur Onkogenese der WM wurde eine vorbestehende IgM-MGUS als Vorstufe zum Übergang in eine WM identifiziert. Insbesondere die IgM-MGUS geht häufig über eine asymptomatische WM in eine symptomatische WM über. Bei der IgM-MGUS und der WM wurden CD25⁺/CD22^{low} Zellen als möglicher gemeinsamer zellulärer Ursprung identifiziert (Paiva et al., 2015).

5.1.4 Klinische Präsentation

Krankheitssymptome der Patienten entstehen durch die Organinfiltration des Tumors, die zirkulierenden IgM-Antikörper sowie durch die allgemeine B-Symptomatik. Bedingt durch eine Knochenmarkinfiltration kommt es zur Knochenmarkinsuffizienz und progredienten Zytopenie mit Anämie (normochrom, normozytär), Leukozytopenie (v.a. Neutropenie) sowie Thrombozytopenie (Dimopoulos and Anagnostopoulos, 2005). Das häufigste Symptom ist eine anhaltende Müdigkeit, die durch die Tumoranämie bedingt ist (Bjorkholm et al., 2003). Die Infiltration lymphatischer Organe führt zu einer Lymphadenopathie (15%), Spleno- (15%) und Hepatomegalie (20%) (Dimopoulos and Anagnostopoulos, 2005). In seltenen Fällen können andere Organsysteme wie Pulmo, Pleura, Abdomen und Augen (Orbita, Konjunktiven, Glaskörper) infiltriert werden (Fadil and Taylor, 1998; Rosenthal et al., 1998; Orellana and Friedman, 1981). Durch die zirkulierenden IgM-Antikörper kommt es zu einer anhaltenden Hyperviskosität, welche zu einer erhöhten Gefäßpermeabilität und zur perivaskulären Infiltration führt. So kann es zur Störung der Blutgerinnung mit Blutungsneigung wie z.B. Epistaxis, aber auch zu Thrombembolien kommen (Kaseb et al., 2018). Neurologisch macht sich die Hyperviskosität durch Symptome wie z.B. Kopfschmerz, Schwindel, Ataxie, Doppelbilder, Verschwommensehen, Tinnitus und Hörstörungen bemerkbar. Bei 1% der Patienten mit WM kommt es zu einem Bing-Neel-Syndrom. Dabei treten

Einleitung

zentralnervöse Defizite verbunden mit neurologischen Symptomen auf (Stone et al., 2012; Minnema et al., 2017). In bis zu 20% der Fälle tritt eine periphere Neuropathie auf. Diese kann durch IgM bedingt sein, aber auch durch die lymphoplasmozytische Infiltration der Nervenfasern, durch eine Amyloidose, eine Kryoglobulinämie oder durch die Autoantikörperaktivität (Baehring et al., 2008). Bedingt durch Anti-Myelin-assoziiertes-Glycoprotein (MAG)-Antikörper kann es durch eine Demyelinisierung, zur peripheren Neuropathie und Polyneuropathie kommen (Nobile-Orazio et al., 2000). Bei WM Patienten tritt gelegentlich auch eine Kryoglobulinämie, welche sich durch Hautveränderungen (Ulzera, Purpura, livide Hautverfärbung) bemerkbar macht, oder eine Amyloidose mit nachfolgenden Organkomplikationen in den Organsystemen Herz, Nieren, Leber und im peripheren Nervensystem, auf (Ghobrial et al., 2012; Palladini et al., 2009).

5.1.5 Diagnostik

Zur diagnostischen Abklärung sollten eine Serumproteinelektrophorese und eine Immunfixation zum Nachweis der monoklonalen Immunglobuline, zytogenetische Untersuchungen zum Nachweis von genetischen Aberrationen sowie eine Knochenmarkpunktion und -aspiration durchgeführt werden. Zudem sollten in der laborchemischen Untersuchung Albumin, Differential-Blutbild, C-reaktives Protein (CRP), Blutviskosität, β 2-Mikroglobulin, Transaminasen, Kreatinin und Laktatdehydrogenase (LDH) untersucht werden. Der 24h-Urin sollte auf das Vorliegen von Bence-Jones-Proteinen untersucht werden. Darüber hinaus sollte geprüft werden, ob Kälteantikörper und Kryoagglutinine vorliegen (Gertz, 2015; Vitolo et al., 2008). Beim Tumorstaging sollten eine komplette körperliche Untersuchung, eine umfangreiche laborchemische Untersuchung (siehe oben), eine Ganzkörper-Computertomographie sowie eine Knochenmarkbiopsie durchgeführt werden (Johnson et al., 2006).

Zur Diagnosestellung des LPL müssen nach der WHO classification of lymphoid

Einleitung

neoplasms von 2016 folgende Kriterien erfüllt sein: eine monoklonale Gammopathie vom IgM-Typ, eine Knochenmarkinfiltration durch kleine Lymphozyten, die eine plasmazytoide oder plasmazelluläre Differenzierung aufweisen, ein intertrabekuläres Infiltrationsmuster des Knochenmarks sowie spezielle immunphänotypische Eigenschaften wie der Nachweis der Oberflächenmarker IgM, CD19, CD20, CD22, CD25, CD27, FMC7. CD5 kann nur selten nachgewiesen werden. Die Oberflächenmarker CD10, CD23, CD103, CD108 können beim LPL normalerweise nicht nachgewiesen werden (Kaseb et al., 2018, Swerdlow et al., 2017). In die WHO-Klassifikation der lymphatischen Malignome von 2016 wurden zudem zytogenetische Veränderungen wie die *MYD88-L265P* Mutation (90% Nachweis beim LPL, 50% bei IgM-MGUS) sowie *CXCR4* Mutationen (30% beim LPL, 20% bei der IgM-MGUS) als Kriterium der Diagnosestellung des LPL aufgenommen. Die IgM-MGUS wurde als eine dem LPL verwandte Entität eingeordnet (Treon et al., 2012b; Swerdlow et al., 2016a; Treon et al., 2014; Roccaro et al., 2014; Schmidt et al., 2015).

5.1.6 Differentialdiagnose

Die Knochenmarkinfiltration mit klonalen B-Zellen mit lymphoplasmozytischer Differenzierung ist nicht pathognomonisch für das LPL. Andere NHL wie beispielsweise das Marginalzonenlymphom, die chronisch lymphatische Leukämie und das Multiple Myelom können sich histopathologisch ähnlich darstellen (Alexanian et al., 2003).

5.1.6.1 Marginalzonenlymphom (MZL)

Es gibt drei Arten des MZL: das splenische Marginalzonen Lymphom (SMZL), das noduläre Marginalzonenlymphom (NMZL) und das extranoduläre Marginalzonenlymphom (EMZL oder auch Mucosa-associated-Lymphoma (MALT)-Lymphom (Swerlow et al., 2016b). Auf Grund der Differentialdiagnose zum LPL wird in dieser Arbeit vor allem das SMZL betrachtet. Das SMZL ist ein

Einleitung

niedrig malignes NHL, welches seinen Ursprung in der Marginalzone des B-Zell-Kompartiments in der Milz hat (Maes and De Wolf-Peeters, 2002). Das SMZL besteht aus Zellansammlungen von mittelgroßen B-Lymphozyten, die von größeren Zellen mit klarem Zytoplasma umgeben sind. Allerdings können auch andere Zellen mit lymphoider oder plasmazytischer Differenzierung oder Plasmazellen vorliegen (Thieblemont et al.; 2003, Arcaini et al., 2016). Das Infiltrationsmuster in der Milz ist vor allem mikronodulär (Schmid et al., 1992). Im Knochenmark liegt vor allem ein intrasinusoidales Infiltrationsmuster vor. Jedoch besteht auch häufig ein interstitielles, noduläres oder diffuses Infiltrationsmuster (Ponzoni et al., 2012; Arcaini et al., 2011; Bassarova et al., 2015).

Zunächst bleibt die Erkrankung häufig subklinisch. Im Verlauf manifestiert sich das SMZL klinisch vor allem durch eine massive Splenomegalie (400-2000 g). Das SMZL infiltriert neben der Milz das Knochenmark und das periphere Blut (Arcaini et al., 2016). Zur Diagnosestellung müsste die Milz im Rahmen einer Splenektomie (bei Splenomegalie) untersucht werden. Da aber häufig primär kein splenisches Gewebe zur Untersuchung vorliegt, erfolgt die Diagnosestellung anhand von Knochenmarkmaterial (Swerdlow et al., 2016b). Laborchemisch imponiert eine Erhöhung von β 2-Mikroglobulin sowie eine Lymphozytose. Etwa die Hälfte der Patienten mit SMZL weist laborchemisch eine Erhöhung der IgM-Antikörper auf. SMZL exprimieren üblicherweise die generellen B-Zell-Oberflächenmarker (v.a. CD20 und CD79) sowie BCL2. CD5, CD10, CD123, CD42, BCL-6, Cyclin D1 werden normalerweise nicht exprimiert (Baseggio et al., 2010). Üblicherweise liegt beim SMZL keine Paraproteinämie vor. Jedoch ist in ca. 15% der SMZL (v.a. bei plasmazytischer Differenzierung) eine IgM-Paraproteinämie nachweisbar (Martinez-Lopez et al., 2015, Swerdlow, et al., 2016b).

Bisher sind keine krankheitsdefinierenden zytogenetischen Veränderungen bekannt. Zytogenetisch relevant sind Mutationen im Kruppel-like factor 2 (*KLF2*, einem Zinkfinger-Transkriptionsfaktor), welche in ca. 42% der MZL

Einleitung

nachgewiesen werden können und mit einer Dysregulation der Transkription einhergehen, sowie *Notch receptor 2 (NOTCH-2)* Mutationen, welche für das SMZL typisch sind und mit einer schlechteren Prognose der Erkrankung einhergehen, jedoch nur in ca. 25% der Fälle nachweisbar sind (Clipson et al., 2015; Kiel et al., 2012). Bei 30% der SMZL ist eine Deletion 7q nachweisbar, welche bei anderen B-Zell Lymphomen nicht nachgewiesen werden kann (Arcaini et al., 2016; Salido et al., 2016; Rinaldi et al., 2011). Bei 5-10% der SMZL findet eine Transformation in ein diffus großzelliges B-Zell-Lymphom (DLBCL) statt (Arcaini et al., 2016).

5.1.6.2 Chronisch lymphatische Leukämie

Die chronische lymphatische Leukämie der B-Zell-Reihe (B-CLL) ist ein indolentes malignes NHL, welches den am häufigsten vorkommenden Leukämietypus im Erwachsenenalter darstellt (Jemal et al., 2007; Hallek, 2017). Die Inzidenz liegt bei ca. vier Fällen auf 100.000 Einwohner und Jahr (Hallek, 2017).

Kleine, reife CD5⁺ B-Lymphozyten infiltrieren das Blut, das Knochenmark, die Lymphknoten und die Milz (Rozman and Montserrat, 1995). Das Infiltrationsmuster im Knochenmark ist nodulär, interstitiell, gemischt oder diffus (Kipps et al., 2017; Montserrat et al., 1983). Morphologisch charakteristisch sind Gumprecht'sche Kernschatten (Hallek, 2017; Melo et al., 1986), Pseudofollikel sowie Proliferationszentren (Gupta et al., 2000; Kipps et al., 2017). Neben CD5 exprimieren die Zellen der B-CLL häufig die B-Zell Oberflächenantigene CD19, CD20 und CD23. FMC7 wird selten exprimiert (Kipps et al., 2017; Deans and Polyak, 2008). Zudem wird von Zellen der B-CLL CD200 exprimiert (Alapat et al., 2012). Immunhistochemisch kann bei der B-CLL der lymphocyte enhancer-binding factor 1 (LEF 1) nachgewiesen werden, welcher ein sensitiver und spezifischer Marker für die B-CLL darstellt (Menter et al., 2015). Bei der B-CLL sind verschiedene chromosomale Veränderungen wie z.B. die Deletion 13q14 (in 55% der Fälle und somit häufigste chromosomale Aberration) sowie die

Einleitung

Deletionen 11q und 17p sowie die Trisomie 12 beschrieben (Calin et al., 2002; Zenz et al., 2010; Quesda et al., 2011; Seiffert et al., 2012).

Klinisch präsentiert sich die B-CLL durch eine generalisierte Lymphadenopathie, Hepato- und Splenomegalie, Panzytopenie, Müdigkeit und B-Symptomatik mit Gewichtsverlust, Nachtschweiß und febrilen Temperaturen. Des Weiteren können vermehrt autoimmunhämolytische Anämien und autoimmunbedingte Thrombozytopenien auftreten (Kipps et al., 2017).

Diagnostisch relevant sind das periphere Blutbild mit einer ausgeprägten Lymphozytose (> 5000/ μ l) und eine Knochenmarkinfiltration (Melo et al., 1986). Im Rahmen des Updates der WHO-Klassifikation von 2016 wurde festgehalten, dass eine Zytopenie oder krankheitsbedingte Symptome zur Diagnosestellung nicht ausreichend sind, wenn die Anzahl der Leukozyten im peripheren Blut weniger als 5000/ μ l beträgt. Hinsichtlich der Diagnosestellung konnte nach aktueller Datenlage bei der B-CLL keine erkrankungsdefinierende Mutation detektiert werden (Swerdlow et al., 2016a). Insgesamt wurden in verschiedenen Studien potenziell klinisch relevante Mutationen wie z.B. Mutationen im *Tumorsuppressorgen 53 (TP53)*, *NOTCH1* (Rezeptor für Wachstumsfaktor), im *Splicing factor 3B subunit 1 (SF3B1)*, kodiert für eine Untereinheit eines Splicingproteins), in der *Serin-Proteinkinase Ataxia telangiectasia mutated (ATM)*, beteiligt an der Reparatur von DNA-Strangbrüchen) und im *Baculoviral IAP Repeat Containing 3 (BIRC3)*, Protein, das die Apoptose verhindert) entdeckt, welche mit einer schlechteren Prognose einhergehen (Rossi et al., 2014; Baliakas et al., 2015; Foa and Guarini, 2013). Ebenso gehen große, konfluierende oder hoch proliferative Proliferationszentren mit einer schlechteren Prognose einher. In diesen Proliferationszentren konnte in ca. 30% der B-CLL-Fälle eine erhöhte Cyclin-D1 Expression nachgewiesen werden (Gradowski et al., 2012; Gibson et al., 2016; Gine et al., 2010; Swerdlow et al., 2016b).

Etwa 2-7% der Patienten mit einer B-CLL durchlaufen eine Richter Transformation, welche eine Transformation in ein aggressives, hochmalignes

Einleitung

Lymphom wie z.B. ein DLBCL darstellt (Rossi et al., 2016, Kipps et al., 2017).

5.1.6.3 Multiples Myelom

Beim Multiplen Myelom (MM) gibt es verschiedene Subtypen, wobei das IgM-MM dabei nur einen Anteil von 0,5% darstellt (Kyle et al., 2003a; Atrash et al., 2018). Beim IgM-MM findet sich im Knochenmark ein rein plasmazelluläres Infiltrationsmuster mit lytischen Läsionen (Avet-Loiseau et al., 2003). Für die Diagnosestellung des MM sind folgende Kriterien relevant: Hyperkalziämie, renale Beteiligung, Anämie und Knochenmarkinfiltration (mit lytischen Läsionen). Zudem sind im Serum freie Leichtketten nachweisbar (Rajkumar et al., 2014; Caers et al., 2016). Die Zellen des MM haben eine plasmazytische Differenzierung und exprimieren CD38, CD138 und CD45. Daneben werden die Oberflächenantigene CD19, CD27, CD38, CD45 und CD56 sowie seltener CD20, CD28, CD33 und CD117 von Zellen des MM exprimiert (King et al., 2013; Rawstron et al., 2008; Caers et al., 2018, Flores-Montero et al., 2016). Insbesondere CD138 und CD56 sind sensitive Marker des MM. CD56 hat auch eine klinische Bedeutung, da die Expression von CD56 mit lytischen Läsionen im Knochenmark korreliert und mit einer besseren Prognose einhergeht (Dass et al., 2019). Zytogenetisch ist die Translokation t(11;14)(q13;q32) von Relevanz (Annibaldi et al., 2006; Janz, 2013).

5.1.7 Therapeutische Möglichkeiten und Prognose

Eine kausale Therapie des LPL ist nicht möglich, daher können durch palliative Maßnahmen nur eine Verlängerung der Überlebenszeit und Verbesserung der Lebensqualität erfolgen (Vijay and Gertz, 2007). Eine therapeutische Intervention sollte daher symptomatischen Krankheitsverläufen vorbehalten bleiben (Treon et al., 2006a). Kriterien dafür sind beispielsweise ein Hämoglobinwert (Hb-Wert) unter 11 g/dl, Thrombozytenkonzentrationen unter 120.000 / μ l, eine Kryoglobulinämie, eine Autoantikörper bedingte hämolytische

Einleitung

Anämie, Kälteagglutinine, eine Hyperviskosität oder Symptome neurologischen Ursprungs (Poly- und Mononeuropathie) oder Organmanifestationen (deutliche Organomegalie und Amyloidose) (Kyle et al., 2003c; Gertz, 2017). Bei IgM-Serumkonzentrationen von über 4000 mg/dl (in neueren Studien ab 6000 mg/dl) besteht die Gefahr eines Hyperviskositätssyndroms und somit ist dringend eine Behandlung wie z.B. eine Plasmapherese indiziert (Gertz and Kyle, 1995; Stone et al., 2013; Stone et al., 2012; Blum and Procu, 2007; Gustine et al., 2017). Bei Patienten mit symptomatischer WM bestehen bei der Erstbehandlung der WM, abhängig von der klinischen Symptomatik, verschiedene Therapieoptionen. Bei Patienten mit WM-assoziiertes Zytopenie oder Organomegalie sollte eine Rituximab-basierte Behandlung durchgeführt werden. Mögliche Kombinationen hierfür sind z.B. Dexamethason, Rituximab und Cyclophosphamid (DRC). Diese Kombination ist insgesamt wenig toxisch. Eine weitere Möglichkeit wäre die Kombination Bendamustin und Rituximab, welche schnell wirksam ist. Eine alternative Behandlungsmöglichkeit wäre die Kombination Bortezomib mit Rituximab und Dexamethason. Patienten mit symptomatischer Hyperviskosität oder Kryoglobulinämie oder Kälteagglutininen können mit einer Kombination aus Bortezomib und Rituximab und ggf. Dexamethason oder einer Kombination aus Bendamustin und Rituximab behandelt werden. Patienten mit Paraprotein-assoziiertes Neuropathie können mit Rituximab oder DRC behandelt werden. Bei älteren Patienten mit schlechtem Allgemeinzustand könnten Behandlungen mit DRC, auf Grund der geringeren Toxizität, oder Fludarabin in Erwägung gezogen werden. Bei Fludarabin besteht der Vorteil darin, dass für dieses Medikament auch eine orale Applikationsform besteht, falls eine intravenöse Behandlung nicht durchgeführt werden kann (Dimopoulos et al., 2015). Bei multimorbiden, älteren Patienten besteht zudem die Möglichkeit einer Rituximab-Monotherapie, welche aber mit einer geringeren Ansprechrate (20-50%) im Vergleich zu den oben genannten Protokollen einhergeht (Buske et al., 2013).

Nach den Mayo Clinic SMART Leitlinien wurde folgendes Therapieprocedere

Einleitung

vorgeschlagen: Bei Patienten mit asymptomatischer WM sollte zunächst zugewartet und weiter beobachtet werden. Bei Patienten mit einem Hb-Wert unter 11 g/dl, einer Thrombozytenkonzentration unter 120.000 / μ l, IgM-bedingter Neuropathie, hämolytischer Anämie oder symptomatischer Kryoglobulinämie sollte zunächst ein Zyklus einer Rituximab-Monotherapie durchgeführt werden. Bei Patienten mit einer Lymphadenopathie, einem Hyperviskositätssyndrom oder einer ausgeprägten Zyopenie (Hb-Wert unter 10 g/dl, Thrombozytenkonzentration unter 100.000 / μ l) sollte bei Vorliegen eines Hyperviskositätssyndroms zunächst eine Plasmapherese durchgeführt werden. Zudem sollte eine Chemotherapie mit Bendamustin und Rituximab (vier bis sechs Zyklen) durchgeführt werden. Eine Rituximab-Erhaltungstherapie wird derzeit nicht empfohlen (Gertz, 2019; Paludo et al., 2018).

Bei Patienten mit rezidivierenden Verläufen kann die zuvor gewählte Therapiestrategie, unter der bei der Erstbehandlung eine Remission erzielt wurde, wiederholt werden, wenn die Erstbehandlung über drei Jahre zurück liegt. Wenn ein Rezidiv in einem kürzeren Zeitintervall auftreten sollte, sollte ein anderer Behandlungspfad gewählt werden. Hierfür bestehen verschiedene Möglichkeiten an Medikamentenkombinationen: DRC oder Bendamustin und Rituximab oder Bortezomib, Dexamethason und Rituximab (wenn die periphere Neuropathie geringfügig ist). (Hunter et al., 2017; Gertz, 2019). Bei rezidivierenden oder therapierefraktären Verläufen kann mittels Einsatz von Ibrutinib eine Ansprechrate von ca. 90% erzielt werden (Dimopoulos et al., 2017; Treon et al., 2015). Eine weitere therapeutische Möglichkeit, unabhängig vom *MYD88* Mutationsstatus, sowohl bei der Erstbehandlung als auch bei einem Rezidiv, besteht in der Kombination von Ibrutinib mit Rituximab (Dimopoulos et al., 2018). Bei fehlendem Ansprechen auf die Chemotherapie (Rituximab und Dexamethason oder Bendamustin und Rituximab) kann bei jüngeren Patienten eine autologe oder allogene Stammzelltransplantation durchgeführt werden (Gertz, 2012; Usmani et al., 2011).

Nach dem International Prognostic Scoring System for Waldenström

Einleitung

macroglobulinemia (ISSWM) kann eine Risikostratifizierung durchgeführt werden. Hierbei wurde von der amerikanischen Gesellschaft für Hämatologie ein Kriteriensystem entworfen, nach welchem das Überleben von symptomatischen Patienten mit WM abgeschätzt werden kann (Tabelle 1) (Gertz, 2017; Morel et al., 2009).

Tabelle 1: International scoring system for Waldenström's macroglobulinemia (ISSWM)

Alter > 65 Jahre
Hb <11,5 g/dl
Thrombozyten unter 100.000 / μ l
β 2-Mikroglobulinkonzentration >3 mg/l
IgM-Spiegel von >7 g/dl

Diese Parameter werden bei Vorliegen mit je einem Punkt bewertet und die Patienten werden anschließend in verschiedene Risikogruppen hinsichtlich eines Rezidivrisikos eingeteilt. Entsprechend der Einteilung sinkt die durchschnittliche 5-Jahres-Überlebensrate von 87%, bei der Gruppe mit geringem Rezidivrisiko, auf 36%, bei der Patientengruppe mit hohem Rezidivrisiko. Das Alter spielt bei der Erkrankung eine wesentliche prognostische Rolle und daher werden Patienten mit über 65 Jahren mindestens bei der Gruppe mit mittlerem Rezidivrisiko eingestuft (Gertz, 2017; Morel et al., 2009). Bei unter 70-jährigen WM Patienten beträgt die durchschnittliche Überlebenszeit ca. zehn Jahre, bei 70-80-Jährigen ca. sieben Jahre und bei über 80-Jährigen nur noch ca. vier Jahre (Castillo et al., 2015; Gertz, 2019).

Beim LPL wurde in 5-13% der Fälle eine Transformation zu einem aggressiven NHL beschrieben. In diesem Zusammenhang sind *TP53*-Mutationen oder Deletionen von Relevanz. Histologisch ist diese Transformation durch einen Nachweis von Cluster und Schichten von großen transformierten Zellen (DLBCL-Transformation), mitotischen Figuren und einem hohen Kiel-67-Index (Ki67-Index, Proliferationsmarker) gekennzeichnet (Lin et al., 2003; Swerdlow et al., 2016b).

5.2 Myeloid Differentiation Primary Response Gene 88 (MYD88)

MYD88 ist ein Adapterprotein, das im Toll-like-receptor (TLR)- und Interleukin (IL-1 und IL-18)- Signalweg interagiert und dadurch die Überlebensfähigkeit von malignen Zellen über den nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells (NF- κ B)- und Januskinase (JAK) sichert. (Akira and Takeda, 2004; Kawai and Akira 2010; Jeelall and Horikawa, 2011). NF- κ B und JAK sind Aktivatoren der Transkription und wirken proliferationsfördernd, regulieren die Anti-Apoptose und die Zytokinproduktion (Jeelall and Horikawa 2011; Ngo et al., 2011). MYD88 besteht aus einer Toll/IL-1R-(TIR)-Domäne am C-Terminus und aus einer Todesdomäne am N-Terminus (Wesche et al., 1997; Muzio et al., 1997).

5.2.1 MYD88-Signalwege

Zur Aktivierung des TLR-Signalwegs binden entsprechende Liganden an den Toll-like-Rezeptor 4 (TLR 4) und den Interleukin-1-Rezeptor (ILR 1), welche in der Zellmembran verankert sind. Dadurch kommt es zur Rekrutierung eines oder mehrerer Adaptermoleküle, wie z.B. von MYD88, Bruton-Tyrosin-Kinase (BTK), dem TIR domain containing adaptor Protein (TIRAP) (Wesche et al., 1997; Medzhitov et al., 1998; Ngo et al., 2011). MYD88 assoziiert mit der IL-1-Rezeptor assoziierten Kinase 4 (IRAK4). IRAK1 und IRAK2 werden phosphoryliert und somit aktiviert (Lin et al., 2010; Kawagoe et al., 2008; Ngo et al., 2011). Die IRAK 1 aktiviert den membrangebunden tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 (TRAF6). Dieser wiederum bildet mit weiteren Faktoren einen heterotrimeren Komplex, wodurch I κ B α (nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha) phosphoryliert wird (Cohen et al., 1998). Die zytoplasmatische Form von NF- κ B, bestehend aus den Untereinheiten p50 und p65, welche ein Dimer bilden, (Naumann and

Einleitung

Scheidereit, 1994) ist normalerweise inaktiv und an ein Inhibitormolekül ($\text{I}\kappa\text{B}\alpha$) gebunden. Wird das Inhibitormolekül $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ phosphoryliert, wird das phosphorylierte Heterodimer, bestehend aus p50 und p65, freigesetzt und NF- κB wird zum Zellkern transportiert (Abbildung 1 nach (Treon et al., 2012b)).

Die phosphorylierte BTK kann unabhängig von der IRAK4 das Inhibitormolekül $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ phosphorylieren. Dadurch kommt es zu einer Freisetzung von p50 und p65, welche NF- κB im Zellkern aktivieren (Yang et al., 2016; Hunter et al., 2017).

NF- κB ist ein Proteinkomplex, welcher Transkription, Zellüberleben, Inflammation, Hämatopoese und die Differenzierung von Lymphozyten zu Plasmazellen reguliert. Die Aktivierung verschiedener Gene, die das Zellüberleben sichern und den Zelltod verhindern, kann zur Tumorentstehung und -aufrechterhaltung führen (Demchenko et al., 2010).

Neben der Aktivierung von NF- κB spielt die TRAF6 durch Aktivierung von mitogen activated protein (MAP)-Kinasen wie z.B. der p38 MAP-Kinase und des Interferon- β -Rezeptors eine weitere Rolle bei der Tumorgenese. Daraus resultieren eine vermehrte Proliferation, erhöhtes Zellüberleben und eine verminderte Apoptose der Tumorzellen (Takeda and Akira, 2004; Gonzalez-Aguilar et al., 2012).

Einleitung

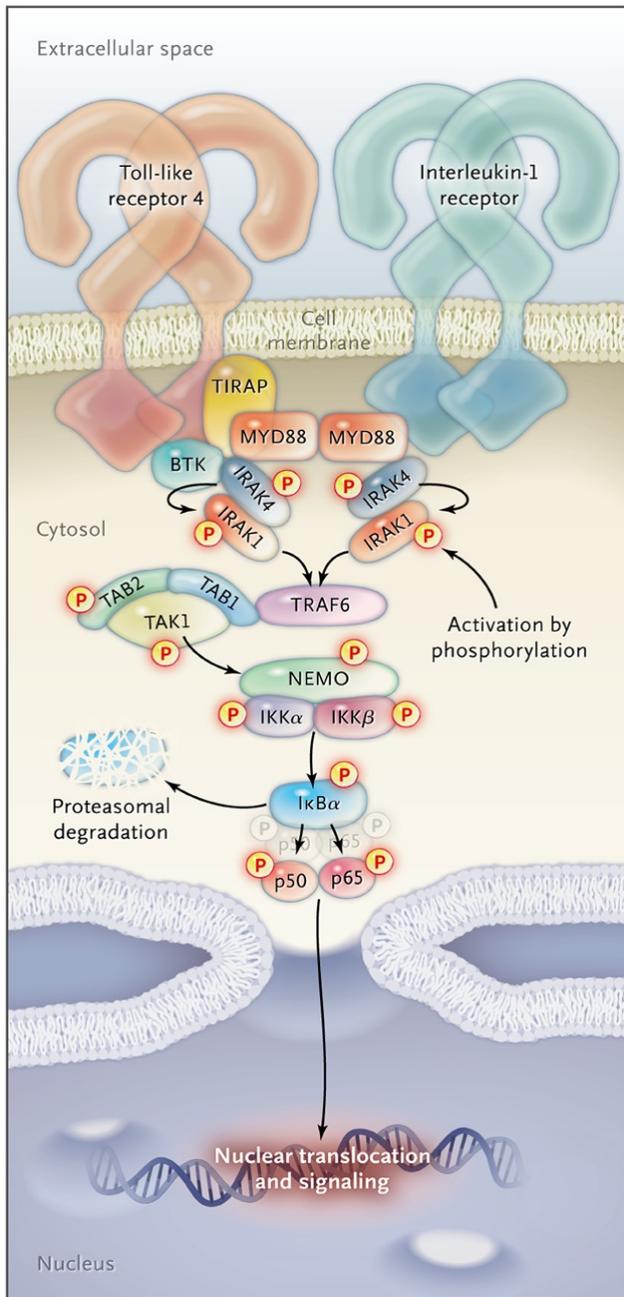


Abbildung 1: Schematische Darstellung des MYD88 Signalwegs.

Zunächst binden die Liganden IL-1 und TLR4 an ihre Rezeptoren, daraufhin kommt es zur Homodimerisation zweier MYD88-Proteine. Es folgt eine Signalkaskade über die Phosphorylierung verschiedener Faktoren wie z.B. IRAK1 und IRAK4. In der Endstrecke der Signalkaskade kommt es zur Aktivierung von NF-κB. NF-κB wirkt proliferationsfördernd und verstärkt das Zellwachstum. Reproduced with permission from (Trean et al., 2012b), Copyright Massachusetts Medical Society.

Einleitung

Beim MYD88-Signalweg spielt nicht nur die NF- κ B-Aktivierung über IRAK4 und BTK eine Rolle bei der Zellproliferation und Anti-Apoptose der Tumorzellen, sondern auch der Janus kinase signal transducer and activator of transcription 3 (JAK-STAT3) Signalweg. Die autokrine Sekretion von IL-6 und IL-10 führt zur Aktivierung des JAK-STAT3 Signalweges. Nach der Bindung von IL-6 und IL-10 an Interleukin-Rezeptoren wird die JAK1 aktiviert. Dies führt zu einer Phosphorylierung von STAT3, welches als phosphoryliertes Homodimer im Zellkern Gene aktiviert, welche bei der Proliferation und beim Zellüberleben beteiligt sind. MYD88 aktiviert in den Tumorzellen über NF- κ B die Sekretion von IL-6 und IL-10 und unterstützt somit den autokrinen Signalweg der Zytokine (Ngo et al., 2011; Lu et al., 2018).

Über IL-6 wird auch durch die hematopoietic cell kinase (HCK). Die HCK aktiviert ihrerseits verschiedene Signalkaskaden wie z.B. die Proteinkinase C (PKC), die Proteinkinase B (AKT) sowie die BTK. Über die PKC werden die MAP-Kinasen extracellular signal-regulated kinases (ERK1 oder ERK2) aktiviert, welche anschließend in den Zellkern transportiert werden. Die AKT wird durch eine aktivierte Phosphatidyl-Inositol-Triphosphat Kinase (PI3K) aktiviert. Die AKT wiederum aktiviert den Faktor mechanistic Target of Rapamycin (mTOR), welcher anschließend in den Zellkern transportiert wird. Durch diese Prozesse werden das Zellwachstum gesteigert und das Zellüberleben gesichert (Yang et al., 2016).

5.2.2 MYD88-L265P Mutation

Durch Mutationen im *MYD88*-Gen kann es im Tumorgewebe zu einer deutlichen Verstärkung der Zellproliferation kommen. Diese Mutationen sind besonders häufig in der TIR-Region vorzufinden, was zur Folge hat, dass über die oben beschriebenen Signalwege eine vermehrte Aktivität der NF- κ B-Signalkaskade resultiert (Ngo et al., 2011). Die häufigste und relevanteste

Einleitung

Mutation für die Onkogenese im *MYD88*-Gen ist die *MYD88*-L265P Mutation. Erstmals wurde die *MYD88*-L265P Mutation von Ngo et al. im activated B-cell (ABC-)DLBCL beschrieben. Die *MYD88*-L265P Mutation ist eine erworbene Punktmutation (mit Austausch der Basen: T → C; Austausch von Thymin → Cytosin) an der Position 38182641 im Chromosom 3p22.2 (Treon et al., 2012b). Durch die Punktmutation kommt es im *MYD88*-Protein an der Aminosäureposition 265 zum Austausch von Leucin zu Prolin (p.L265P) in der konservativen TIR-Domäne. Die *MYD88*-L265P Mutation ist eine Gain of function Mutation. Die betroffene Region trägt zur Ausbildung der sekundären β -Faltblattstruktur im hydrophoben Teil der Domäne bei (Ngo et al., 2011).

5.2.3 *MYD88*-L265P Mutation bei Patienten mit LPL

Bei Patienten mit LPL war, abhängig von der Nachweismethode (Sanger-Sequenzierung oder Allel-spezifische PCR), ein *MYD88*-L265P Mutationsnachweis in 67% bis 100% der Fälle möglich (Treon et al., 2012b; Poulain et al., 2013; Varettoni et al., 2013; Jimenez et al., 2013; Gachard et al., 2013). Bei den Studienfällen handelte es sich vor allem um LPL-Fälle mit einer IgM-Paraproteinämie. Jedoch wurden in verschiedenen Studien auch Einzelfälle von IgA-LPL, IgG-LPL und nicht-sekretierendem LPL mit *MYD88*-L265P Mutation untersucht (Treon et al., 2012b; Xu et al., 2013; Insuasti-Beltran et al., 2015). Die *MYD88*-L265P Mutation konnte nur in Tumorgewebe, nicht aber in Proben von peripheren B-Zellen oder gesundem Gewebe nachgewiesen werden (Treon et al., 2012b). Die meisten Patienten mit LPL wiesen einen heterozygoten Mutationsstatus auf, was bedeutet, dass bei den Patienten sowohl ein normales (nicht mutiertes) und ein Allel mit der *MYD88*-L265P Mutation vorlagen. Zwischen den Patientenfällen mit heterozygotem und homozygotem Mutationsstatus waren keine wesentlichen klinischen oder laborchemischen Unterschiede zu finden (Treon et al., 2012b; Poulain et al.,

Einleitung

2013). Bei homozygoter *MYD88*-L265P Mutation konnte eine höhere Knochenmarkinfiltration und höhere IgM-Serumspiegel ebenso wie eine IgG- und IgA-Hypogammaglobulinämie festgestellt werden (Xu et al., 2013). Die *MYD88*-L265P Mutation aktiviert bei Patienten mit LPL über *MYD88* sowohl über die *IRAK1* und *IRAK4*, als auch über die *BTK*, den *NF-κB*-Signalweg, welcher die Proliferation und Anti-Apoptose der Tumorzellen sichert (Treon et al., 2012b; Yang et al., 2013). Auf Grund der hohen Nachweisrate der Mutation bei Patienten mit LPL, wurde die *MYD88*-L265P Mutation nach der WHO-Klassifikation von 2016 als charakteristisch für das LPL definiert (Swerdlow et al., 2016a). Klinische Unterschiede bei WM Patienten mit *MYD88*-L265P Mutation, im Vergleich zu WM Patienten mit *MYD88*-Wildtypsequenz, sind höhere Spiegel der monoklonalen Gammopathie (v.a. IgM), eine deutlichere Lymphozytose sowie eine stärkere Knochenmarkinfiltration (Xu et al., 2013). Auch der *CXCR4* Mutationsstatus spielt eine wichtige Rolle in der klinischen Präsentation und im Krankheitsverlauf bei Patienten mit LPL. Üblicherweise treten *CXCR4* Mutationen zusammen mit der *MYD88*-L265P Mutation auf. Die *CXCR4*-nonsense Mutation (*CXCR4*^{NS}) imponierte bei Patienten mit WM klinisch mit einer höheren Krankheitslast, das heißt einer stärkeren Knochenmarkinfiltration, einer ausgeprägteren Leukozytopenie sowie Thrombozytopenie, einer extramedullären Krankheitsmanifestation, höheren IgM-Serumspiegeln sowie einer symptomatischen Hyperviskosität (Treon et al., 2014; Schmidt et al., 2015). Bei der *CXCR4*^{NS} Mutation kommt es im Vergleich zur *CXCR4* frameshift Mutation (*CXCR4*^{FS}) zu einer verlängerten Aktivierung der *MAP*-Signalkaskade. Dies könnte die ausgeprägtere Krankheitslast der Patienten mit *CXCR4*^{NS} Mutation erklären (Cao et al., 2015). Bei der Krankheitsdiagnose lag bei diesem Patientenkollektiv häufig schon ein behandlungsbedürftiges, symptomatisches Stadium der Erkrankung vor (Treon et al., 2014). Bei Patienten mit *MYD88*-L265P Mutation und *CXCR4*-Mutation ist insgesamt eine deutlichere Panzytopenie, als Zeichen einer aktiveren Erkrankung sowie einer höheren Krankheitslast, zu beobachten (Schmidt et al.,

Einleitung

2015). Der *CXCR4* Mutationsstatus hat keinen nachweisbaren Einfluss auf die Überlebensrate der Patienten. Patienten mit *MYD88*-L265P Mutation haben im Vergleich zu Patienten mit nicht mutiertem *MYD88* eine günstigere Prognose und eine geringere Mortalität (Varettoni et al., 2017; Treon et al., 2014). Neben den Mutationen in *MYD88* und *CXCR4* wurden beim LPL Mutationen im *ARID1A* Gen beobachtet. Auch diese Mutationen gehen mit einer ausgeprägteren klinischen Symptomatik einher. Bei einer Kombination von Mutationen in *MYD88* und *ARID1A* konnte bei den Patienten eine stärkere Knochenmarkinfiltration, ein geringerer Hämoglobinwert sowie geringere Thrombozytenzahlen nachgewiesen werden (Wiegand et al., 2010; Guan et al., 2011).

5.2.4 Klinisch-therapeutische Relevanz der *MYD88*-L265P Mutation in der Behandlung der WM

Durch die hohe onkogenetische Relevanz der *MYD88*-L265P Mutation ergibt sich daraus ein mögliches therapeutisches Target in der onkologischen Behandlung. In präklinischen Studien konnte gezeigt werden, dass durch die Inkubation verschiedener Zelllinien mit *MYD88*-L265P Mutation mit IRAK 1- und IRAK 4-Hemmstoffen sowie *MYD88*-Homodimerisierungs-Hemmstoffen, die NF- κ B Aktivität gesenkt werden konnte (Yang et al., 2013; Ansell et al., 2014). Damit einhergehend kam es zu einer signifikanten Zunahme der Apoptose der Tumorzellen. Als weiteren therapeutischen Ansatzpunkt im Rahmen des NF- κ B Signalwegs, wurde die Hemmung der BTK mit Ibrutinib untersucht, welche über eine Blockade der Phosphorylierung von I κ B α ebenfalls zu einer verminderten NF- κ B Konzentration führt (Advani et al., 2013; Yang et al., 2013). Durch eine duale Hemmung der BTK und der IRAK 1 und IRAK 4 bei Zelllinien mit *MYD88*-L265P konnte eine höhere Apoptoserate der Tumorzellen beobachtet werden, als dies bei jedem einzelnen Hemmstoff beobachtet werden konnte (Yang et al., 2013). Diese Beobachtungen können in der Behandlung der WM, abhängig

Einleitung

vom *MYD88*-L265P Mutationsstatus, von Bedeutung sein. WM-Patienten mit *MYD88*-L265P können mit dem BTK-Hemmstoff Ibrutinib behandelt werden. In einer Studie von Treon et al. (2015) profitierten 90,5% der Patienten mit rezidivierendem therapierefraktärem Krankheitsverlauf von der Behandlung mit Ibrutinib. Die Mortalität und Krankheitsprogression wurden vermindert, ebenso Symptome wie eine Splenomegalie oder eine Lymphadenopathie (Treon et al., 2015; Sacco et al., 2017).

5.2.5 *MYD88* Wildtypstatus bei Patienten mit WM

Bei manchen Patienten mit LPL kann keine Mutation im *MYD88* Gen nachgewiesen werden, es liegt somit die Wildtypsequenz von *MYD88* vor. Morphologische Untersuchungen der Patienten mit *MYD88* Wildtypstatus zeigten ein interstitielles Infiltrationsmuster im Knochenmark mit diffusen B-Zellen, lymphoplasmozytischen Zellen und Plasmazellen. In der Durchflusszytometrie konnten folgende immunhistochemische Oberflächenmarker nachgewiesen werden: B-Zellen mit CD19⁺, CD20⁺, CD5⁻, CD10⁻, CD23^{+/-} und IgM⁺ sowie Plasmazellen mit CD38⁺, CD138⁺, CD56⁻ und IgM⁺. Klinisch-diagnostisch wiesen 35% der Patienten eine Adenopathie und 28% eine Splenomegalie auf. 26% der Patienten hatten eine positive Familienanamnese für B-Zell Tumoren (Treon et al., 2018). Bei Patienten mit *MYD88* Wildtypstatus konnten Mutationen in der *Histone-lysine N-methyltransferase 2D* (*KMT2D* oder früher *MLL-2*) nachgewiesen werden. *KMT2D* Mutationen konnten bei diesem Patientenkollektiv in Form von Punktmutationen oder Frameshift-Mutationen, die zu Deletionen führen, nachgewiesen werden. Diese Mutationen waren bei keinem der LPL-Fälle mit *MYD88*-L265P Mutation nachweisbar. Die Patienten mit einer *KMT2D* Mutation wiesen hohe Konzentrationen zirkulierender klonaler B-Zellen und CD23⁺ auf. Beides ist bei WM-Patienten mit *MYD88*-L265P Mutation ungewöhnlich. Die *KMT2D* Mutation kommt häufiger bei Patienten mit anderen Neoplasien wie z.B.

Einleitung

dem DLBCL oder dem folliculärem Lymphom vor (Treon et al., 2012b; Hunter et al., 2014). Im Vergleich zu Patienten mit *MYD88*-L265P Mutation wies das Patientenkollektiv mit nicht mutiertem *MYD88* ein höheres Lebensalter, eine geringe Knochenmarkinfiltration sowie erhöhte β 2-Mikroglobulinspiegel (über 3,0 mg/l) auf. Sowohl höhere β 2-Mikroglobulinspiegel als auch ein höheres Lebensalter sind prognostisch ungünstig (Treon et al., 2014). Patienten ohne *MYD88*-L265P oder *CXCR4* Mutationen wiesen eine geringere Knochenmarkinfiltration, geringe IgM-Serumspiegel sowie fehlende Organomegalien bei der Diagnosestellung auf. Jedoch war in diesem Kollektiv ein vermehrtes Auftreten von hämolytischen Anämien sowie Kryoglobulinämien beobachtet worden (Schmidt et al., 2015). In einer Untersuchung zu prognostischen Unterschieden waren deutliche Unterschiede zwischen Patienten mit und ohne *MYD88*-L265P Mutation zu verzeichnen. Bei Patienten ohne mutiertes *MYD88* war die Zeit vom Übergang vom asymptomatischen in ein symptomatisches Krankheitsstadium verkürzt (Abeykoon et al., 2017). Patienten mit *MYD88* Wildtypstatus benötigten nach ca. fünf Jahren eine Behandlung. Die 10-Jahres-Überlebensrate betrug bei Patienten mit *MYD88*-L265P/*CXCR4*^{mut} 90% und bei Patienten ohne mutiertes *MYD88* 73%. Zudem war die Inzidenz der Transformation in ein DLBCL bei Patienten ohne mutiertes *MYD88* höher als bei Patienten mit *MYD88*-L265P Mutation (in 10 Jahren: mit *MYD88*-L265P 1% vs. ohne *MYD88*-L265P Mutation 8%; in 20 Jahren: 20% bei *MYD88*-L265P und 29% ohne mutiertes *MYD88*). Der Übergang in ein aggressives DLBCL geht mit einer ungünstigeren Prognose und einer höheren Mortalität einher. Bei der höheren Transformationsrate in ein DLBCL bei Patienten mit *MYD88* Wildtypstatus stellt sich die Frage, ob das DLBCL eine wirkliche Transformation oder ein Sekundärmalignom darstellt. Insgesamt wird die Transformation einer WM in ein DLBCL selten beobachtet (Treon et al., 2018).

5.2.6 MYD88-L265P Mutation bei Patienten mit anderen NHL und IgM-MGUS und deren klinische Bedeutung

Bisher wurde in der vorliegenden Arbeit die Bedeutung der *MYD88-L265P* Mutation beim LPL dargelegt. Diese Mutation liegt nicht ausschließlich beim LPL vor, sondern kann auch in anderen Tumorentitäten aus der Gruppe der NHL nachgewiesen werden. Die *MYD88-L265P* Mutation wurde zuerst von Ngo et al. (2011) im ABC DLBCL beschrieben. In dem von der Forschungsgruppe untersuchten Probenkollektiv konnte die *MYD88-L265P* Mutation bei 29% der ABC DLBCL nachgewiesen werden. Die *MYD88-L265P* Mutation konnte auch in DLBCL mit primär kutaner Manifestation (ca. die Hälfte der Fälle) oder ZNS-Manifestation nachgewiesen werden (Swerdlow et al., 2016a). Beim SMZL konnte in bis zu 15% der Fälle eine *MYD88-L265P* Mutation nachgewiesen werden (Martinez-Lopez et al., 2015). Bei 80% der MZL-Fälle mit *MYD88-L265P* Mutation war eine erhöhte Konzentration des IgM-Paraproteins nachweisbar. Zudem stellte sich histologisch ein diffuses Infiltrat mit Zellen plasmazytischer Differenzierung dar (Varettoni et al., 2013). Insgesamt wurde bei den MZL-Fällen mit *MYD88-L265P* Mutationsnachweis eine klinische Ähnlichkeit zur WM festgestellt wie z.B. eine häufiger vorkommende IgM-Paraproteinämie, stärkere Knochenmarkinfiltration (Treon et al., 2012b; Varettoni et al., 2013). In geringem Maße konnte die *MYD88-L265P* Mutation auch in Mucosa associated lymphoid tissue (MALT)-Lymphomen (ca. 9%) und bei der B-CLL (ca. 3%) nachgewiesen werden (Ngo et al., 2011; Puente et al., 2011). Beim MM, der IgA-MGUS und der IgG-MGUS konnte keine *MYD88-L265P* Mutation nachgewiesen werden (Swerdlow et al., 2016a; Swerdlow et al., 2016b; Treon et al., 2012b; Poulain et al., 2013; Jimenez et al., 2013; Xu et al., 2013).

Eine besondere Rolle nimmt die IgM-MGUS ein, da sie nach der WHO-Klassifikation von 2016 als Vorläuferläsion der WM klassifiziert wurde (Swerdlow et al., 2016a). Bei der IgM-MGUS ist die *MYD88-L265P* Mutation in

Einleitung

50-80% der Fälle nachweisbar, was darauf schließen lässt, dass diese Mutation ein frühes onkogenetisches Ereignis in der Entwicklung der WM darstellt (Xu et al., 2013; Jimenez et al., 2013; Paiva et al., 2015). Das Vorhandensein der *MYD88-L265P* Mutation bei der IgM-MGUS geht häufig mit einer höheren Krankheitslast einher: die IgM-Serumspiegel sind deutlich höher, die Bence-Jones-Proteinurie kommt häufiger vor und im Knochenmark liegt eine höhere Plasmazellinfiltration vor (Varettoni et al., 2013; Jimenez et al., 2013). Patienten mit IgM-MGUS und mit *MYD88-L265P* Mutation haben ein höheres Risiko für das Fortschreiten der Erkrankung über die asymptomatische zur symptomatischen WM (Varettoni et al., 2013). Bei der Krankheitsprogression spielen neben der *MYD88-L265P* Mutation *CXCR4* Mutationen und die Serumproteinämie eine Rolle (Varettoni et al., 2017).

5.3 Aktuelle Methoden zur *MYD88-L265P* Mutationsanalyse

5.3.1 Nachweismethoden der *MYD88-L265P* Mutation

Zum Nachweis der *MYD88-L265P* Mutation stehen verschiedene Möglichkeiten zur Verfügung. In der Arbeit von Treon et al. (2012b) wurden Sequenzierungsmethoden verwendet wie z.B. die Sanger-Sequenzierung sowie auf Next Generation Sequencing basierte Ansätze. Varettoni et al. (2013) verwendeten eine Allel-spezifische PCR (AS-PCR) zum Nachweis der *MYD88-L265P* Mutation. In der vorliegenden Arbeit wird die Schmelzpunktanalyse als Methode zum Nachweis der *MYD88-L265P* Mutation verwendet.

5.3.1.1 Sanger-Sequenzierung

Eine Möglichkeit der Detektion von Punktmutationen wie z.B. der *MYD88-L265P*-Mutation ist die Sanger-Sequenzierung. Bei der Sanger-Sequenzierung, welche auch Kettenabbruchmethode genannt wird, werden Didesoxy-Ribonukleotidtriphosphate (ddNTP) verwendet, welche keine 3'-Hydroxylgruppe

Einleitung

haben. So ist nach Einbau dieser Nukleotide bei der PCR keine weitere Strangverlängerung mehr möglich, da keine Verknüpfung zum nächsten Nukleotidtriphosphat hergestellt werden kann. Nach der Denaturierung und somit Trennung der DNA-Doppelstränge liegen DNA-Einzelstränge vor. Diese werden zu einem Reaktionsansatz mit Primern, DNA-Polymerase, dNTP (desoxy-Nukleotidtriphosphate) sowie ddNTPs gegen. Die ddNTP sind mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Nach erfolgter Strangsynthese entstehen Fragmente unterschiedlicher Längen. Diese Fragmente werden anschließend der Länge nach in einer Gelelektrophorese aufgetrennt. Die Fragmente werden durch die Fluoreszenzfarbstoffe detektiert (Sanger et al., 1977). Anhand der ermittelten Basenabfolge kann zwischen Wildtypsequenz und Mutationssequenz unterschieden werden.

5.3.1.2 Allel-spezifische PCR (AS-PCR)

Eine weitere Möglichkeit zur Mutationsanalyse ist die AS-PCR. Diese Methode wurde von Varettoni et al. (2013) und Xu et al. (2013) verwendet. Bei der AS-PCR werden zwei Reaktionsansätze mit zwei unterschiedlichen forward-Primern zur Amplifikation angesetzt. Ein Primer ist komplementär zur Wildtypsequenz, während der andere komplementär zur mutierten Sequenz ist. Dabei sollte die potentiell mutierte Base am Primerende liegen. Eine Amplifikation erfolgt nur bei komplementär vorliegender Sequenz der eingesetzten DNA. Mit dieser Methode wird eine höhere Sensitivität als mittels Sanger-Sequenzierung erreicht.

5.3.1.3 Mutationsanalyse mittels Schmelzpunktanalyse

Die Mutationsanalyse mittels einer Schmelzpunktanalyse ist Teil der vorliegenden Arbeit. Zunächst wird eine Amplifikation mittels Real-Time-PCR durchgeführt und anschließend erfolgt eine Mutationsanalyse mittels Schmelzpunktanalyse. Das unterschiedliche Schmelzverhalten einer Fluoreszenz-markierten Sonde beim mutiertem und nicht mutiertem *MYD88*

Einleitung

wird dabei zur Detektion der *MYD88*-L265P Mutation genutzt. (Abbildung 2). Die Detektion der Fluoreszenz erfolgt kontinuierlich bei Erhöhung der Temperatur von 40°C bis 95°C.

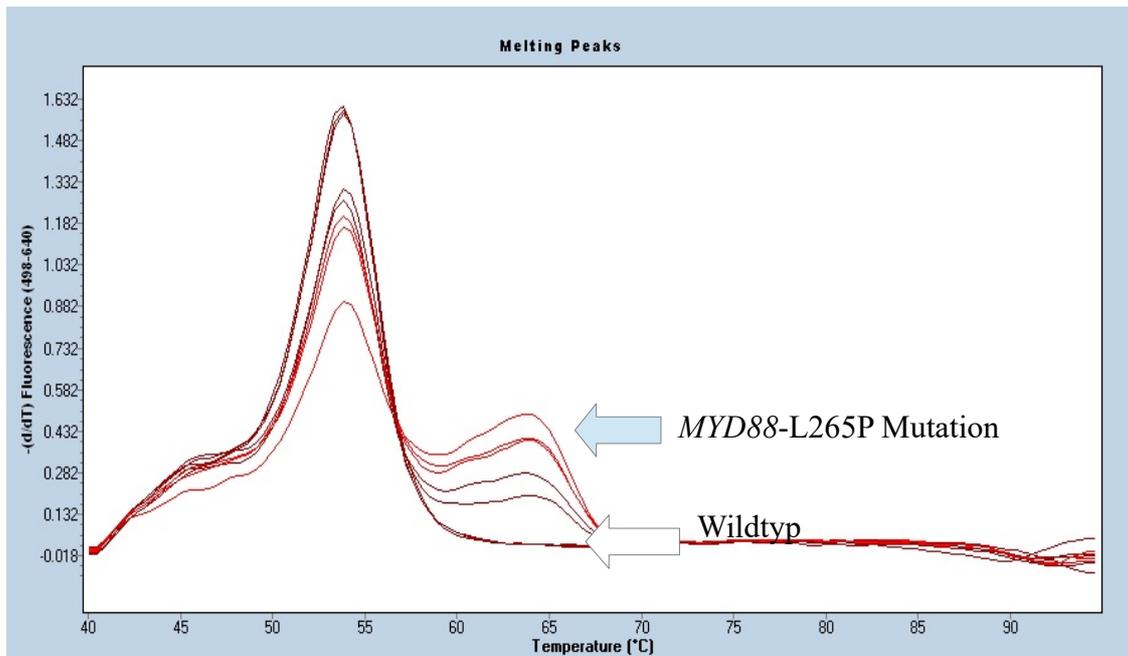


Abbildung 2: Exemplarischer Schmelzpunktverlauf von sechs Patientenproben.

Fünf Proben mit positivem *MYD88*-L265P Mutationsnachweis und eine Probe ohne *MYD88*-L265P Mutationsnachweis.

5.4 Zielsetzung der Arbeit

In der Tumordiagnostik von lymphoproliferativen Erkrankungen wie den NHL kann anhand der klinischen Präsentation und der Tumormorphologie nicht immer eine eindeutige diagnostische Zuordnung erfolgen. Insbesondere die Differenzierung zwischen dem LPL, dem MZL, der B-CLL sowie dem MM ist zum Teil schwierig. Somit sind Differenzierungsmöglichkeiten zwischen den verschiedenen Tumorentitäten diagnostisch und therapeutisch relevant.

Die *MYD88*-L265P Mutation ist möglicherweise an der Tumorentstehung und Aufrechterhaltung der Erkrankung, mittels Aktivierung des NF- κ B-Signalweges,

Einleitung

beteiligt (Ngo et al., 2011). Bei Patienten mit LPL ist die *MYD88-L256P* Mutation in der Literatur bei 67% bis nahezu 100% nachweisbar (Gachard et al., 2013; Varettoni et al., 2013). Nicht bei allen genannten NHL spielt diese Mutation eine Rolle. Bei Patienten mit B-CLL liegt der Mutationsanteil ungefähr bei 3% und beim MZL liegt der Anteil an nachgewiesener *MYD88-L265P* Mutation bei ca. 6-10%. Bei Patienten mit MM konnte die *MYD88-L265P* Mutation nicht nachgewiesen werden. (Treon et al., 2012b; Varettoni et al., 2013; Puente et al., 2011; Poulain et al., 2013; Jimenez et al., 2013; Xu et al., 2013).

Eine Fragestellung, mit der sich diese Arbeit beschäftigt, ist, ob die Häufigkeitsverteilung der *MYD88-L265P* Mutation bei verschiedenen NHL auch bei einem Kollektiv des Instituts für Pathologie und Neuropathologie Tübingen bestätigt werden kann. Zudem stellt sich die Frage, ob die *MYD88-L265P* Mutation als Unterscheidungsmerkmal in der Differentialdiagnose verschiedener NHL verwendet werden kann.

Zum Mutationsnachweis können verschiedene Materialien verwendet werden wie z.B. Knochenmark, peripheres Blut oder Lymphknoten. Zur Differentialdiagnose bzw. erneuten diagnostischen Begutachtung der Routinediagnostik steht häufig in Formalin fixiertes Gewebe (FFPE) wie z.B. FFPE-Knochenmark zur Verfügung. In der vorliegenden Arbeit wurden FFPE-Knochenmarksbiopsien verwendet. Somit war eine Fragestellung der Arbeit, ob der Mutationsnachweis mit FFPE-Knochenmarkgewebe mit der Schmelzpunktanalyse möglich ist.

Zum Mutationsnachweis der *MYD88-L265P* Mutation stehen verschiedene Nachweismethoden zur Verfügung wie z.B. Sequenzierungsmethoden (Sanger-Sequenzierung, Next generation Sequencing) oder die AS-PCR. Eine weitere Möglichkeit ist die Schmelzpunktanalyse, bei der das unterschiedliche Schmelzverhalten von mutierten und nicht mutierten Sonden analysiert wird. Bei den Methoden gibt es durch eine unterschiedliche Genauigkeit der Methode unterschiedlich hohe Nachweisraten. Somit stellt sich die Frage, ob die Schmelzpunktanalyse eine geeignete Methode beim Nachweis der *MYD88-*

Einleitung

L256P Mutation ist.

Im entnommenen Material (wie z.B. Knochenmark beim LPL) besteht nicht immer eine 100%-ige Tumorerfiltration. Bei gesundem Gewebe liegt nicht mutiertes *MYD88* vor. Ist der Tumoranteil im zu analysierenden Gewebe besonders gering, so ist ein vergleichsweise hoher Anteil an nicht mutiertem *MYD88* im Vergleich zur *MYD88-L265P* Mutation nachzuweisen. Eine weitere Zielsetzung der Arbeit war die Frage wie hoch die Tumorerfiltration im Knochenmark sein sollte, damit ein Nachweis der *MYD88-L65P* Mutation mittels Schmelzpunktanalyse noch zuverlässig möglich ist.

6 Material und Methoden

6.1 Material

6.1.1 Patientenproben im Studienkollektiv

Für die Analyse der *MYD88-L265P* Mutation wurden in Paraffin eingebettete und in Formalin fixierte (FFPE) Knochenmarkbiopsien von Patientenfällen mit LPL und im Vergleich dazu Patientenfälle mit MZL und Patientenfälle mit B-CLL verwendet. Die Proben stammen aus dem Archiv des Pathologischen Instituts der Universitätsklinik Tübingen. Ausgewählt wurden die Studienproben durch primäre Klassifizierung anhand Histologie und Immunhistochemie.

Die Studie wurde vom Ethik-Komitee der medizinischen Fakultät genehmigt (Projektnummer: 105/2013BO2).

6.1.2 Verzeichnis der verwendeten Reagenzien und Geräte

Chemikalien	Hersteller
Aqua dest.	Invitrogen life technologies, Carlsbad, CA, USA
Chloroform / Isomylalkohol (Mischungsverhältnis 24: 1)	Merck, KGaA, Darmstadt
Ethanol	Merck, KGaA, Darmstadt
Lithiumchlorid (8 M)	Merck, KGaA, Darmstadt
Phenol /Chloroform/ Isoamylalkohol (Mischungsverhältnis 25 : 24 : 1)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Xylol	VWR, Darmstadt
LE Agarose	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf

Reagenzien	Hersteller
AmpliQ Gold DNA Polymerase	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
GelRed Nucleic Acid Stain	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Gene Ruler 100 bp DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

Material und Methoden

dNTP-Mix (10 mM)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Master HybProbe 10x conc.	Roche Diagnostics, Mannheim
Loading Dye	Fermentas, Burlington, Canada
Proteinase K	Carl Roth GmbH, Karlsruhe

Puffer	Hersteller
SDS-Lyse-Puffer (pH 8,5): - Tris(hydroxymethyl)-aminoethan (50 mM) - EDTA (1 mM)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe Merck, KGaA, Darmstadt
TBE-Puffer: - Tris(hydroxymethyl)-aminoethan (0,89 M) - Borsäure (0,89 M) - EDTA-Na(0,02 M)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe Merck, KGaA, Darmstadt Merck, KGaA, Darmstadt

Primer mit Primersequenz 5'- 3'	Hersteller
Primer-Mix Primersequenzen: AF4/X3U: GGAGCAGCATTCCATCCAGC AF4/X3L: CATCCATGGGCCGGACATAA AF4/X11U: CCGCAGCAAGCAACGAACC AF4/X11L: GCTTTCCTCTGGCGGCTCC PLZF/X1U: TGCGATGTGGTCATCATGGTG PLZF/X1L: CGTGTCATTGTCGTCTGAGGC RAG1/X2U: TGTTGACTCGATCCACCCCA RAG1/X2L: TGAGCTGCAAGTTTGGCTGAA TBXAS1/X9U: GCCCGACATTCTGCAAGTCC TBXAS1/X9L: GGTGTTGCCGGAAGGGTT F4X3 in der Konzentration 2,5 µM, alle anderen mit 1,25 pmol → 200 µl Mix: 8 x 2,5 µl (andere Primer) + 2 x 5 µl AF4/X3 + 170 µl Aqua dest.)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Forward Primer 5'- TGCAGGGGTTGGTGTAGT-3'	TIB Molbiol, Berlin
Reverse Primer 5'-GTTGTTAACCCCTGGGGTTG-3'	TIB Molbiol, Berlin
HypProbe Probe L265P mut 5'-CAGAAGCGACCGATCCCC-3'	TIB Molbiol, Berlin
HypProbe Probe L265P anc 5'-CAGTACAAGGCAATGAAGAAAGAGTTCCC-3'	TIB Molbiol, Berlin
LNA-Oligomer 5'-AAGCGACTGATCCCC-3'	TIB Molbiol, Berlin

Material und Methoden

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
Reaktionsgefäße (1,5 ml + 0,5 ml Eppendorfcups)	Eppendorf, Köln/Wesseling, Deutschland
Safe Seal Tips (Pipettenspitzen)	Biozym Scientific GmbH Hess. Oldendorf; Biozym Biotechn Trading GmbH, Wien, Österreich
96-Well-Platte	Roche Applied Science, Penzberg, Deutschland

Geräte	Hersteller
Geldokumentations-System	Peqlab, Erlagen
Heizblock	WEALTEC Corp, Sparks, NV, USA
LightCycler 480 II	Roche Diagnostics, Mannheim
Magnetrührer (IKAMAG TCT)	IKA-Werke, Staufen im Breisgau
Nanodrop 2000 Spectrophotometer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Pipetten Gilson (diverse Pipetten)	Middelton, WI, USA
Thermocycler	Cycler GeneAmp PCR System 9700, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA FlexCycler, Analytik Jena, Jena
Thriller Thermo-Inkubationsmischer	Peqlab, Biotechnologie GmbH, Erlangen
UV-Bestrahlungsgerät HERAsafe	Thermo Scientific/DHarmacon, Lafayette, Co, USA
Vakuumentrifuge	Eppendorf Concentrator 5301, Eppendorf, Hamburg
Vortexer (Vortex-3-Genie)	Scientific Industries, NY, USA
Zentrifuge (Biofuge fresco)	Heraeus Instruments, Hanau

Software	Hersteller
Nexus/PAS-NET	Nexus AG, Frankfurt am Main, Deutschland
Nanodrop 2000 Spectrophotometer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
LightCycler 480 Software	Roche Applied Science, Penzberg, Deutschland

6.2 Methoden

6.2.1 Extraktion und Aufreinigung der DNA aus FFPE-Gewebe

Um Analysen der genomischen DNA der Patientenproben durchführen zu können, musste diese aus dem FFPE-Gewebe extrahiert und aufgereinigt werden. Hierzu wurde das Gewebe entparaffiniert, die Zellen lysiert, um die DNA frei zu setzen und anschließend wurde das Lysat aufgereinigt. Zunächst wurde die Entparaffinierung durchgeführt. Aus den FFPE-Knochenmarkbiopsien wurden für die DNA-Extraktion fünf Gewebsschnitte mit einer Dicke von 5 µm in ein 1,5 ml- Reaktionsgefäß gegeben. Dazu wurde jeweils 1 ml Xylol gegeben. Die Ansätze wurden für 5 s gevortext und anschließend 5 min inkubiert. Danach wurde die Probe bei 13.000 rpm für 5 min zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Der gesamte Ablauf wurde wiederholt. Danach wurde 1 ml 100%iger Ethanol zum Ansatz gegeben, 5 s gevortext, 5 min inkubiert und anschließend 5 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und verworfen. Der Ablauf wurde einmal wiederholt. Anschließend wurde das entparaffinierte Gewebe bei 30°C im Thermoschüttler (Peqlab) mit offenem Deckel getrocknet, bis das Ethanol vollständig verdampft war. Im nächsten Arbeitsschritt wurden die Zellen lysiert, um die DNA aus den Zellen frei zu setzen. Hierfür wurden 300 µl DNA-Lysepuffer (TE-Puffer, pH 8,5) zu dem Gewebe gegeben und für 10 min bei 95°C im Heizblock (mit geschlossenem Deckel) inkubiert. Nach kurzer Zentrifugation und 2-minütiger Abkühlung wurden 20 µl Protease K zum Ansatz gegeben. Dann folgte die erste Inkubation (über Nacht) bei 56°C und 500 rpm im Thermoschüttler. Am nächsten Morgen wurde die Probe für 10 min bei 95°C im Thermoschüttler erhitzt, anzentrifugiert und nach 2-minütiger Abkühlung wurden weitere 10 µl Protease dazugegeben. Daraufhin wurde die Probe ein zweites Mal bei 56°C und 500 rpm inkubiert. Am dritten Tag erfolgte eine visuelle Kontrolle, um einen vollständigen Verdau des Gewebes sicher zu stellen. War dies nicht der Fall,

Material und Methoden

wurde ein erneuter Zyklus bestehend aus Protease-Zugabe (10 µl) und Inkubation bei 56°C und 500 rpm im Thermoschüttler für 1 h angeschlossen. Nach vollständigem Verdau des Gewebes erfolgte die Phenol-Chloroform-Aufreinigung, um die DNA aus dem Lysat zu isolieren. In einem ersten Schritt wurde ein Volumen (340 µl) Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (PCI) zum Lysat gegeben, gevortext und für 5 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Diese führte zu einer Phasentrennung, wobei die obere (wässrige) Phase, welche die aus den Zellen frei gesetzte DNA enthält, vorsichtig abgenommen wurde und in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt wurde. In das Ausgangsgefäß wurden anschließend 150 µl ddH₂O gegeben, gevortext und erneut bei 13.000 rpm für 5 min zentrifugiert. Der wässrige Überstand (obere Phase) wurde ebenfalls abgenommen und zum vorherigen wässrigen Überstand gegeben. Der gesamte Prozess (Zugabe eines Volumens (340 µl) PCI, vortexen, 5 min bei 13.000 rpm zentrifugieren, wässrige Phase abnehmen) wurde wiederholt und der wässrige Überstand wurde in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurden ein Volumen (340 µl) Chloroform/IAA (24:1) zu dem Überstand gegeben, gevortext und für 5 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Die obere Phase wurde in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß, in dem 40 µl 8 M Lithiumchlorid vorgelegt waren, überführt. Nach Zugabe von 1 ml 100%igem Ethanol (Ziel: DNA Fällung) wurde der Ansatz gemischt und für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Proben für 30 min bei 4°C und 13.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und verworfen, 200 µl 70%iges Ethanol (-20°C) wurden zur pellierten DNA gegeben. Dieser Ansatz wurde für 5 min bei 4°C und 13.000 rpm zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstands wurde die DNA im Thermoschüttler bei 30°C getrocknet. Das getrocknete DNA-Pellet wurde je nach DNA-Menge mit 30-50 µl ddH₂O (je nach Pelletgröße) gelöst. Die Messung der DNA-Konzentration erfolgte am NanoDrop 2000.

6.2.2 PCR zur Analyse der Amplifizierbarkeit der DNA

Das DNA-Material, das aus FFPE-Gewebe gewonnen wurde, ist als Folge der Formalin-Fixierung fragmentiert, sodass die Länge der einzelnen DNA-Stücke je nach Qualität des Materials eine unterschiedlich kurze Länge an Basenpaaren aufweisen. Somit hängt die Amplifizierbarkeit der DNA aus FFPE-Material von der Fragmentierung und der Produktlänge der gewünschten PCR ab. Mit Hilfe einer PCR zur Analyse der Amplifizierbarkeit unterschiedlich langer Produkte wurde die Qualität der DNA vor Durchführung der *MYD88* Mutationsanalyse untersucht. Die PCR zur Analyse der Amplifizierbarkeit der DNA erfolgte in einem 25 µl-Ansatz (siehe Tabelle 2). Die eingesetzten Primer amplifizieren dabei fünf spezifische Regionen die in folgenden Genen lokalisiert sind: *TBXAS1*, *RAG*, *PLZF*, *AF4* (Exon 3; Exon 11). Die ausgewählten Gene enthalten große Exons mit einem Open Reading Frame. Das Risiko für Polymorphismen ist gering, wodurch eine hohe Amplifizierbarkeit möglich ist. Die Primerbindungsstellen sind so gewählt, dass PCR-Produkte unterschiedlicher Länge entstehen: 100 bp (*TBXAS1*), 200 bp (*RAG1*), 300 bp (*PLZF*), 400 bp (*AF4*, Exon 3) und 600 bp (*AF4*, Exon 11) (van Dongen et al., 2003). Es wurde ein Mastermix (Tabelle 2) angesetzt, von welchem pro Probe 24 µl in 0,2 ml-Reaktionsgefäße überführt wurden. Dazu wurde 1 µl der isolierten DNA mit einer eingestellten Konzentration von 100 ng/µl zugegeben. Zusätzlich wurden bei jeder PCR eine Positivkontrolle (DNA 100 ng/µl) und eine Negativkontrolle mitgeführt. Anstatt der DNA wurde bei der Negativkontrolle 1 µl ddH₂O in das Reaktionsgefäß gegeben.

Material und Methoden

Tabelle 2: Tabellarische Darstellung des PCR-Protokolls

Volumen	Reagenzien	Endkonzentration
16,8 µl	Aqua dest.	
2,5 µl	10x PCR-Puffer	
2,0 µl	Magnesiumchlorid	2 mM
0,4 µl	dNTPs	0,16 mM
2,0 µl	Primer Mix	Siehe Tabelle 2 (Primer)
0,3 µl	AmpliTaq Gold DNA Polymerase	1,7 U
1,0 µl	DNA (100 ng/µl) oder Aqua dest.	

Der Vorgang verlief in einem definierten Temperatur- und Zeitschema (Tabelle 3). Bei einer Temperatur von 95°C wurden die DNA Doppelstränge getrennt. Anschließend fand bei einer Temperatur von 60°C das Annealing der Primer (forward and reverse) an das zu amplifizierende DNA-Fragment statt. Die Elongation durch die Taq-Polymerase fand bei 72°C statt. Insgesamt liefen 35 Zyklen, bestehend aus Denaturierung, Annealing und Elongation ab. Am Ende erfolgte eine Kühlung der fertiggestellten DNA-Sequenzen bei 12°C, bevor diese weiterverarbeitet wurden. Nach Beendigung der PCR wurden die PCR-Produkte entweder bei -20°C aufbewahrt oder mit einer Agarose Gelelektrophorese aufgetrennt.

Tabelle 3: PCR- Programm zur Analyse der Amplifizierbarkeit der DNA

Zeit	Temperatur	PCR- Schritt	Zyklen
7 min	95°C	Denaturierung	1
45 s	95°C	Denaturierung	35
45 s	60°C	Annealing der Primer	
90 s	72°C	Elongation mit Taq-Polymerase	
10 min	72°C	Amplifikation	1
Hold	12°C	Kühlung	

6.2.3 Agarose Gelelektrophorese

Die PCR-Produkte der PCR zur Analyse der Amplifizierbarkeit der DNA wurden mit Hilfe einer Agarose Gelelektrophorese nach ihrer Größe und Ladung

Material und Methoden

aufgetrennt. Dazu wurde zuerst ein 2%iges Agarose-Gel wie folgt hergestellt: In einem Erlenmeyerkolben wurden 2 g ME Agarose abgewogen und mit 100 ml TBE-Puffer versetzt. Der Ansatz wurde in einem Mikrowellengerät gekocht, bis sich die Agarose vollständig aufgelöst hatte. Nach Abkühlung auf 60°C wurden 10 µl GelRed-Lösung zugegeben und anschließend wurde das Gel in eine Gießvorrichtung gegossen. GelRed ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der zum Anfärben von Nukleinsäuren z.B. im Rahmen der Agarose Gelelektrophorese, dient. Er ersetzt das früher verwendete toxische Ethidiumbromid. Anschließend wurde die Elektrophorese durchgeführt. Dazu wurden 15 µl der jeweiligen Probe und 2 µl Ladepuffer miteinander vermischt und in die Geltaschen des Agarosegels überführt. In die erste Geltasche wurden 10 µl Gene Ruler 100 bp DNA Ladder, einem geeigneten Größenmarker zur Beurteilung der Länge der PCR-Produkte, überführt. Die Auftrennung der DNA-Fragmente nach der Länge erfolgte bei 140 Volt und 500 Watt für 45 min. Das Prinzip der Elektrophorese ist, dass die negativ geladene DNA zum positiven Pol (der gegenüberliegende Pol der Geltaschen) wandert. Dabei werden die Fragmente der Größe nach aufgetrennt. Das heißt, dass kleinere DNA-Fragmente schneller wandern als größere, da sie auf Grund der geringeren Größe schneller durch die Poren des Agarosegels wandern können. Nach Abschluss der Elektrophorese wurden die DNA-Banden unter UV-Licht im Geldokumentations-System (Preqlab, Erlangen) sichtbar gemacht photographisch festgehalten.

6.2.4 MYD88-Mutationsanalyse mittels Schmelzpunktanalyse und LNA-basierter Wildtypsuppression

Die Schmelzpunktanalyse diente dem Nachweis oder dem Ausschluss der MYD88-L265P Mutation in den Patientenproben. Die Mutationsanalyse wurde primär für FFPE-Knochenmarkproben etabliert. Zunächst wurde eine Real-Time PCR durchgeführt, um ausreichend Amplifikate zur Analyse in der Schmelzpunktanalyse zur Verfügung zu haben. Bei der Untersuchung werden

Material und Methoden

fluoreszenzmarkierte Hybridisierungssonden (HypProbes) eingesetzt. Die Sonde HypProbe mutation (mut) ist komplementär zur DNA-Sequenz der *MYD88*-L265P Mutation. Beim sequenzspezifischen Detektionsansatz binden die Sonden HypProbe anchor (anc) und HypProbe mut benachbart auf der Zielsequenz (im Bereich der *MYD88*-L265P Mutationssequenz). Am 5'-Ende der HypProbe anc ist ein Fluorophor anhängig. Am 3'-Ende der HypProbe mut ist die oben genannte Fluoreszenzmarkierung (Fluorescein) anhängig. Mittels Licht-emittierender Diode (LED)-Lichtquelle nimmt die Sonde HypProbe anc über ein Fluorophor Lichtenergie auf, welche bei unmittelbarer Nähe auf die Sonde HypProbe mut übertragen wird. Diesen Vorgang nennt man Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET). Wird die Temperatur erhöht, so dissoziieren die Sonden wieder, wodurch die Sonden den Kontakt zueinander verlieren, womit kein FRET mehr möglich ist. Daraus resultiert eine Abnahme des Fluoreszenzsignals. Zur Detektion der Mutation wurden die Sonden so gewählt, dass eine Sonde in der Mutationsstelle liegt und die andere Sonde liegt in der Nähe der Mutation. Die Sonden müssen in räumlicher Nähe binden, damit ein FRET möglich ist. Mit dem Prinzip der benachbarten Sonden wird eine höhere Spezifität beim Mutationsnachweis erzielt, da so die Wahrscheinlichkeit einer willkürlichen Bindung am DNA-Strang geringer ausfällt. Im LightCycler wird unter kontinuierlicher Messung der Fluoreszenz die Temperatur allmählich erhöht, um das Abschmelzverhalten der Sonden von der Zielsequenz zu erfassen. Auf Grund der Punktmutation im *MYD88* ist die Passgenauigkeit der HypProbe mut zur Sequenz mit *MYD88*-L265P Mutation besser als zu der Sequenz ohne Mutation. Somit dissoziiert die Sonde bei Temperaturanstieg auf Grund der weniger stabilen, fehlgepaarten Sonden früher von der nicht mutierten Sequenz als von der Mutationssequenz. Nach dem Dissoziieren der Sonden kann kein weiterer FRET stattfinden, wodurch das Fluoreszenzsignal allmählich abnimmt. Im Schmelzkurvenverlauf ergeben sich bei der Wildtyp-Sequenz und bei der Mutationssequenz unterschiedliche Maxima. Die Wildtyp-Sequenz weist ein Maximum bei 54°C auf, wohingegen

Material und Methoden

die Mutationssequenz bei 62°C ein weiteres Maximum aufweist. Dadurch sind die beiden Varianten unterscheidbar.

Bei der Schmelzpunktanalyse wurde ein Reaktionsansatz unter anderem bestehend aus einem Forward und Reverse Primer, HypProbes (mut und anc), einem Mastermix sowie der zu untersuchenden DNA angesetzt. Zunächst wurde zur Amplifikation der zu untersuchenden DNA eine PCR durchgeführt. Zu Beginn erfolgte die Mutationsanalyse mit den DNA-Proben der Patienten mit diagnostiziertem LPL und einem mittleren bis hohen Tumorinfiltrationsgehalt (50% und mehr), um die Schmelzkurven anhand eindeutiger Ergebnisse zu etablieren. Im Verlauf wurden auch Proben mit einem Infiltrationsanteil von unter 30% untersucht, um die Nachweisgrenze für die Mutationsanalyse abschätzen zu können. Des Weiteren wurden Proben von Patienten mit MZL und B-CLL auf das Vorliegen der *MYD88*-L265P Mutation untersucht.

Im Falle einer geringen LPL-Tumorinfiltration im Präparat kann es sein, dass trotz Amplifikation mittels PCR eine geringe Menge an Tumor-DNA und somit eine geringe Menge *MYD88*-L265P Mutation in der zu analysierenden DNA vorhanden ist. Somit kann es sein, dass die geringe Menge an Mutationssequenz kein ausreichend hohes Fluoreszenzsignal abgeben kann, wodurch die Probe nicht eindeutig als mutiertes oder nicht mutiertes Gewebe eingeordnet werden kann. Zur Erhöhung der Sensitivität kann ein LNA-Oligomer eingesetzt werden. Das LNA-Oligomer bindet durch intermolekulare Bindungen stärker an die Wildtyp-DNA und dissoziiert somit von dieser erst bei höheren Temperaturen als von der Mutationssequenz. Dadurch sinkt die Amplifikationsrate der Wildtyp-DNA. Die Amplifikation der *MYD88*-L265P Mutation wird vom LNA-Oligomer nicht beeinträchtigt. Somit liegt nach Ablauf der PCR eine höhere Menge an mutierter DNA als an nicht mutierter DNA im Reaktionsansatz vor. Entsprechend kann das mutationstypische Fluoreszenzsignal deutlicher ermittelt werden und eindeutiger vom Signal der nicht mutierten DNA unterschieden werden. Für die Analyse wurden pro Probe

Material und Methoden

zwei Reaktionsansätze, eine mit und eine ohne Zugabe eines LNA-Oligomers, angesetzt (Tabelle 4 und Tabelle 5). In der Studie wurden unterschiedliche Konzentrationen (0,005 mM, 0,006 mM und 0,01 mM) des LNA-Oligomers ausgetestet. Die Konzentration des LNA-Oligomers im Reaktionsansatz darf nicht zu hoch sein, da das Oligomer sonst an die Mutation binden könnte. Bei einer zu geringen Konzentration erfolgt jedoch keine ausreichende Wildtypsuppression. Im Verlauf der Studie wurde die Entscheidung getroffen, dass für künftige Analysen eine LNA-Konzentration von 0,01 mM verwendet werden sollte.

Tabelle 4: 20 µl- Ansatz Schmelzpunktanalyse (ohne LNA-Oligomer)

Volumen	Reagenzien	Endkonzentration
9,0 µl	Aqua dest.	
1,0 µl	25 mM Magnesiumchlorid	Insgesamt 2,25 mM
2,0 µl	5 µM PCR Primer F (Forward)	0,5 µM
2,0 µl	5 µM PCR Primer A (Reverse)	0,5 µM
1,0 µl	4 µM HypProbe L265P mut	0,2 µM
1,0 µl	4 µM HypProbe L265P Anc	0,2 µM
2,0 µl	Master HypProbe 10x conc.	1x conc.
2,0 µl	DNA (50 ng/µl)	100 ng

Tabelle 5: 20 µl- Protokoll Schmelzpunktanalyse (mit LNA-Oligomer am Beispiel der LNA-Konzentration 0,1 µM)

Volumen	Reagenzien	Endkonzentration
7,8 µl	Aqua dest.	
1,0 µl	25 mM Magnesiumchlorid	Insgesamt 2,25 mM
2,0 µl	5 µM PCR Primer F (Forward),	0,5 µM
2,0 µl	5 µM PCR Primer A (Reverse)	0,5 µM
1,0 µl	4 µM HypProbe L265P mut	0,2 µM
1,0 µl	4 µM HypProbe L265P Anc	0,2 µM
2,0 µl	Master HypProbe 10x conc.	1x conc.
2,0 µl	DNA (50 ng/µl)	100 ng
1,19 µl	LNA- Oligomer	0,1 µM

Pro Probe wurden 18 µl Mix in eine Vertiefung einer 96-Well-Platte überführt und mit 2 µl DNA gemischt. Zusätzlich wurde eine Positivkontrolle (DNA einer MYD88-L265P positiven ABC-DLBCL-Probe) und eine Negativkontrolle (ddH₂O) mitgeführt. Für die Negativkontrolle wurden anstatt der 2 µl DNA 2 µl DNase-

Material und Methoden

und RNase-freies ddH₂O zugegeben. Die Platte wurde anschließend bei 1000 rpm kurz zentrifugiert. Danach erfolgte die Analyse der Proben am LightCycler480 (Roche Diagnostics, Mannheim (Tabelle 6)).

Tabelle 6: LightCycler Programm „HypProbe MYD88“:

Vorgang	Zyklen	Temperatur	Zeit
Pre- Incubation	1	95°C	10 min
Amplification	50	95°C	15 sec
		50°C	30 sec
		72°C	30 sec
Melting Curve	1	95°C	1 min
		40°C	2 min
		95°C	---
Cooling	1	40°C	30 sec

Nach Beendigung des Programms wurden die Daten mittels der Software im LightCycler 480 (Roche Diagnostics, Mannheim) analysiert, welches die PCR-Kurve berechnet und die Schmelzkurve graphisch als mathematisch erste Ableitung davon dargestellt. In der ersten Ableitung der nicht mutierten Sequenz gibt es nur ein Maximum bei 54°C. Bei der Mutationssequenz existiert ein Maximum der Schmelzkurve bei 62°C.

7 Ergebnisse

7.1 Zusammensetzung des Studienkollektivs

Bei der Fallauswahl wurde die Knochenmarkinfiltration der Proben berücksichtigt. Nur Fälle mit 10% oder mehr Tumoranteil wurden in die Studie integriert. Zur Erprobung der Methode wurden anfangs Patientenfälle mit mittlerem bis hohem Infiltrationsanteil (zwischen 40% und 100%) einbezogen, später aber auch Fälle mit einem Infiltrationsgehalt von 10-30%. Zunächst wurden die Patientenproben mit hohem Tumorgehalt untersucht, da in diesen Proben ein höherer Anteil an *MYD88-L265P* Mutation zu erwarten ist, als bei den Fällen mit niedrigerem Infiltrationsgehalt. Bei der Etablierung der Methode sollte überprüft werden bis zu welchem Infiltrationsgehalt ein Mutationsnachweis mit der Schmelzpunktanalyse möglich ist. Pro Patientenfall wurde maximal eine Gewebeprobe untersucht. Der Probe mit eindeutiger Diagnose und höherem Infiltrationsanteil wurde bei der Fallauswahl Vorrang gegeben. Für die Analyse der *MYD88-L265P* Mutation wurden 40 Patientenfälle mit LPL und im Vergleich dazu zehn Patienten mit MZL und elf Patienten mit CLL untersucht (Tabelle 7).

Tabelle 7: Verteilung der der Tumorentitäten.

Tumorentität	Anzahl	Anteil in %
LPL	40	65.6%
MZL	10	16.4%
B-CLL	11	18.0%

7.1.1 Änderung des Studienkollektivs nach erneuter diagnostischer Begutachtung

Im Rahmen der Studie wurde jede Probe erneut histopathologisch begutachtet und es wurde eine *MYD88-L265P* Mutationsanalyse durchgeführt. Dabei

Ergebnisse

änderte sich bei neun Proben die ursprünglich gestellte Diagnose. Sechs Proben aus dem LPL-Kollektiv wurden dem MM zugeordnet, eine weitere Probe aus diesem Kollektiv wurde diagnostisch als MZL eingeordnet. Zwei Proben, die ursprünglich als MZL diagnostiziert wurden, wurden als LPL reklassifiziert. Bei den Proben im B-CLL-Kollektiv ergaben sich keine Änderungen. Somit ergab sich eine tatsächliche Verteilung von 35 Proben LPL, elf Proben B-CLL, neun Proben MZL und sechs Proben mit MM (Tabelle 8).

Tabelle 8: Anzahl der jeweiligen Tumorentitäten LPL, B-CLL, MZL, MM am Gesamtkollektiv nach erneuter histopathologischer Begutachtung und Mutationsanalyse.

Tumorentität	Anzahl	Anteil in %
LPL	35	57.3%
MZL	9	14.6%
B-CLL	11	18.0%
MM	6	9.8%

7.1.2 Tumorinfiltrationsgehalt der in die Studie eingeschlossenen NHL

Insgesamt lag der Tumorinfiltrationsgehalt der Proben zwischen < 10% und nahezu 100%. Elf der 35 LPL-Proben (31,4%) wiesen einen hohen Infiltrationsgehalt (zwischen 70 und 100%) auf. Weitere elf Proben (31,4%) wiesen einen mittleren Infiltrationsgehalt (zwischen 30 und 65%) auf. Bei 13 Proben (37,1%) lag der Tumorinfiltrationsgehalt zwischen 10 und 30%. Bei der B-CLL betrug der Anteil der Proben mit hohem Infiltrationsgehalt (70-100%) 63,6% (sieben von elf Proben). Der Anteil an mittlerem (30-65%) und niedrigem (10-30%) Infiltrationsgehalt lag bei der B-CLL jeweils bei 18,2% (je zwei von elf Proben). Im Probenkollektiv des MZL waren je 22,2% (zwei von neun Proben) mit hohem (70-100%) und mittlerem (30- 65%) Infiltrationsgehalt und 55,6% (fünf von neun Proben) mit niedriger Tumorinfiltration (10-30%). Beim MM lag bei einer Probe ein hoher Infiltrationsgehalt (16,7%), bei zwei Proben ein mittlerer (33,3%) und bei drei Proben (50%) ein niedriger

Ergebnisse

Tumorinfiltrationsgehalt vor (Abbildung 3).

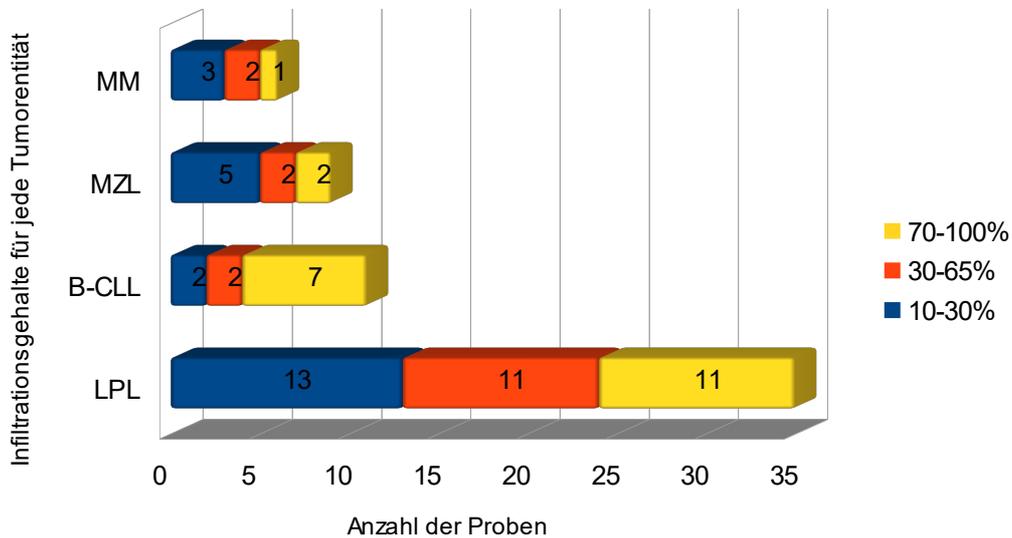


Abbildung 3: Übersicht der Infiltrationsgehalte der Proben der einzelnen Tumorentitäten.
Sortiert nach niedriger (10-30%), mittlerer (30-65%) und hoher (70-100%) Infiltration.

7.2 Amplifizierbarkeit der aus FFPE-Gewebe extrahierten DNA

Zur Beurteilung der Produktlängen der PCR-Produkte wurden die Amplifikate gelelektrophoretisch aufgetrennt und mit GelRed-Lösung zur Sichtbarkeit angefärbt (exemplarische Resultate Abbildung 4). Für den Mutationsnachweis sollten Produktlängen von 200 bp oder mehr amplifiziert werden, um sicher zu stellen, dass die Fragmentierung im jeweiligen Fall eine Amplifikation der für die *MYD88*-Mutationsanalyse benötigten Produktlänge erlaubt.

Ergebnisse

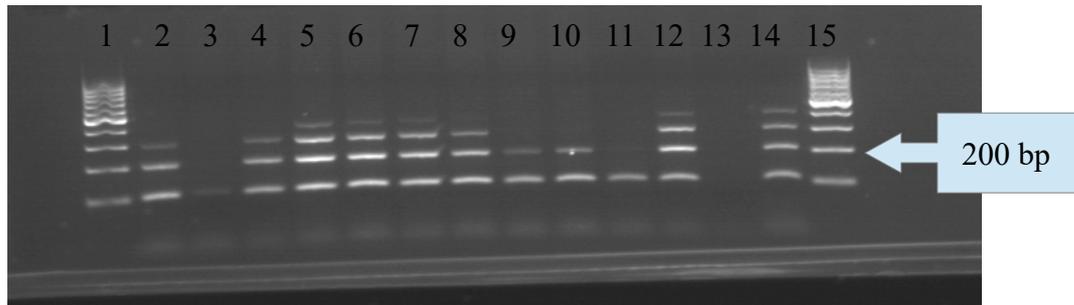


Abbildung 4: Exemplarische Darstellung einer Agarose-Gelelektrophorese nach der PCR zur Analyse der Amplifizierbarkeit der DNA.

Die mit den Ziffern 1 und 15 beschrifteten Spuren enthalten einen Größenstandard (beginnend mit 100 bp und dann aufsteigend in 100er-Schritten), an dem man die erreichten Produktlängen der jeweiligen Proben ermitteln kann. Die Spuren mit den Ziffern 2 bis 14 enthalten Patientenproben mit je nach Amplifizierbarkeit unterschiedlich erreichten Produktlängen. Zum Sichtbarmachen der Banden wurde GelRed verwendet.

Von den 61 Proben konnte bei 80,3% (49 von 61 Proben) eine Produktlänge von 200 bp oder mehr generiert werden. Die maximal amplifizierbaren Produktlängen der DNA betragen bei drei Proben 600 bp, bei elf Proben 400 bp, bei 19 Proben 300 bp, bei 16 Proben 200 bp und bei fünf Proben 100 bp. Bei sieben Proben war eine Zuordnung nach Größenstandard nicht möglich, da keine Amplifikation stattfand (Abbildung 5).

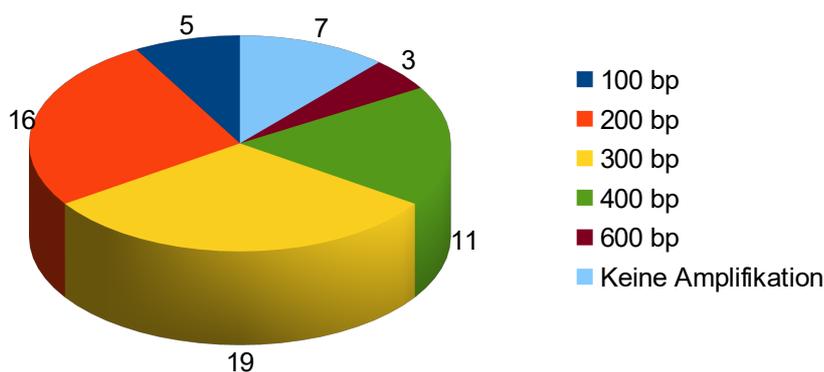


Abbildung 5: Ergebnis der Produktlängenbestimmung mittels Gelelektrophorese nach der PCR-Amplifikation für alle Tumorentitäten.

Dargestellt wird die Häufigkeitsverteilung der jeweiligen Produktlängen des Gesamtkollektivs.

Ergebnisse

Aufgetrennt in die vier Tumorentitäten LPL, MZL, B-CLL und MM ergeben sich folgende Ergebnisse der maximal amplifizierbaren Produktlängen der DNA-Proben: Die Fragmentlänge der Proben betrug beim LPL bei vier Proben eine Länge von 100 bp, zehn Proben eine Länge von 200 bp, 12 Proben eine Länge von 300 bp, vier Proben eine Länge von 400 bp und drei Proben eine Länge von 600 bp. Bei zwei Proben fand in der PCR zur Analyse der Amplifizierbarkeit der DNA keine Amplifikation statt. Beim B-CLL lag die Fragmentlänge von vier Proben bei 200 bp und bei zwei Proben bei 300 bp. Bei fünf Proben fand in der PCR keine Amplifikation statt. Beim MZL betrug die Fragmentlänge von einer Probe 200 bp, von drei Proben 300 bp und von fünf Proben 400 bp. Beim MM betrug die Fragmentlänge einer Probe eine Länge 100 bp, die von einer Probe 200 bp, die von zwei Proben 300 bp und die Länge von zwei Proben betrug 400 bp (graphische Darstellung Abbildung 6).

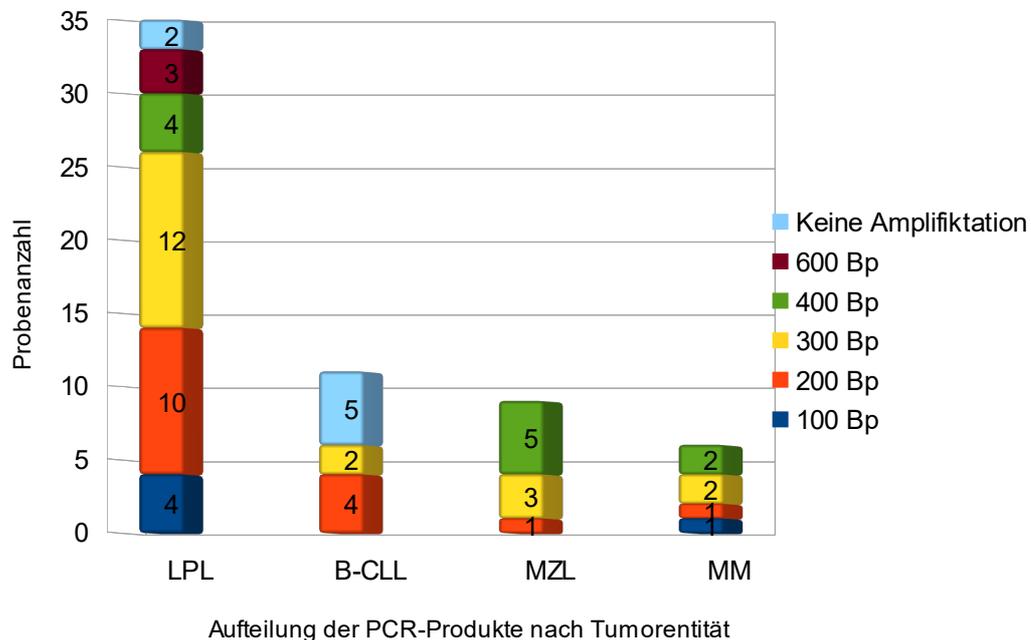


Abbildung 6: Darstellung der maximal amplifizierbaren Fragmentlängen nach der PCR sowie Gelelektrophorese.

Sortiert nach Tumorentität und Produktlängen (100 bp, 200 bp, 300 bp, 400 bp, 600 bp und keine stattgefundenene Amplifikation).

7.3 *MYD88*-Mutationsanalyse mittels Schmelzpunktanalyse und LNA-basierter Wildtypsuppression

Zur Bestimmung des *MYD88*-Mutationsstatus wurde eine Schmelzpunktanalyse bei allen 61 Proben durchgeführt. Die Proben wurden im LightCycler 480 mittels Real-Time PCR unter Nutzung von FRET nach dem unterschiedlichen Verlauf der Schmelzkurven untersucht. Im Verlauf der PCR wurde die Temperatur unter fortlaufender Messung der Fluoreszenz langsam erhöht. Die mutationsspezifische HypProbe p.L265P mut bindet spezifisch an die mutierte Sequenz im *MYD88*-Gen. Die HypProbe anc bindet benachbart, damit ein FRET stattfinden kann. Durch die mutationsspezifische Bindung der HypProbe p.L265P mut dissoziiert diese Sonde bei Vorliegen der *MYD88*-L265P Mutation erst bei einer höheren Temperatur (bei ca. 62°C) von der DNA, als bei der Wildtyp-Sequenz (bei ca. 54°C). Nach der Dissoziation der Sonde wird der FRET durch die zu große Distanz zwischen den HypProbes beendet, wodurch das Fluoreszenzsignal abnimmt. Bei Vorliegen von mutierter und nicht mutierter DNA im Probenmaterial ergeben sich im Schmelzkurvenverlauf verschiedene Kurvenmaxima (Abbildung 7).

Ergebnisse

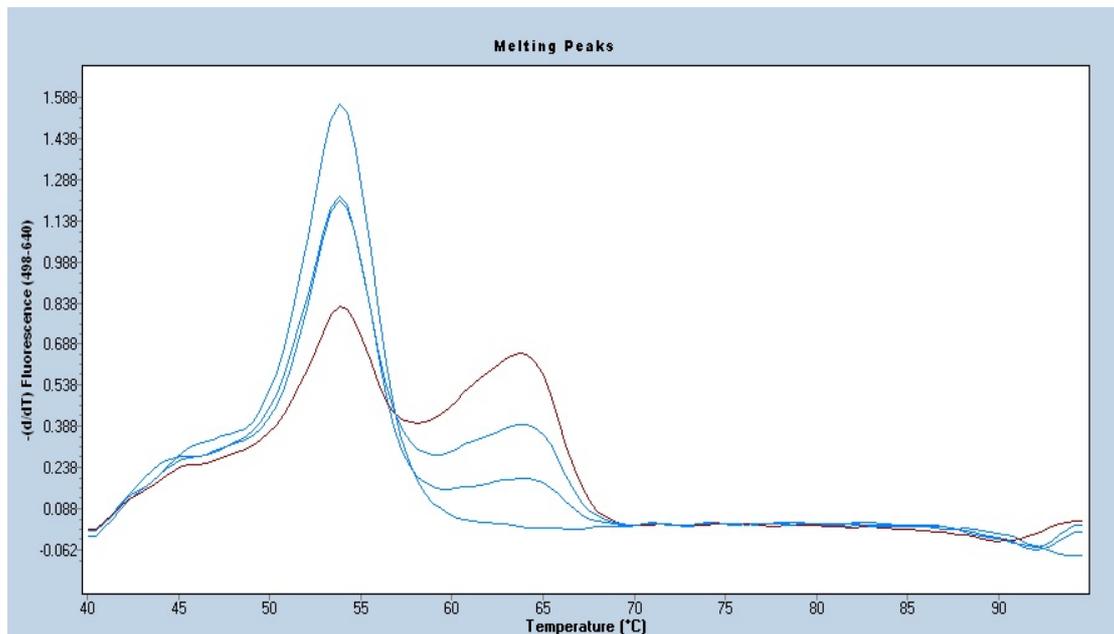


Abbildung 7: Beispiel einer durchgeführten Schmelzpunktanalyse mittels LightCycler 480.

Dargestellt sind zwei Proben, sowie eine Positiv-Kontrolle (Gewebe mit *MYD88*-L265P Mutation, braune Kurve) und eine Negativ-Kontrolle (Wasser, im ersten Peak die höchste blaue Kurve) dargestellt. Bei beiden Proben liegt ein mutationstypischer Schmelzkurvenverlauf (62°C) mit einem zusätzlich Peak zum Wildtyp-charakteristischen Verlauf (54°C) vor.

7.3.1 Ergebnisse der Patientenproben mit LPL

Alle Proben wurden im LightCycler mit und ohne Zugabe eines LNA-Oligomers analysiert. Zur Ermittlung bis zu welchem Tumordinfiltrationsgehalt ein Mutationsnachweis der *MYD88*-L265P Mutation mittels Schmelzpunktanalyse möglich ist, wurde zunächst mit der Analyse von Proben mit hohem Tumordinfiltrationsgehalt (70-100%) begonnen. Anschließend wurden Proben mit mittlerer (30-65%) und niedriger (< 30%) Tumordinfiltration analysiert. Insgesamt konnte aus dem Kollektiv des LPL bei 33 von 35 Proben (94,29%) eine *MYD88*-L265P Mutation nachgewiesen werden (Tabelle 9).

Ergebnisse

Tabelle 9: Auflistung der aus dem LPL-Kollektiv verwendeten Patientenproben.

Darstellung des Geschlechts, Tumordinfiltrationsgehaltes und des jeweiligen *MYD88*-Mutationsstatus, getrennt nach dem PCR-Ansatz mit und ohne LNA-Oligomer. Die Angabe kleiner Peak (kl. Peak) bedeutet, dass in der Schmelzkurvenanalyse kein deutliches mutationstypisches Maximum ohne LNA-Oligomer detektiert werden konnte.

Fall	Geschlecht	Infiltrationsgehalt	Mutationsstatus ohne LNA	Mutationsstatus mit LNA
1	weiblich	100%	L265P	L265P
2	männlich	100%	L265P (Kl. Peak)	L265P
3	männlich	100%	L265P	L265P
4	weiblich	100%	L265P	L265P
5	männlich	100%	L265P	L265P
6	weiblich	95%	L265P	L265P
7	weiblich	90%	L265P	L265P
8	männlich	90%	L265P	L265P
9	männlich	80-90%	L265P	L265P
10	männlich	80%	L265P	L265P
11	männlich	70%	Wildtyp	Wildtyp
12	männlich	60-70%	L265P	L265P
13	weiblich	60%	L265P	L265P
14	weiblich	50%	L265P	L265P
15	männlich	50%	L265P	L265P
16	männlich	50%	L265P	L265P
17	weiblich	50%	L265P	L265P
18	männlich	40%	L265P	L265P
19	weiblich	30-40%	L265P	L265P
20	männlich	35%	L265P	L265P
21	männlich	30%	L265P	L265P
22	weiblich	30%	L265P	L265P
23	weiblich	20-30%	L265P	L265P
24	männlich	20-30%	L265P	L265P
25	männlich	20%	L265P	L265P
26	weiblich	20%	L265P	L265P
27	männlich	20%	L265P (Kl. Peak)	L265P
28	männlich	20%	L265P (Kl. Peak)	L265P
29	weiblich	20%	L265P (Kl. Peak)	L265P
30	männlich	15-20%	L265P	L265P
31	männlich	15-20%	L265P	L265P
32	weiblich	15-20%	L265P	L265P
33	männlich	10-20%	L265P	L265P
34	weiblich	10-15%	L265P	L265P
35	männlich	< 10%	Wildtyp	Wildtyp

Ergebnisse

Im PCR-Ansatz ohne LNA-Oligomer war der mutationstypische Peak bei 62°C im Schmelzkurvenverlauf bei vier Proben (11,4%) eher gering ausgeprägt. Bei drei dieser vier Proben (75%) lag der Tumordinfiltrationsgehalt bei ca. 20%. Bei allen vier Fällen war das Ergebnis im Ansatz mit LNA-Oligomer der Schmelzpunktanalyse entsprechend dem eines mutationstypischen Verlaufs. Bei einer Probe war der mutationstypische Peak sehr schwach ausgeprägt, sodass eine Mutationsanalyse mit unterschiedlichen LNA-Konzentrationen (0,005 mM, 0,006 mM und 0,01 mM) durchgeführt wurde. Bei zunehmender LNA-Konzentration war der mutationstypische Schmelzkurvenverlauf deutlicher sichtbar. Mittels Schmelzpunktanalyse konnte, in der vorliegenden Arbeit, ein *MYD88-L265P* Mutationsnachweis bis zu einem Tumordinfiltrationsgehalt von 10-20% erfolgen. Elf der 35 Proben mit LPL (31,4%) wiesen einen solchen Infiltrationsgehalt auf und davon war bei zehn Proben (90,9%) ein Mutationsnachweis möglich. Bei zwei von 35 Proben (5,7%) konnte ein Wildtypcharakteristischer Kurvenverlauf in der Schmelzpunktanalyse beobachtet werden. Diese beiden Proben wiesen Tumordinfiltrationsgehalte von 70% und von ca. 10% auf. In der Beurteilung der Proben im Vergleich der Reaktionsansätze mit und ohne LNA-Oligomer (LNA-Konzentration 0,005 mM) konnte in beiden Fällen ein eindeutiger Schmelzkurvenverlauf von Gewebe mit nicht mutiertem *MYD88* festgestellt werden.

7.3.2 Ergebnisse der Patientenproben aus den Kontrollkollektiven

In der histologischen und pathologischen Differentialdiagnostik bei den NHL sind verschiedene Tumorentitäten, wie z.B. das MZL und die B-CLL, dem LPL in histopathologischen Aspekten ähnlich. Die Proben der Entitäten MZL und B-CLL wurden ebenfalls mit der Schmelzpunktanalyse auf das Vorliegen der *MYD88-L265P* Mutation getestet.

Ergebnisse

7.3.2.1 Ergebnisse der Patientenproben mit B-CLL

Die Schmelzpunktanalyse zur Prüfung auf das Vorliegen der *MYD88*-L265P Mutation wurde bei einer Kontrollgruppe bestehend aus elf Patientenfällen mit der Diagnose B-CLL durchgeführt. Der Tumorinfiltrationsanteil der Knochenmarkproben lag zwischen 10% und nahezu 100%. Im PCR-Ansatz ohne Zugabe eines LNA-Oligomers konnte bei keiner Probe eine *MYD88*-L265P Mutation nachgewiesen werden. Zur Validierung der Ergebnisse wurde eine Analyse unter Verwendung eines LNA-Oligomers, welches der Wildtypsuppression dient, durchgeführt, wobei auch hier bei keiner Probe ein mutationstypischer Schmelzkurvenverlauf nachzuweisen war (Tabelle 10).

Tabelle 10: Fallübersicht der B-CLL-Proben.

Darstellung von Geschlecht, Infiltrationsgehalt und *MYD88*-Mutationsstatus getrennt nach der Analyse mit und ohne LNA-Oligomer.

Fall	Geschlecht	Infiltrationsgehalt	Mutationsstatus ohne LNA	Mutationsstatus mit LNA
36	weiblich	100%	Wildtyp	Wildtyp
37	weiblich	100%	Wildtyp	Wildtyp
38	männlich	90%	Wildtyp	Wildtyp
39	männlich	80-90%	Wildtyp	Wildtyp
40	weiblich	80%	Wildtyp	Wildtyp
41	männlich	80%	Wildtyp	Wildtyp
42	weiblich	70%	Wildtyp	Wildtyp
43	weiblich	50%	Wildtyp	Wildtyp
44	weiblich	30%	Wildtyp	Wildtyp
45	männlich	20%	Wildtyp	Wildtyp
46	männlich	10-20%	Wildtyp	Wildtyp

7.3.2.2 Ergebnisse der Patientenproben mit MZL

Eine weitere Kontrollgruppe bildete ein Probenkollektiv bestehend aus neun Patientenfällen mit klinisch-pathologischer Diagnose eines MZL. Der Tumorinfiltrationsgehalt der Knochenmarkproben lag zwischen 10 und 90%. In der Schmelzpunktanalyse konnte im Reaktionsansatz ohne LNA-Oligomer bei einer Probe eine *MYD88*-L265P Mutation detektiert werden. Dies entspricht einem Anteil von 11,1%. Bei den restlichen acht Proben (88,9%) konnte keine *MYD88*-L265P Mutation nachgewiesen. Dem entsprechend waren die

Ergebnisse

Ergebnisse des Ansatzes mit LNA-Oligomer (Tabelle 11).

Tabelle 11: Darstellung der Schmelzpunktanalyseergebnisse der Patientenproben mit MZL.

Darstellung von Geschlecht, Infiltrationsgehalt und *MYD88*-Mutationsstatus getrennt nach der Analyse mit und ohne LNA-Oligomer.

Fall	Geschlecht	Infiltrationsgehalt	Mutationsstatus ohne LNA	Mutationsstatus mit LNA
47	weiblich	90%	Wildtyp	Wildtyp
48	weiblich	70-80%	Wildtyp	Wildtyp
49	weiblich	40%	Wildtyp	Wildtyp
50	männlich	30%	Wildtyp	Wildtyp
51	männlich	20 - 30%	Wildtyp	Wildtyp
52	weiblich	20%	L265P	L265P
53	männlich	15-20%	Wildtyp	Wildtyp
54	männlich	10%	Wildtyp	Wildtyp
55	männlich	15%	Wildtyp	Wildtyp

7.3.2.3 Ergebnisse der Patientenproben mit MM

Patientenproben mit MM waren ursprünglich nicht in das Studienkollektiv eingeschlossen. Im Rahmen der Arbeit zeigte sich bei der histopathologischen Begutachtung bei sechs ursprünglich als LPL gewerteten Proben, dass diese Fälle diagnostisch als MM einzuordnen waren. Der Infiltrationsgehalt der MM-Proben lag zwischen 10% und 80%. Bei allen sechs Proben konnte in der Schmelzpunktanalyse, sowohl ohne als auch mit LNA-Oligomer, keine *MYD88*-L265P Mutation nachgewiesen werden (Tabelle 12).

Tabelle 12: Übersicht der Ergebnisse der Patientenproben mit MM.

Darstellung von Geschlecht, Infiltrationsgehalt und *MYD88*-Mutationsstatus getrennt nach der Analyse mit und ohne LNA-Oligomer.

Fall	Geschlecht	Infiltrationsgehalt	Mutationsstatus ohne LNA	Mutationsstatus mit LNA
56	weiblich	60-80%	Wildtyp	Wildtyp
57	weiblich	50%	Wildtyp	Wildtyp
58	männlich	40%	Wildtyp	Wildtyp
59	männlich	15%	Wildtyp	Wildtyp
60	männlich	10-15%	Wildtyp	Wildtyp
61	weiblich	ca. 10%	Wildtyp	Wildtyp

7.4 Zusammenfassung der Ergebnisse nach der *MYD88*-Mutationsanalyse mittels Schmelzpunktanalyse

Bei der Schmelzpunktanalyse konnte in 33 von 35 Patientenfällen mit LPL eine *MYD88*-L265P Mutation nachgewiesen werden. Dies entspricht einem Anteil von 94,3%. Davon wies der Schmelzkurvenverlauf im PCR-Ansatz ohne Zugabe des LNA-Oligomers bei vier Proben keinen eindeutigen mutationstypischen Peak bei 62°C auf. Unter Zugabe eines LNA-Oligomers in den Reaktionsansatz fiel der Mutationsnachweis positiv aus. Bei zwei Proben aus dem LPL-Kollektiv wurde ein Wildtyp-charakteristischer Kurvenverlauf in der Schmelzpunktanalyse detektiert, was einem Anteil von 5,7% entspricht. Dabei lag der Infiltrationsgehalt einer der beiden Proben bei unter 10%. Bei den Proben mit MZL konnte nur bei einer Probe ein Mutationsnachweis der *MYD88*-L265P Mutation gestellt werden (11,1%). Bei 88,9% der Proben (acht von neun Proben) war keine *MYD88*-L265P Mutation nachweisbar. Sowohl bei der B-CLL als auch beim MM konnte bei keiner Probe (0%) eine *MYD88*-L265P Mutation nachgewiesen werden (Abbildung 8).

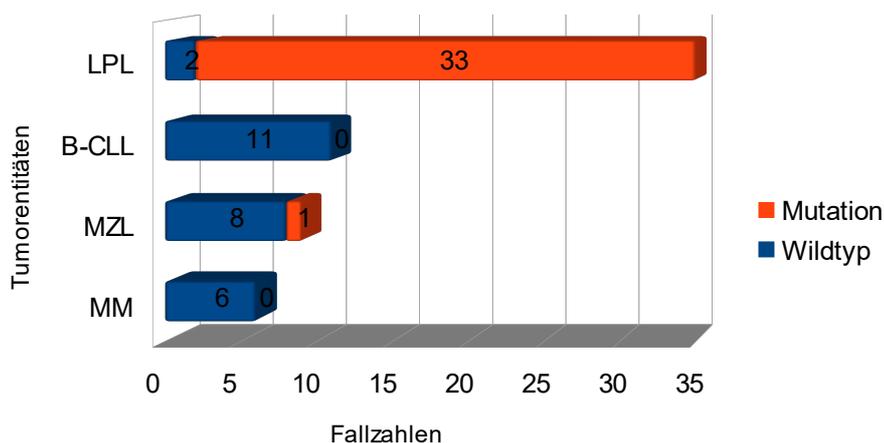


Abbildung 8: Graphische Darstellung der Ergebnisse der *MYD88*-Schmelzpunktanalyse.

7.5 Beurteilung der retrospektiven Analyse von Knochenmark FFPE- Material

Teil der Zielsetzung dieser Arbeit war zu prüfen, ob ein retrospektiver diagnostischer Nachweis einer *MYD88-L265P* Mutation mittels FFPE-Knochenmark möglich ist.

FFPE-Gewebe fragmentiert durch die Formalin-Fixierung. Somit weist FFPE-Gewebe selten Längen über 600 bp auf. Durch die Fragmentierung der DNA könnte es bei der Mutationsanalyse möglicherweise zu falsch-negativen oder falsch-positiven Ergebnissen kommen. In 80,3% der Patientenproben waren die Produktlängen in der PCR zur Analyse der Amplifizierbarkeit der DNA mindestens 200 bp lang, was für eine gute Qualität des Analysematerials spricht. Bei Proben mit einer maximal amplifizierbaren Produktlänge von 100 bp war die Schmelzpunktanalyse durchweg unauffällig und die Proben waren eindeutig dem Wildtypstatus oder dem Mutationsstatus zuzuordnen. In 94,3% der Fälle mit LPL konnte eine *MYD88-L265P* Mutation nachgewiesen werden. Bei Proben mit nicht eindeutigem Mutationsstatus, konnte dieser durch Zugabe eines LNA-Oligomers eindeutig als Mutation (deutlicher mutationstypischer Peak im Schmelzkurvenverlauf) identifiziert werden.

7.6 Bestimmung des Tumorinfiltrationsgehaltes bis zu dem ein sicherer Mutationsnachweis mittels Schmelzpunktanalyse möglich ist

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte geprüft werden bis zu welchem Infiltrationsanteil eine *MYD88*-Mutationsanalyse mittels Schmelzpunktanalyse möglich ist.

Unter den 35 analysierten Fällen des LPL lag bei 21 Fällen eine mittlere bis hohe Tumorinfiltration (zwischen 40% und 100%) vor. In diesem Kollektiv wiesen 18 Fälle (94,7%) die *MYD88-L265P* Mutation auf. Bei einem Fall (4,8%)

Ergebnisse

konnte keine *MYD88-L265P* Mutation nachgewiesen werden. Der Infiltrationsgehalt dieser Probe betrug 70%. Bei 14 Fällen des LPL lag eine geringe Tumordinfiltration (zwischen 10% und 30%) vor. In diesem Kollektiv wurden 13 Fälle positiv auf die *MYD88-L265P* Mutation getestet (92,9%). Ein Fall (7,1%) wies die Wildtyp-Sequenz auf. Bei dieser Probe lag der Tumordinfiltrationsgehalt bei < 10%. Unter den Proben mit niedrigem Infiltrationsgehalt und positivem Mutationsnachweis waren drei Fälle (21,4%), die ohne Zugabe des LNA-Oligomers einen geringen Peak in der graphischen Darstellung der Mutationsanalyse aufwiesen. Der Infiltrationsgehalt bei diesen Proben betrug ca. 20%. Unter Zugabe eines LNA-Oligomers war der mutationstypische Peak eindeutiger, aber dennoch im Vergleich zu anderen Proben gering. Bei drei der sieben Proben mit einem Infiltrationsgehalt von 20% war ein verhältnismäßig kleiner mutationstypischer Peak in der Schmelzpunktanalyse zu sehen. Bei den beiden Proben mit einem Infiltrationsgehalt von 10% war ein Mutationsnachweis möglich. Bei einer Probe mit einem Infiltrationsgehalt von < 10% konnte keine *MYD88-L265P* Mutation nachgewiesen werden. Der Mutationsnachweis war in der vorliegenden Arbeit bis zu einem Infiltrationsgehalt von 10- 20% möglich.

8 Diskussion

8.1 Retrospektive Mutationsanalyse mittels FFPE-Knochenmark

8.1.1 Qualitative Eignung von FFPE-Gewebe zur Mutationsanalyse

Eine Zielsetzung der Arbeit war die Eignungstestung der *MYD88*-Mutationsanalyse für FFPE-Knochenmarkbiopsien.

In den meisten Forschungsarbeiten zum Mutationsnachweis der *MYD88*-L265P Mutation bei Lymphomen wurden Knochenmarkbiopsien, peripheres Blut oder Lymphknoten als Gewebe zur Analyse verwendet. In der pathologischen Routinediagnostik von B-Zell Lymphomen steht jedoch meist FFPE-Gewebe zur Verfügung (Ogura et al., 2013; Capaldi et al., 2014). Durch die Fixierung von Gewebe in Formalin kommt es zur Fragmentierung der DNA. Somit muss auf Grund der für die Mutationsanalyse vorliegenden kurzen DNA-Fragmente mittels PCR eine effektive Amplifikation erfolgen. Durch zu kurze Fragmentlängen im Verhältnis zur Produktlänge der PCR einer Mutationsanalyse kann es zu ungleich verteilter Amplifikation mutierter und nicht-mutierter Sequenzen und somit zu falsch-negativen Ergebnissen kommen. Somit stellt die Mutationsanalyse mit FFPE-Material insgesamt eine diagnostische Herausforderung dar (Capaldi et al., 2014). Vor der Mutationsanalyse wurde in der vorliegenden Arbeit eine PCR zur Prüfung der Amplifizierbarkeit der DNA durchgeführt. 80,3% der Proben im Gesamtkollektiv wiesen eine maximal amplifizierbare Länge von 200 bp und mehr auf. Insgesamt zeigt sich somit eine für die Mutationsanalyse verwertbare DNA-Qualität. Der Anteil an Proben mit Fragmentlängen von 100 bp oder Proben bei denen keine Amplifikation in der PCR stattfand betrug 19,7% (fünf Proben mit 100 bp und sieben Proben ohne Amplifikation). Von den sieben Proben, bei denen keine Amplifikation in der PCR zur Analyse der DNA-Qualität stattfand,

Diskussion

waren fünf Proben Fälle mit B-CLL und zwei Proben Fälle mit LPL. Die LPL-Proben wiesen Tumorinfiltrationsgehalte von 50% und 90% auf. Der Tumorinfiltrationsgehalt der B-CLL-Proben betrug zwischen 20% (zwei Proben) und nahezu 100%. Bei der Mutationsanalyse waren keine Auffälligkeiten bei diesen Fällen zu verzeichnen. Die beiden LPL-Proben wiesen einen mutationstypischen Schmelzkurvenverlauf auf und die B-CLL-Proben einen charakteristischen Verlauf für Gewebe ohne *MYD88-L265P* Mutation. Insgesamt sprechen die vorliegenden Ergebnisse der Schmelzpunktanalyse eher dagegen, dass falsch-positive oder falsch-negative Ergebnisse auf Grund der Fragmentierung des Gewebes vorlagen. Zudem hängt die Amplifizierbarkeit des Gewebes von der Effizienz der PCR ab. Somit kann es sein, dass in der PCR zur Analyse der Amplifizierbarkeit der DNA keine Amplifikation stattfand, in der Schmelzpunktanalyse dennoch eine Amplifikation stattfinden konnte.

8.1.2 Vergleich von FFPE-Gewebe mit anderen Materialien

Ziel der vorliegenden Arbeit war unter anderem die Prüfung der Möglichkeit der Mutationsanalyse an FFPE-Knochenmark und dessen Einfluss auf das Ergebnis und die Analysequalität.

In der Arbeit von Ogura et al. (2013) wurde eine Mutationsanalyse mittels Sequenzierung von DNA aus FFPE-Gewebe in verschiedenen Lymphomen durchgeführt. Der nachgewiesene Anteil an *MYD88-L265P* Mutationen bei LPL-Patienten betrug 78%. Capaldi et al. (2014) verwendeten FFPE-Knochenmark und führten eine Mutationsanalyse mittels AS-PCR durch. Dabei konnte die Mutation mittels AS-PCR in allen LPL-Proben festgestellt werden. In anderen Studien konnte, abhängig von der Analysemethode, in 68% bis 100% der LPL-Proben eine *MYD88-L265P* Mutation nachgewiesen werden (Poulain et al., 2013; Varettoni et al., 2013; Treon et al., 2012b; Gachard et al., 2013; Jimenez et al., 2013). Mit FFPE-Material der Patientenproben der Pathologischen Abteilung der Universitätsklinik Tübingen konnte in 94,3% der

Knochenmarkproben mit einer Infiltration eines LPL nachgewiesen werden. Das Ergebnis der Mutationsanalyse der vorliegenden Arbeit liegt im statistischen Rahmen von anderen Studienergebnissen. Durch die Verwendung von FFPE-Knochenmark ist eine *MYD88*-Mutationsanalyse möglich und somit kann FFPE-Gewebe bei der Diagnostik von Lymphomen eingesetzt werden.

8.2 Schmelzpunktanalyse mittels LightCycler als Möglichkeit zur Detektion der *MYD88*-L265P Mutation

8.2.1 Nachweisgrenzen durch geringen Tumorinfiltrationsanteil der Proben

Die Nachweisgrenze spielt insbesondere bei der Mutationsanalyse von Gewebe mit niedriger Tumorinfiltration oder einem geringen Prozentsatz an mutierter DNA im Probenmaterial eine wichtige Rolle (Jimenez et al., 2013). Mittels PCR wurden die zu analysierenden Genabschnitte amplifiziert, um eine potenzielle Mutation mit der Schmelzpunktanalyse nachweisen zu können. Es gilt zu beachten, dass ein sehr geringer Tumorinfiltrationsgehalt im Probenmaterial dazu führen könnte, dass der Anteil an mutiertem Gewebe quantitativ zu gering ist, um in der Schmelzpunktanalyse ermittelt werden zu können. Somit sollte eine Zielsetzung der Arbeit sein, zu prüfen bis zu welchem Infiltrationsgehalt ein Mutationsnachweis anhand dieser Methode überhaupt erfolgen kann.

Um diese Frage zu beantworten ist eine Begutachtung der Ergebnisse der Proben mit geringen Infiltrationsgehalten (< 10% bis 30%) relevant. Von den 16 Proben mit einem niedrigen Infiltrationsgehalt konnte bei 15 Fällen eine *MYD88*-L265P Mutation nachgewiesen werden (93,8%). Ohne LNA-basierte Wildtypsuppression konnte bei vier der 16 Proben mit niedrigem Infiltrationsgehalt kein eindeutiger mutationstypischer Peak in der Schmelzpunktanalyse detektiert werden. Bei drei der vier Proben lag der

Diskussion

Infiltrationsgehalt bei 20%. Unter Zugabe eines LNA-Oligomers konnte bei diesen drei Proben eine mutationstypische Schmelzkurve in der Schmelzpunktanalyse dargestellt werden. Bei den restlichen Proben mit *MYD88-L265P* Mutationsnachweis im Kollektiv mit niedrigem Infiltrationsgehalt ergaben sich keine Auffälligkeiten bei der Schmelzpunktanalyse. Dadurch konnte verdeutlicht werden, dass der Einsatz eines LNA-Oligomers in der Mutationsanalyse bei niedrigen Tumorinfiltrationsgehalten hilfreich sein kann. Durch die geringe Tumorinfiltration im Gewebe liegt eine geringere Menge an mutierter DNA vor, welche so möglicherweise kein ausreichendes Fluoreszenzsignal erzeugen kann. Dies könnte zu nicht eindeutigen Ergebnissen bei der Schmelzpunktanalyse führen. Um auch Proben mit sehr geringem Infiltrationsgehalt untersuchen zu können, wird ein LNA-Oligomer zur Wildtypsuppression eingesetzt. Dieses führt bei der PCR zu einer Verminderung der Amplifikation der nicht mutierten DNA, wodurch am Ende der PCR eine größere Menge der mutierten DNA vorliegt. Somit kann bei der Schmelzpunktanalyse das entsprechende mutationstypische Fluoreszenzsignal besser ermittelt werden. Die Probe im Kollektiv der LPL-Fälle mit niedrigem Infiltrationsgehalt, bei der keine *MYD88-L265P* Mutation detektiert werden konnte, wies einen Tumorinfiltrationsgehalt von < 10% auf. Es ist anhand der Arbeit nicht zu beantworten, ob dieses Ergebnis mit dem niedrigen Infiltrationsgehalt zu begründen war oder damit, dass die Probe tatsächlich keine *MYD88-L265P* Mutation aufwies. Allerdings konnte bei den anderen Proben mit einem Infiltrationsgehalt von 10% ein problemloser Mutationsnachweis erfolgen, womit die Vermutung, dass womöglich keine *MYD88-L265P* Mutation vorlag, wahrscheinlich ist. In der Arbeit konnten Proben mit einem Tumorinfiltrationsgehalt von bis zu 10% in der Mutationsanalyse untersucht werden. Somit ist eine *MYD88* Mutationsanalyse mittels Schmelzpunktanalyse für ein Materialkollektiv mit Infiltrationsgehalten zwischen 10% und 100% möglich. Mit der vorliegenden Studienprobe (Infiltrationsgehalt zwischen 10% und 100%) kann keine Aussage über den zuverlässigen

Diskussion

Mutationsnachweis bei Infiltrationsgehalten von unter 10% (wie bei AS-PCR Verfahren von < 1%) getroffen werden. Um hierzu eine Aussage treffen zu können, müssten Proben mit einem Infiltrationsgehalt zwischen 1% und 15% mittels Schmelzpunktanalyse analysiert werden. Die genaue Nachweisgrenze sollte anhand einer Verdünnungsreihe getestet werden. Eine solche Verdünnungsreihe wurde von Schmidt et al. (2015) durchgeführt. Der sichere Mutationsnachweis bei FFPE-Gewebe und der Schmelzpunktanalyse war bis zu einem Infiltrationsgehalt zwischen 2,5 und 5% (unter Zugabe eines LNA-Oligomers) möglich (Schmidt et al., 2015). In der Literatur gibt es unterschiedliche Angaben zur Nachweisgrenze. Bei der AS-PCR mit frischem Gewebe (Knochenmark) konnte die *MYD88-L265P* Mutation bei unter 1% (0,1%) Tumordinfiltration noch zuverlässig nachgewiesen werden (Xu et al., 2013). Bei der von Jimenez et al. (2013) durchgeführten ASO-PCR konnte die *MYD88-L265P* Mutation in frischem Gewebe (Knochenmark und Lymphknoten) bis zu einer Nachweisgrenze von 0,25% Tumordinfiltration im Probenmaterial nachgewiesen werden. Unter der Verwendung von FFPE-Gewebe und der Durchführung einer AS-PCR konnte eine Nachweisgrenze von 1,25-2,5% Tumordinfiltration ermittelt werden (Capaldi et al., 2014; Staiger et al., 2015).

8.2.2 Mutationsanalyse mittels Schmelzpunktanalyse als Möglichkeit zum Nachweis der *MYD88-L265P* Mutation bei verschiedenen Tumorentitäten

In der klinisch-pathologischen Differentialdiagnostik werden diagnostische Tools benötigt, die eine schnelle und sichere Differenzierung der Tumorentitäten der NHL ermöglichen. Gerade bei Malignomen, die sich klinisch und histopathologisch sehr ähnlich sind, wie beispielsweise das LPL und das MZL oder die B-CLL. Daher war eine Zielsetzung der vorliegenden Arbeit zu prüfen, ob die Mutation auch bei anderen NHL, wie z.B. dem MZL und der B-CLL, vorliegt und wie häufig diese im vorliegenden Studienkollektiv nachzuweisen ist.

8.2.2.1 Mutationsanalyse beim LPL

Insgesamt konnte im im Kollektiv mit LPL bei 94,3% der Proben eine *MYD88-L265P* Mutation detektiert werden. Vor allem im PCR-Ansatz mit LNA-Oligomer blieb der Mutationsstatus bei keiner Probe fraglich, da die Fluoreszenzsignale der Proben entweder eindeutig für oder gegen eine *MYD88-L265P* Mutation sprachen. Bei zwei LPL-Proben konnte keine *MYD88-L265P* Mutation nachgewiesen werden. Nach der PCR zur Analyse der Amplifizierbarkeit der DNA konnte bei einer der beiden Proben eine maximal amplifizierbare Länge von 300 bp festgestellt werden und in der anderen eine maximale Amplifikatlänge von 400 bp. Eine falsch-negative Analyse auf Grund einer hohen Fragmentierung des Gewebes ist unwahrscheinlich, da Material mit einer Amplifikatlänge über 200 bp als verwertbar in der Mutationsanalyse angesehen wird. Der Tumordinfiltrationsgehalt der beiden Proben betrug < 10% und 70%. Zur Wildtypsuppression wurden die beiden Proben ohne Nachweis einer *MYD88-L265P* Mutation mit einem LNA-Oligomer analysiert, wobei auch in diesem Ansatz keine *MYD88-L265P* Mutation nachgewiesen werden konnte. Bei dem Patientenfall mit einem Tumoranteil von < 10% könnte die Grenze der Nachweisbarkeit mittels Schmelzpunktanalyse erreicht worden sein. In der Arbeit wurden keine Proben mit einem Infiltrationsgehalt < 10% untersucht, sodass keine Vergleiche zu anderen Proben mit ähnlich geringem Infiltrationsgehalt und nachgewiesener *MYD88-L265P* Mutation angestellt werden können.

In der Literatur wird die *MYD88-L265P* Mutation beim LPL in über 90% der Fälle beschrieben (Swerdlow et al., 2016a). Somit liegt ermittelte Ergebnis der Schmelzpunktanalyse in der statistischen Norm mit den anderen Studienergebnissen.

8.2.2.2 Mutationsanalyse bei der B-CLL

Im Kollektiv der B-CLL konnte die *MYD88-L265P* Mutation bei keiner Probe nachgewiesen werden. Die Tumordinfiltrationsgehalte der B-CLL Proben lagen

Diskussion

zwischen 15% und 100%. In der PCR zur Analyse der Amplifizierbarkeit der DNA war auffällig, dass bei fünf B-CLL Proben keine Amplifikate nachgewiesen werden konnten. Dennoch weisen alle Proben, auch die genannten fünf Proben ohne Amplifikate, in der PCR zur Analyse der DNA-Qualität einen Wildtyp-charakteristischen Schmelzkurvenverlauf im PCR-Ansatz, sowohl mit als auch ohne LNA-Oligomer, auf. In der Literatur beläuft sich der positive Mutationsnachweis bei der B-CLL auf 0% bis 4% (Varettoni et al., 2013; Poulain et al., 2013; Xu et al., 2013). Dahingehend besteht eine Übereinstimmung zwischen den Ergebnissen der Mutationsanalyse bei der vorliegenden Arbeit mit anderen Studienergebnissen.

8.2.2.3 Mutationsanalyse beim MZL

Beim MZL ist die Mutationsrate mit 11,1% statistisch etwas höher als in vergleichbaren Studien mit einem Mutationsnachweis zwischen 6% und 10% (Treon et al., 2012b; Varettoni et al., 2013; Gachard et al., 2013; Jimenez et al., 2013). Auf Grund der geringen Fallzahl mit neun analysierten MZL-Fällen wirkt sich ein positiv getesteter Fall auf das prozentuale Ergebnis statisch gesehen stark aus. Insgesamt konnte nur eine *MYD88-L265P* Mutation im Kollektiv mit MZL nachgewiesen werden. Die restlichen acht Proben wiesen einen für die Wildtyp-Sequenz charakteristischen Schmelzkurvenverlauf auf. Somit wäre eine höhere Fallzahl mit Patientenfällen mit MZL bei der *MYD88-L265P* Mutationsanalyse notwendig, um diese statistische Verzerrung der Ergebnisse durch die geringe Fallzahl aufzuheben.

8.3 Nachweismethoden der *MYD88-L265P* Mutation

Es wurden bereits verschiedene Arbeiten zur Mutationsanalyse der *MYD88-L265P* Mutation durchgeführt. Dabei waren die Ergebnisse je nach Methode und verwendetem Material unterschiedlich. In den Studien wurden vorzüglich

Sequenzierungsmethoden wie z.B. Next Generation Sequencing (NGS) und Sanger-Sequenzierung (Treon et al., 2012b; Gachard et al., 2013; Poulain et al., 2013; Xu et al., 2013), die AS PCR (Varettoni et al., 2013) sowie die ASO-PCR (Jimenez et al., 2013) verwendet.

8.3.1 Sequenzierung

In einer der ersten Arbeiten zur *MYD88*-L265P Mutationsanalyse wurde die Whole Genome Sequenzierung zur Detektion der Mutation verwendet und zur Validierung der Ergebnisse wurde eine Sanger-Sequenzierung durchgeführt (Treon et al., 2012b). Mit beiden Methoden konnte die *MYD88*-L265P Mutation bei 91% der Proben mit LPL nachgewiesen werden. In der Studie wurden weitere Tumorentitäten wie z.B. das MZL und die IgM-MGUS untersucht. Bei der Analyse war bei 7% der Patientenfälle mit MZL und bei 10% der Patientenfälle mit IgM-MGUS eine *MYD88*-L265P Mutation nachweisbar. (Treon et al., 2012b). Auch in anderen Studien wurde die Sanger-Sequenzierung eingesetzt. Dabei konnte die *MYD88*-L265P Mutation bei Patienten mit LPL in 67% bis 89,4% der Studienfälle nachgewiesen werden (Gachard et al., 2013; Poulain et al., 2013; Xu et al., 2013). Der Mutationsnachweis beim SMZL mittels Sanger-Sequenzierung lag zwischen 4% und 6% (Gachard et al., 2013; Poulain et al., 2013). Unterschiedliche Ergebnisse hinsichtlich des *MYD88*-L265P Mutationsnachweises könnten z.B. von den Patientenproben, der Aufbereitung der Proben oder der Methode an sich abhängen. Dabei spielt auch der Tumordinfiltrationsgehalt der Patientenproben eine Rolle. In der Literatur wurden Detektionsgrenzen der Sanger-Sequenzierung von 15-30% beschrieben (Capaldi et al., 2014; Jimenez et al., 2013; Rossi et al., 2014). Die Sanger-Sequenzierung ist somit bei einer Tumordinfiltration von über 15% im Gewebe eine verlässliche Nachweismethode. Ein Vorteil der Sanger-Sequenzierung ist, dass sie eine direkte Nachweismethode der Mutation ist und dass durch sie weitere, möglicherweise verwandte Mutationen detektiert werden könnten

(Capaldi et al., 2014).

8.3.2 AS-PCR

Die AS-PCR wurde für die Detektion der *MYD88-L265P* Mutation von Varettoni et al. (2013) verwendet. Mit dieser Methode konnte eine höhere Sensitivität und Spezifität beim *MYD88-L265P* Mutationsnachweis erzielt werden. Mit der AS-PCR war bei 100% der Studienpatienten mit LPL ein Nachweis der *MYD88-L265P* Mutation möglich. Verglichen mit den Ergebnissen der Sanger-Sequenzierung, mit der bei maximal 90% der Patienten eine *MYD88-L265P* Mutation nachweisen konnte, ist diese Methode, bezogen auf den Mutationsnachweis, sensitiver und spezifischer. In der Studie wurden 84 Patienten mit SMZL untersucht, in 6% der Fälle konnte eine *MYD88-L265P* Mutation nachgewiesen werden. Xu et al. (2013) verwendeten zum Mutationsnachweis sowohl die konventionelle als auch die Real-time AS-PCR. Die Real-time AS-PCR wurde zum quantitativen Nachweis der Mutation durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen wurden mit einer Sanger-Sequenzierung validiert. Bei 93% der Fälle mit LPL konnte die *MYD88-L265P* Mutation, sowohl in der konventionellen als auch in der Real-time AS-PCR, nachgewiesen werden. Mittels Sanger-Sequenzierung konnte nur bei 89,4% der Fälle eine Mutation detektiert werden. Bei den restlichen Fällen, bei denen mittels Sanger-Sequenzierung keine *MYD88-L265P* Mutation nachweisen werden konnte, war in der konventionellen AS-PCR ein schwaches Mutationssignal detektierbar. Wahrscheinlich wurde hier die technische Grenze der Sanger-Sequenzierung erreicht. Verglichen mit anderen Studien ist die Rate der nachgewiesenen Mutationen unter Verwendung der AS-PCR etwas höher. Mit einem Mutationsnachweis von bis zu 100% entspricht dies den höchsten Nachweisraten (Varettoni et al., 2013; Capaldi et al., 2014). Die AS-PCR ist der Sanger-Sequenzierung sowohl in der Sensitivität als auch in der Spezifität überlegen. Bei der AS-PCR beträgt die theoretische Nachweisgrenze 0,1%.

Diskussion

Im Gegensatz zur Sanger-Sequenzierung ist die AS-PCR jedoch keine direkte sondern eine indirekte Nachweismethode der Mutation. Zudem ist die Primerspezifität nur relativ und nicht absolut ist. Des Weiteren muss bedacht werden, dass falsch-positive Ergebnisse durch zu hohe Konzentrationen der zu amplifizierenden DNA (DNA template) oder des verwendeten Primers möglich sind. Somit müssen die Primer-Konzentrationen an die DNA-Menge im Reaktionsansatz angepasst werden (Capaldi et al., 2014). Insgesamt jedoch ist die AS-PCR eine schnelle und sensitive Methode mit reliabler Detektion der *MYD88-L265P* Mutation beim LPL, selbst bei geringen Infiltrationsgehalten, z.B. von unter 1% (Rossi et al., 2014).

8.3.3 ASO-PCR

Die *MYD88-L265P* Mutationsanalyse erfolgte in der Studie von Jiménez et al. (2012) mittels ASO-PCR (Allel-spezifisches Oligonukleotid). Die ASO-PCR ist ein Verfahren, das eine AS-PCR und ARMS-Technologie (Amplification refractory mutation system) verbindet. In der erstellten Verdünnungsreihe war ein Mutationsnachweis bis zu einem Mutationsanteil von 0,25% im Analysegewebe möglich. Die eingeschlossenen Proben wiesen mindestens einen Gehalt von 1% Tumorzellen im Gewebe auf. Somit müsste ein suffizienter Mutationsnachweis gewährleistet sein. Bei 86% der Fälle mit LPL und bei 21% der Fälle mit MZL konnte die *MYD88-L265P* Mutation nachgewiesen werden. Bei den untersuchten Fällen mit B-CLL konnte keine *MYD88-L265P* Mutation nachgewiesen werden.

8.3.4 Vergleich der Nachweismethoden

Die Unterschiede in der Angabe der Mutationshäufigkeit in verschiedenen Studien betreffen prinzipiell die Verwendung verschiedener Nachweisverfahren, wie beispielsweise Sequenzierungsverfahren oder die AS-PCR. Andererseits

Diskussion

sind auch Unterschiede zwischen den einzelnen Studien bei Verwendung desselben Verfahrens zu verzeichnen. Mögliche Erklärungen für die schwankenden Angaben zum Mutationsstatus in den Studien sind z.B. die Verwendung unterschiedlicher Materialien, verschiedener Tumorinfiltrationsgehalte in den Patientenproben, unterschiedliche Stichprobengrößen sowie möglicherweise eingeschlossene Fehldiagnosen (Swerdlow et al., 2016b).

Bei Sequenzierungen (v.a. der Sanger-Sequenzierung) liegt der *MYD88-L265P* Mutationsnachweis bei LPL-Fällen zwischen 67% (Gachard et al., 2013) und 93% (Xu et al., 2013). Mit der sensitiveren und sensibleren AS-PCR kann die *MYD88-L265P* Mutation in bis zu 100% der Fälle mit LPL nachgewiesen werden (Varettoni et al., 2013). Die Sanger-Sequenzierung ist eine kosten- und zeitintensive Analysemethode, bei der zudem eine gewisse Tumormenge (je nach Studie, 15-30%) zum Nachweis der Mutation erforderlich ist (Capaldi et al., 2014; Jimenez et al., 2013; Rossi et al., 2014). Bei der AS-PCR ist zum Mutationsnachweis weniger DNA-Material erforderlich, sie ist kosten- und zeitgünstiger als die gängigen Sequenzierungsmethoden und es kann ein Mutationsnachweis bei Proben mit Tumorinfiltrationsgehalten unter 0,1% durchgeführt werden (Xu et al., 2013). Dies kann insbesondere dann von großer Relevanz sein, wenn der prozentuale Anteil an mutiertem Gewebe im Probenmaterial sehr gering ist, wie z.B. bei Knochenmarkaspiraten von Patienten mit IgM-MGUS (< 1%). Somit hat die Sanger-Sequenzierung mit einer Nachweisgrenze von 15-30% eine zu geringe Sensitivität für die Mutationsdetektion bei Geweben mit sehr geringer Tumorinfiltration. Bei Patienten mit IgM-MGUS konnte mit der AS-PCR im Vergleich zur Sanger-Sequenzierung (10% Mutationsnachweis) (Treon et al., 2012b) in bis zu 87% der Studienfälle eine *MYD88-L265P* Mutation nachgewiesen werden (Jimenez et al., 2013; Capaldi et al., 2014). Somit stellt sich z.B. bei Patienten mit IgM-MGUS ohne *MYD88-L265P* Mutationsnachweis die Frage, ob tatsächlich keine Mutation vorliegt, oder ob die Mutation im Probenmaterial in so geringem Maße

vorliegt, dass die Mutation durch technische Limitationen der Nachweismethode nicht detektiert werden kann.

Mit einem Mutationsnachweis von 94,3% liegt das Ergebnis der *MYD88*-Mutationsanalyse mittels Schmelzpunktanalyse statisch in der Mitte zwischen den Ergebnissen der Sanger-Sequenzierung und der AS-PCR. Der Nachweis der *MYD88*-L265P Mutation ist somit mit dieser Methode durchaus in zuverlässiger Form, auch bei geringem Tumorinfiltrationsgehalt, möglich. In der pathologischen Routinediagnostik ist eine schnelle, wenig kosten- und zeitintensive Methode mit sicherer Bestimmung wichtig. Diese Kriterien werden durch die Schmelzpunktanalyse gewährleistet.

8.4 Einsatz der *MYD88*-L265P Mutationsanalyse als diagnostisches Tool

8.4.1 Differentialdiagnostische Möglichkeiten durch den *MYD88*-L265P Mutationsnachweis

In der pathologischen Differenzierung von B-Zell Tumoren ist es häufig schwierig verschiedene Tumorentitäten mit Zellen plasmazytischer Differenzierung eindeutig zu unterscheiden. Auf Grund der wachsenden Therapiemöglichkeiten für einzelne Entitäten ist eine genaue Differenzierung allerdings notwendig. In verschiedenen Studien wurden LPL-Fälle ohne nachgewiesene *MYD88*-L265P Mutation erneut klinisch-pathologisch begutachtet und dabei zeigte sich zum Beispiel bei einer erneuten diagnostischen Prüfung dieser Fälle in einer Studie von Treon et al. (2017), dass 30% der Studienfälle ohne *MYD88*-L265P Mutation fälschlicherweise als LPL diagnostiziert wurden. Die im Vorfeld falsch diagnostizierten LPL-Fälle wurden später diagnostisch vor allem als MM, MZL, B-CLL eingeordnet (Treon et al., 2017; Insuasti-Beltran et al., 2015). Somit sollte der fehlende Nachweis der *MYD88*-L265P Mutation bei einem LPL zunächst kritisch hinterfragt werden

Diskussion

und die Diagnose sollte genau überprüft werden. Wenn bei einem vorliegenden NHL mit plasmazytischer Differenzierung das LPL eine differenzialdiagnostische Überlegung darstellt, sollte eine *MYD88-L265P* Mutationsanalyse durchgeführt werden (Treon et al., 2017).

Die *MYD88-L265P* Mutation kann bei über 90% der Patienten mit LPL und bei ca. 10% der Patienten mit MZL nachgewiesen werden (Mazzuccellini et al., 2018). Rein statistisch spricht das Vorliegen der *MYD88-L265P* Mutation also eher für ein LPL als für ein SMZL. Neben der *MYD88-L265P* Mutation spricht auch das Vorliegen einer IgM-Paraproteinämie eher für ein LPL als für ein SMZL, jedoch weisen ca. 15% der SMZL genau diese Kriterien auf (Swerdlow et al., 2016b; Martinez-Lopez et al., 2015). Beim SMZL ist die Splenomegalie durch die Infiltration der Milz viel stärker ausgeprägt als beim LPL (Ondrejka et al., 2013). Das Infiltrationsmuster im Knochenmark ist beim SMZL meist paratrabekulär oder nodal (Treon et al., 2017). Beim LPL liegt im Knochenmark vor allem ein intertrabekuläres Infiltrationsmuster vor (Campo et al., 2011; Swerdlow et al., 2016b). Im Unterschied zum MZL liegen beim LPL lymphoplasmozytoide Zellen, Dutcher Körperchen und ein Begleitinfiltrat von Mastzellen vor (Bassarova et al., 2015). Zudem können beim SMZL teilweise andere zytogenetische Veränderungen, wie z.B. die *KLF2*-Mutation (42%), *NOTCH2*-Mutation (25%) und Deletion 7q, nachgewiesen werden (Swerdlow et al., 2016b).

Beim MM liegt nur bei einem geringen Teil der Patienten eine IgM-Paraproteinämie vor, welche jedoch mit hohen IgM-Spiegel einhergehen kann. Das Zellinfiltrat im Knochenmark besteht beim MM, im Gegensatz zum LPL, vor allem aus Plasmazellen. Die Oberflächenantigene CD138, CD56 und Cyclin D1 können beim IgM-MM im Gegensatz zur WM häufig nachgewiesen werden (Dass et al., 2019; Castillo et al., 2017). Die Translokation t(11;14)(q13;q32) ist beim IgM-MM relevant, wird aber beim LPL nicht beschrieben (Annibali et al., 2006; Janz, 2013). Die *MYD88-L265P* Mutation kann beim MM nicht nachgewiesen werden (Mazzuccellini et al., 2018; Swerdlow et al., 2016a).

Diskussion

Bei der B-CLL sind zwar Zellen mit plasmazytischer Zelldifferenzierung, jedoch keine richtigen Plasmazellen wie beim LPL, nachweisbar. Zudem sind die Zellen mit plasmazytischer Differenzierung bei der B-CLL im Gegensatz zum LPL CD138⁻ (Swerdlow et al., 2016b). Die Oberflächenantigene CD5 und CD23 liegen beim LPL sehr selten vor, werden jedoch häufig von B-CLL Zellen exprimiert (Swerdlow et al., 2016b). Als Unterscheidungskriterium zwischen LPL und B-CLL können der *MYD88*-Mutationsstatus und die Expression von LEF1 herangezogen werden. Bei der B-CLL liegt normalerweise keine *MYD88*-L265P Mutation vor. LEF1 wird von Zellen der B-CLL häufig exprimiert und ist ein sensitiver und spezifischer Marker für die B-CLL (Tandon et al., 2015; Swerdlow et al., 2016b).

Neben der *MYD88*-L265P Mutation können auch andere Mutationen wie z.B. die *CXCR4* Mutationen als Unterscheidungskriterium verschiedener NHL in der Differenzialdiagnose herangezogen werden. Insgesamt sind *CXCR4* Mutationen beim LPL in bis zu 40% nachweisbar. In anderen NHL wurde diese Mutation bisher selten beschrieben (Schmidt et al., 2015). Insgesamt könnte so eine Kombination der Mutationsanalyse von *MYD88*-L265P und *CXCR4* die Differentialdiagnose des LPL von anderen klinisch-pathologisch ähnlichen Tumorentitäten erleichtern.

8.4.2 *MYD88*-L265P im Rahmen der Diagnostik der IgM-MGUS und dem Übergang zur WM

Bei Patienten mit IgM-MGUS konnte mittels AS-PCR in 50-80% der Fälle eine *MYD88*-L265P Mutation nachgewiesen werden (Hunter et al., 2014). Somit könnte diese Mutation ein frühes onkogenetisches Ereignis in der Tumorentwicklung des LPL darstellen. Da die IgM-MGUS vermutlich eine Erkrankungsvorstufe der WM darstellt, könnte die *MYD88*-L265P Mutation als Ursprungsmutation gewertet werden, wodurch die Patienten mit IgM-MGUS ein höheres Progressionsrisiko der Erkrankung in Richtung eines Lymphoms, z.B.

Diskussion

des LPL, haben. Auf der anderen Seite wäre es jedoch auch möglich, dass die Patienten andere, bisher noch nicht entdeckte, Mutationen aufweisen, die den „first hit“ darstellen und dann wäre die *MYD88-L265P* Mutation der „second hit“, der den Übergang der IgM-MGUS in die WM beschleunigt (Landgren et al., 2014). Insgesamt wird in der Literatur jedoch von einer Multistep-Entwicklung von der IgM-MGUS zur symptomatischen WM ausgegangen, bei der beide Krankheitsentitäten eine gemeinsame Vorläuferzellgruppe sowie ein gemeinsames onkogenetisches Ereignis (*MYD88-L265P* Mutation) haben (Varettoni et al., 2017). Es ist anzunehmen, dass im Verlauf weitere genetische Veränderungen hinzukommen, die schließlich zu einer stärkeren Expansion der Tumorzellen und einer höheren Produktion von IgM führen, was mit dem Auftreten von klinischen Symptomen einhergeht (Paiva et al., 2015). Die *MYD88-L265P* Mutation ist vermutlich die driver Mutation, durch die maligne Zellen einen Wachstumsvorteil haben, was bei der IgM-MGUS zu einer rascheren Entwicklung eines LPL und einem früheren Übergang in ein symptomatisches Krankheitsstadium führen könnte (Xu et al., 2013, Hunter et al., 2014). Die Deletion 6q wird als späteres Ereignis im Rahmen der Krankheitsentwicklung von der IgM-MGUS zur WM angenommen. Bei Patienten mit IgM-MGUS und Deletion 6q wurden eine allmähliche Zunahme von klonalen Zellen, höhere IgM-Spiegel und eine höhere Rate an Übergängen in eine symptomatische WM beobachtet (Kyle et al., 2012; Paiva et al., 2015; Schop et al., 2006; Ocio et al., 2007). Ebenso wird angenommen, dass *CXCR4* Mutationen eine Rolle bei der Onkogenese und der Entwicklung von einer IgM-MGUS zur WM spielen. *CXCR4* Mutationen konnten bei 30% der Patienten mit WM und bei 20% der Patienten mit IgM-MGUS, jedoch nicht bei Patienten mit IgA- oder IgG-MGUS, nachgewiesen werden (Swerdlow et al., 2016a). Es wird derzeit davon ausgegangen, dass *CXCR4* Mutationen nach der *MYD88-L265P* Mutation auftreten (Varettoni et al., 2017). Experimentell konnte nachgewiesen werden, dass bei *MYD88-L265P/CXCR^{mut}* LPL-Zellen nach einer Inkubation mit *MYD88*-Homodimerisierungs-Hemmstoffen die Apoptose deutlich erhöht ist.

Zudem treten *MYD88-L265P* und *CXCR4* Mutationen immer gemeinsam auf. Daraus könnte die Hypothese gebildet werden, dass die *MYD88-L265P* Mutation die Hauptrolle beim Zellüberleben der LPL-Zellen spielt (Cao et al., 2015). Die *MYD88-L265P* und die *CXCR4* Mutationsanalyse stellen wichtige diagnostische Instrumente dar, bei denen sowohl IgM-MGUS Patienten mit einem höheren Risiko in einen Übergang in die WM, als auch Patienten mit asymptomatischer WM, die rascher in ein symptomatisches Krankheitsstadium übergehen, identifiziert werden können. Somit könnten sich daraus therapeutische Konsequenzen ableiten (Correa et al., 2017).

8.5 Perspektiven

Durch die *MYD88-L265P* Mutation könnten sich sowohl in der Diagnostik als auch in der Therapie von malignen Lymphomen, insbesondere beim LPL, neue Perspektiven bieten. Bei einer eindeutigen klinisch-pathologischen Diagnose eines LPL kann der Mutationsnachweis für den klinischen Verlauf relevant sein, da Patienten mit und ohne *MYD88-L265P* Mutation nach aktueller Studienlage unterschiedliche Krankheitsverläufe haben (Swerdlow et al., 2016). Insgesamt zeigt sich bei Patienten mit einem *MYD88-L265P* positiven LPL zwar eine höhere Krankheitslast, durch eine höhere Knochenmarkinfiltration, jedoch ist die Prognose insgesamt günstiger als bei Patienten mit nicht mutiertem *MYD88*. Bei Patienten mit LPL und *MYD88* Wildtypstatus sind häufiger Transformationen in aggressive Tumoren wie z.B. DLBCL beobachtet worden. Zudem ist die Mortalität bei Patienten mit *MYD88* Wildtypstatus höher (Treon et al., 2014; Rossi et al., 2014).

Neben dem *MYD88* Mutationsstatus spielt auch der *CXCR4* Mutationsstatus eine Rolle bei der Behandlung von Patienten mit WM. Abhängig vom Mutationsstatus können die Patienten in drei Kategorien eingeteilt werden: *MYD88^{WT}/CXCR^{WT}*, *MYD88-L265P/CXCR^{WT}* und *MYD88-L265P/CXCR4^{mut}*.

Diskussion

Abhängig vom Mutationsstatus sprechen Patienten auf verschiedene Therapien besser an. Z.B. sprechen Patienten mit *MYD88* Wildtypstatus besser auf Bendamustin und Rituximab oder Bortezomib, Dexamethason und Rituximab an als auf Ibrutinib. Somit könnte perspektivisch, abhängig vom *MYD88* Mutationsstatus, eine individuelle Therapie bei Patienten mit WM durchgeführt werden (Castillo et al., 2017). Darüber hinaus bietet die *MYD88-L265P* Mutation einen Angriffspunkt für therapeutische Interventionsmöglichkeiten. Mögliche Therapieansätze bestehen in der Hemmung von Zielmolekülen wie *MYD88*, *IRAK1*, *IRAK4* und *BTK* oder in der Blockade von $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ mit Proteasom-Inhibitoren (Yang et al., 2013; Poulain et al., 2013; Treon et al., 2012b). Ein Wirkstoff in der Therapie der WM mit *MYD88-L265P* Mutation könnte Ibrutinib sein, welcher die NF- κ B-Signalkaskade über die *BTK* hemmt und das Tumorzellwachstum vermindert (Treon et al., 2015; Advani et al., 2013; Yang et al., 2013). Auf die Behandlung mit *BTK*-Hemmstoffen wie z.B. Ibrutinib hat jedoch nicht nur der *MYD88* Mutationsstatus sondern auch der *CXCR4* Mutationsstatus einen Einfluss. Besonders gut sprachen Patienten mit *MYD88-L265P* Mutation und *CXCR4^{WT}* auf die Behandlung mit Ibrutinib an. Durch die Aktivierung der *BTK* durch *CXCR4* kommt es bei mutiertem *CXCR4* zur Therapieresistenz hinsichtlich Ibrutinib. Diesbezüglich werden *CXCR4*-Hemmstoffe wie z.B. Plerixafor (Handelsname Mozobil) klinisch untersucht, um dieser Behandlungsresistenz therapeutisch begegnen zu können (Cao et al., 2013; Treon et al., 2013; Hunter et al., 2014; Landgren et al., 2014). Zudem könnte der monoklonale Anti-*CXCR4* Antikörper Ulocuplumab eine Möglichkeit in der Behandlung von WM-Patienten darstellen (Abeykoon et al., 2017). Neben Ibrutinib könnten weitere Teile des NF- κ B Signalweges wie z.B. die *IRAK1* und die *IRAK4* als Ansatzpunkt einer medikamentösen Behandlung dienen. Eine mögliche Behandlungsperspektive wäre z.B. die Kombination von *IRAK1*- und *IRAK4*-Hemmstoffen mit *BTK*-Hemmstoffen wie z.B. Ibrutinib (Landgren et al., 2014). Die *MYD88-L265P* Mutation könnte zudem in der Beurteilung des Therapieansprechens angewendet werden.

Diskussion

Bei Jimenez et al. (2013) wurde die ASO-PCR bei sechs Patienten mit Ansprechen auf die Therapie (Reduktion der IgM-Serumspiegel um 90%) zum Therapiemonitoring angewendet. Xu et al. (2013) beschäftigten sich mit der Fragestellung, ob ein Nachweis der *MYD88-L265P* Mutation, auch im peripheren Blut erfolgen werden kann. Bei unbehandelten Patienten mit CD19⁺ selektierten Zellen (Isolation fand durch ein Magnetfeld statt) lag die Sensitivität bei 98,3%. Bei CD19⁺ selektierten Zellproben aus peripherem Blut, bei bereits behandelten Patienten, betrug die Sensitivität 73%. Insgesamt kann festgehalten werden, dass ein Mutationsnachweis der *MYD88-L265P* Mutation auch im peripheren Blut erfolgen kann, was zeit- und kostengünstig und für den Patienten als nicht-invasive Untersuchungsmethode weniger schmerzhaft und risikobehaftet ist. Bagratuni et al. (2018) konnten bei der Analyse von DNA aus Zellen des peripheren Blutes bei Proben von IgM-MGUS Patienten eine hohe Nachweisrate der *MYD88-L265P* und *CXCR4* Mutationen unter Einsatz der AS-PCR erzielen. Somit könnte perspektivisch nach der Diagnosesicherung, zu der eine Knochenmarkpunktion erforderlich ist, das weitere Therapiemonitoring oder die Bestimmung des Mutationsstatus über die Analyse von zellfreier DNA aus dem peripheren Blut erfolgen.

9 Zusammenfassung

Das LPL ist mit einem Anteil von 1-2% bei den hämatologischen Tumoren eher eine seltene Tumorentität. Bei der Tumorgenese spielen onkologisch verschiedene Signalkaskaden eine Rolle. Eine davon ist die konstitutionelle Aktivierung des NF- κ B- und des JAK-STAT3-Signalweges, welche über das Protein MYD88 vermittelt wird. Es gibt verschiedene Mutationen im MYD88-Protein. Die jedoch am häufigsten vorkommende Mutation, die zur Aktivierung des NF- κ B Signalweges führt, ist die *MYD88-L265P* Mutation. Dies ist eine Punktmutation an der Aminosäurenposition 265 im MYD88-Protein, wobei ein Austausch von Lysin gegen Prolin erfolgt. Durch die dauerhafte Aktivierung des NF- κ B-Signalweges wird die Transkription verstärkt, was proliferationsfördernd wirkt und die Apoptose vermindert. Dies wiederum verstärkt die Tumorentstehung und Tumorentwicklung.

In der hämatoonkologischen Differentialdiagnostik ist anhand der bisherigen diagnostischen Möglichkeiten mittels Klinik, Morphologie und Immunhistochemie nicht immer eine eindeutige Zuordnung zu einer Tumorentität möglich. Bei den Tumorentitäten LPL, MZL und der B-CLL gibt es durchaus Überschneidungen in der klinischen Präsentation, der Morphologie und der Immunhistochemie. Somit stellt sich die Frage, ob mittels der *MYD88-L265P* Mutationsanalyse beim Mutationsstatus Unterschiede zwischen den Tumorentitäten LPL, MZL und B-CLL aufgezeigt werden können, welche in der Differentialdiagnose hilfreich sein können.

In dieser Arbeit wurden insgesamt 61 Patientenfälle untersucht. Dabei wurden 35 Fälle mit LPL und als Vergleichsgruppen zusätzlich elf Fälle mit B-CLL, neun Fälle mit MZL und sechs Fälle mit MM auf das Vorhandensein der *MYD88-L265P* Mutation untersucht. In der pathologischen Routinediagnostik wird vorzüglich FFPE-Gewebe verwendet. Somit war eine Fragestellung der Arbeit, ob eine *MYD88-L265P* Mutationsanalyse auch retrospektiv mittels FFPE-

Zusammenfassung

Knochenmarkbiopsien und Schmelzpunktanalyse möglich ist. Eine weitere Fragestellung war bis zu welchem Tumordinfiltrationsgehalt im Gewebe noch ein Mutationsnachweis mittels der Schmelzpunktanalyse möglich ist.

Bei FFPE-Knochenmark liegt die DNA fragmentiert vor. Bei der PCR zur Prüfung der Amplifizierbarkeit der DNA wurden bei 80,3% der Patientenproben Fragmentlängen von mindestens 200 bp nachgewiesen, was zur Mutationsanalyse ausreichend ist. Bei der Mutationsanalyse konnte ein problemloser und eindeutiger Mutationsnachweis bei Tumordinfiltrationsgehalten zwischen 10% und nahezu 100% erfolgen.

In der Mutationsanalyse konnte bei Patientenproben mit LPL in 94,3% der Fälle eine *MYD88-L265P* Mutation nachgewiesen werden. Diese Mutationsrate entspricht der in der Literatur genannten Nachweisquoten von 67% bis nahezu 100%. Somit ist unter der Verwendung von FFPE-Knochenmark und der Mutationsanalyse mittels Schmelzpunktanalyse ein Mutationsnachweis der *MYD88-L265P* Mutation möglich. Im Vergleich zu der Sanger-Sequenzierung ist die Mutationsanalyse mittels Schmelzpunktanalyse sensitiver, effizienter und weniger kosten- und zeitintensiv. Somit eignet sich dieses Verfahren in der pathologischen Routinediagnostik.

Bei den Vergleichsproben mit MZL und B-CLL konnte eine Mutationsrate von 11,1% und 0% nachgewiesen werden. Somit konnte gezeigt werden, dass die *MYD88-L265P* Mutation spezifischer für das LPL als für das MZL oder die B-CLL ist, was in der Differentialdiagnostik relevant sein könnte.

Perspektivisch könnte die *MYD88-L265P* Mutation nicht nur in der Diagnostik, sondern auch in der therapeutischen Intervention bei NHL, insbesondere beim LPL, von Bedeutung sein. Durch den Einsatz von Inhibitoren, die an Molekülen in der NF- κ B-Signalkaskade angreifen, könnte die Tumorpheriferation und das Tumorstadium gehemmt werden.

10 Quellenverzeichnis

- ABEYKOON, J. P., PALUDO, J., KING, R. L., ANSELL, S. M., GERTZ, M. A., LAPLANT, B. R., HALVORSON, A. E., GONSALVES, W. I., DINGLI, D., FANG, H., RAJKUMAR, S. V., LACY, M. Q., HE, R., KOURELIS, T., REEDER, C. B., NOVAK, A. J., MCPHAIL, E. D., VISWANATHA, D. S., WITZIG, T. E., GO, R. S., HABERMANN, T. M., BUADI, F. K., DISPENZIERI, A., LEUNG, N., LIN, Y., THOMPSON, C. A., HAYMAN, S. R., KYLE, R. A., KUMAR, S. K., KAPOOR, P. 2018. MYD88 mutation status does not impact overall survival in Waldenstrom macroglobulinemia. *Am J Hematol*, 93, 187-194.
- ABEYKOON, J. P., YANAMANDRA, U., KAPOOR, P. 2017. New developments in the management of Waldenstrom macroglobulinemia. *Cancer Manag Res*, 9, 73-83.
- ADVANI, R. H., BUGGY, J. J., SHARMAN, J. P., SMITH, S. M., BOYD, T. E., GRANT, B., KOLIBABA, K. S., FURMAN, R. R., RODRIGUEZ, S., CHANG, B. Y., SUKBUNTHERNG, J., IZUMI, R., HAMDY, A., HEDRICK, E. & FOWLER, N. H. 2013. Bruton tyrosine kinase inhibitor ibrutinib (PCI-32765) has significant activity in patients with relapsed/refractory B-cell malignancies. *J Clin Oncol*, 31, 88-94.
- AKIRA, S. & TAKEDA, K. 2004. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol*, 4, 499-511.
- ALEXANIAN, R., WEBER, D., DELASALLE, K., CABANILLAS, F. & DIMOPOULOS, M. 2003. Asymptomatic Waldenstrom's macroglobulinemia. *Semin Oncol*, 30, 206-10.
- ALAPAT, D., COVIELLO-MALLE, J., OWENS, R., QU, P., BARLOGIE, B., SHAUGHNESSY, J. D., LORSBACH, R. B. 2012. *Am J Clin Pathol*, 137, 93-100.
- ANNIBALI, O., PETRUCCI, M. T., DEL BIANCO, P., GALLUCCI, C., LEVI, A., FOA, R., AVVISATI, G. IgM multiple myeloma: report of four cases and review of the literature. 2006, *Leuk Lymphoma*, 47, 1565-9.
- ANSELL, S. M., HODGE, L. S., SECRETO, F. J., MANSKE, M., BRAGGIO, E., PRICE-TROSKA, T., ZIESMER, S., LI, Y., JOHNSON, S. H., HART, S. N., KOCHER, J. P., VASMATZIS, G., CHANAN-KAHN, A., GERTZ, M., FONSECA, R., DOGAN, A., CERHAN, J. R., NOVAK, A. J. 2014. Activation of TAK1 by MYD88 L265P drives malignant B-cell Growth in non-Hodgkin lymphoma. *Blood cancer journal*, 4, e183.
- ARCAINI, L., ROSSI, D., PAULLI, M. 2016. Splenic marginal zone lymphoma: from genetics to management. *Blood*, 127, 2072-81.

Quellenverzeichnis

- ARCAINI, L., VARETTONI, M., BOVERI, E., ORLANDI, E., RATTOTTI, S., ZIBELLINI, S., MERLI, M., LUCIONI, M., RIZZI, S., GOTTI, M., MORELLO, L., PASCUTTO, C. & PAULLI, M. 2011. Distinctive clinical and histological features of Waldenstrom macroglobulinemia an splenic marginal zone lymphoma. *Clinical Lymphoma, Myeloma and Leukemia*, 11, 103–105.
- ATRASH, S., ZHANG, Q., PAPANIKOLAOU, X., STEIN, C., ABDALLAH, A. O., BARLOGIE, B. 2018. Clinical Presentation and Gene Expression Profiling of Immunoglobulin M Multiple Myeloma Compared With Other Myeloma Subtypes and Waldenstrom Macroglobulinemia. *J Glob Oncol*, 4, 1-8.
- AVET-LOISEAU, H., GARAND, R., LODE, L., ROBILLARD, N. & BATAILLE, R. 2003. 14q32 Translocations discriminate IgM multiple myeloma from Waldenstrom's macroglobulinemia. *Semin Oncol*, 30, 153-5.
- BAEHRING, J. M., HOCHBERG, E. P., RAJE, N., ULRICKSON, M., HOCHBERG, F. H. 2008. Neurological manifestations of Waldenstrom macroglobulinemia. *Nat Clin Pract Neurol*, 4, 547-56.
- BAGRATUNI, T., NTANANIS-STATHOPOULOS, I., GAVRIATOPOULOU, M., MAVRIANOU-KOUTSOUKOU, N., LIACOS, C., PATSEAS, D., KANELLIAS, N., MIGKOU, M., ZIOGAS, D. C., ELEUTHERAKIS-PAPAIKOVOU, E., ROUSSOU, M., FOTIOU, D., TERPOS, E., KASTRITIS, E., DIMOPOULOS, M. A. 2018. Detection of MYD88 and CXCR4 mutations in cell-free DNA of patients with IgM monoclonal gammopathies. *Leukemia*, 32, 2617-2625.
- BALDINI, L., GOLDANIGA, M., GUFFANTI, A., BROGLIA, C., CORTELAZZO, S., ROSSI, A., MORRA, E., COLOMBI, M., CALLEA, V., POGLIANI, E., ILARIUCCI, F., LUMINARI, S., MOREL, P., MERLINI, G. & GOBBI, P. 2005. Immunoglobulin M monoclonal gammopathies of undetermined significance and indolent Waldenstrom's macroglobulinemia recognize the same determinants of evolution into symptomatic lymphoid disorders: proposal for a common prognostic scoring system. *J Clin Oncol*, 23, 4662-8.
- BALIAKAS, P., HADZIDIMITRIOU, A., SUTTON, L. A., ROSSI, D., MINGA, E., VILLAMOR, N., LARRAYOZ, M., KMINKOVA, J., AGATHANGELIDIS, A., DAVIS, Z., TAUSCH, E., STALIKA, E., KANTOROVA, B., MANSOURI, L., SCARFO, L., CORTESE, D., NAVRKALOVA, V., ROSE-ZERILLI, M. J., SMEDBY, K. E., JULIUSSON, G., ANAGNOSTOPOULOS, A., MAKRIS, A. M., NAVARRO, A., DELGADO, J., OSCIER, D., BELESSI, C., STILGENBAUER, S., GHIA, P., POSPISILOVA, S., GAIDANO, G., CAMPO, E., STREFFORD, J. C., STAMATOPOULOS, K., ROSENQUIST, R. 2015. Recurrent mutations refine prognosis in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*, 29, 329-36.

Quellenverzeichnis

- BARAKAT, F. H., MEDEIROS, L. J., WEI, E. X., KONOPELV, S., Lin, P., JORGENSEN, J. L. 2011. Residual monotypic plasma cells in patients with waldenstrom macroglobulinemia after therapy. *AM J Clin Pathol*, 135, 365-373.
- BASEGGIO, L., TRAVERSE-GLEHEN, A., PETINATAUD, F., CALLET-BAUCHU, E., BERGER, F., FFRENCH, M., COURIS, C. M., THIEBLEMONT, C., MOREL, D., COIFFIER, B., SALLES, G., FELMAN, P. 2010. CD5 expression identifies a subset of splenic marginal zone lymphomas with higher lymphocytosis: a clinico-pathological, cytogenetic and molecular study of 24 cases. *Haematologica*, 95, 604-12.
- BASSAROVA, A., TROEN, G., SPETALEN, S., MICCI, F., TIERENS, A. & DELABIE, J. 2015. Lymphoplasmacytic lymphoma and marginal zone lymphoma in the bone marrow: paratrabecular involvement as an important distinguishing feature. *American Journal of Clinical Pathology*, 143, 797–806.
- BJORKHOLM, M., JOHANSSON, E., PAPAMICHAEL, D., CELSING, F., MATTHEWS, J., LISTER, T. A. & ROHATINER, A. Z. 2003. Patterns of clinical presentation, treatment, and outcome in patients with Waldenstrom's macroglobulinemia: a two-institution study. *Semin Oncol*, 30, 226-30.
- BLUM, W., PORCU, P. 2007. Therapeutic apheresis in hyperleukocytosis and hyperviscosity syndrome. *Semin Thromb Hemost*, 33, 350-4.
- BUSKE, C., LEBLOND, V., DIMOPOULOS, M., KIMBY, E., JAGER, U., DREYLING, M. 2013. Waldenstrom's macroglobulinaemia: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*, 24 Suppl 6, vi155-9
- CALIN, G. A., DUMITRU, C. D., SHIMIZU, M., BICHI, R., ZUPO, S., NOCH, E., ALDLER, H., RATTAN, S., KEATING, M., RAI, K., RASSENTI, L., KIPPS, T., NEGRINI, M., BULLRICH, F., CROCE, C. M. 2002. Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 1554-15529.
- CAERS, J., FERNANDEZ DE LARREA, C., LELEU, X., HEUSSCHEN, R., ZOJER, N., DECAUX, O., KASTRITIS, E., MINNEMA, M., JURCZYSZYN, A., BEGUIN, Y., WASCH, R., PALUMBO, A., DIMOPOULOS, M., MATEOS, M. V., LUDWIG, H., ENGELHARDT, M. 2016. The Changing Landscape of Smoldering Multiple Myeloma: A European Perspective. *Oncologist*, 21, 333-42.
- CAMPO, E., SWERDLOW, S. H., HARRIS, N. L., PILERI, S., STEIN, H. & JAFFE, E. S. 2011. The 2008 WHO classification of lymphoid neoplasms

Quellenverzeichnis

- and beyond: evolving concepts and practical applications. *Blood*, 117, 5019-32.
- CAERS, J., GARDERET, L., KORTUM, K. M., O'DWYER, M. E., VAN DE DONK, NWCJ, BINDER, M., DOLD, S. M., GAY, F., CORRE, J., BEGUIN, Y., LUDWIG, H., LAROCCA, A., DRIESSEN, C., DIMOPOULOS, M. A., BOCCADORO, M., GRAMATZKI, M., ZWEEGMAN, S., EINSELE, H., CAVO, M., GOLDSCHMIDT, H., SONNEVELD, P., DELFORGE, M., AUNER, H. W., TERPOS, E., ENGELHARDT, M. 2018. European Myeloma Network recommendations on tools for the diagnosis and monitoring of multiple myeloma: what to use and when. *Haematologica*, 103, 1772-1784.
- CAO, Y., HUNTER, Z. R., LIU, X., XU, L., YANG, G., CHEN, J., TSAKMAKLIS, N., KANAN, S., CASTILLO, J. J., TREON, S. P. 2015. CXCR4 WHIM-like frameshift and nonsense mutations promote ibrutinib resistance but do not supplant MYD88(L265P) -directed survival signalling in Waldenstrom macroglobulinaemia cells. *Br J Haematol*, 168, 701-7.
- CAO, Y., HUNTER, Z., LIU, X., XU, L., YANG, G., TRIPSAS, C. K., MANNING, R., PATTERSON, C., TREON, S. P. 2013. Somatic Activating Mutations In CXCR4 Are Common In Patients With Waldenstrom's Macroglobulinemia, and Their Expression In WM Cells Promotes Resistance To Ibrutinib. *Blood*, 122, Abstract 4424.
- CAO, Y., XU, L., LIU, X., ZHOU, Y., YANG, G., PATTERSON, C. J., TREON, S., HUNTER, Z. 2014. Whole Genome Sequencing Identifies Recurring Somatic Mutations in the C-Terminal Domain of CXCR4, Including a Gain of Function Mutation in Waldenstrom's Macroglobulinemia, *Blood*, 120, Abstract 2715.
- CAPALDI, I. B., MAY, A. M., SCHMITT-GRAEFF, A., FOLLO, M., AUMANN, K., KAYSER, G., PERAZZO, J. C., WERNER, M., FISCH, P. 2014. Detection of MYD88 L265P mutations in formalin-fixed and decalcified BM biopsies from patients with lymphoplasmacytic lymphoma. *Exp Mol Pathol*, 97, 57-65.
- CASTILLO, J. J., GUSTINE, J., MEID, K., DUBEAU, T., HUNTER, Z. R., TREON, S. P. 2016. Histological transformation to diffuse large B-cell lymphoma in patients with Waldenstrom macroglobulinemia. *Am J Hematol*, 91, 1032-5.
- CASTILLO, J. J., OLSZEWSKI, A. J., KANAN, S., MEID, K., HUNTER, Z. R., TREON, S. P. 2015. Overall survival and competing risks of death in patients with Waldenstrom macroglobulinaemia: an analysis of the Surveillance, Epidemiology and End Results database. *Br J Haematol*, 169, 81-9.

Quellenverzeichnis

- CASTILLO, J. J., TREON, S. P. 2017. Toward personalized treatment in Waldenstrom macroglobulinemia. 2017. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 2017, 365-370.
- CICCONE, M., AGOSTINELLI, C., RIGOLIN, G. M., PICCALUGA, P. P., CAVAZZINI, F., RIGHI, S., SISTA, M. T., SOFRITTI, O., RIZZOTTO, L., SABATTINI, E., FIORITONI, G., FALORIO, S., STELITANO, C., OLIVIERI, A., ATTOLICO, I., BRUGIATELLI, M., ZINZANI, P. L., SACCENTI, E., CAPELLO, D., NEGRINI, M., CUNEO, A., PILERI, S. 2012. Proliferation centers in chronic lymphocytic leukemia: correlation with cytogenetic and clinicobiological features in consecutive patients analyzed on tissue microarrays. *Leukemia*, 26, 499-508.
- CLIPSON, A., WANG, M., DE LEVAL, L., ASHTON-KEY, M., WOTHERSPOON, A., VASSILIOU, G., BOLLI, N., GROVE, C., MOODY, S., ESCUDERO-IBARZ, L., GUNDEM, G., BRUGGER, K., XUE, X., MI, E., BENCH, A., SCOTT, M., LIU, H., FOLLOWS, G., ROBLES, E. F., MARTINEZ-CLIMENT, J. A., OSCIER, D., WATKINS, A. J., DU, M. Q. 2015. KLF2 mutation is the most frequent somatic change in splenic marginal zone lymphoma and identifies a subset with distinct genotype. *Leukemia*, 29, 1177-85.
- COHEN, L., HENZEL, W. J. & BAEUERLE, P. A. 1998. IKAP is a scaffold protein of the I κ B kinase complex. *Nature*, 395, 292-6.
- CORREA, J. G., CIBEIRA, M. T., TOVAR, N., ISOLA, I., PEDROSA, F., DIAZ, T., LOZANO, E., MAGNANO, L., ROSINOL, L., BLADE, J., FERNANDEZ DE LARREA, C. 2017. Prevalence and prognosis implication of MYD88 L265P mutation in IgM monoclonal gammopathy of undetermined significance and smouldering Waldenstrom macroglobulinaemia. *Br J Haematol*, 179, 849-851.
- DASS, J., ARAVA, S., MISHRA, P. C., DINDA, A. K., PATI, H. P. 2019. Role of CD138, CD56, and light chain immunohistochemistry in suspected and diagnosed plasma cell myeloma: A prospective study. *South Asian J Cancer*, 8, 60-64.
- DEANS, J. P., POLYAK, M. J. 2008. *Blood*, 111, 2492; author reply 2493-4.
- DEMCHENKO, Y. N., GLEBOV, O. K., ZINGONE, A., KEATS, J. J., BERGSAGEL, P. L. & KUEHL, W. M. 2010. Classical and/or alternative NF- κ B pathway activation in multiple myeloma. *Blood*, 115, 3541-52.
- DIMOPOULOS, M. A. & ANAGNOSTOPOULOS, A. 2005. Waldenstrom's macroglobulinemia. *Best Pract Res Clin Haematol*, 18, 747-65.
- DIMOPOULOS, M. A., KASTRITIS, E., GHOBRIAL, I. M. 2015. Waldenstrom's macroglobulinemia: a clinical perspective in the era of novel therapeutics.

Quellenverzeichnis

Ann Oncol, 27, 233-40.

- DIMOPOULOS, M. A., PANAYIOTIDIS, P., MOULOPOULOS, L. A., SFIKAKIS, P. & DALAKAS, M. 2000. Waldenstrom's macroglobulinemia: clinical features, complications, and management. *J Clin Oncol*, 18, 214-26.
- DIMOPOULOS, M. A., TEDESCHI, A., TROTMAN, J., GARCIA-SANZ, R., MACDONALD, D., LEBLOND, V., MAHE, B., HERBAUX, C., TAM, C., ORSUCCI, L., PALOMBA, M. L., MATOUS, J. V., SHUSTIK, C., KASTRITIS, E., TREON, S. P., LI, J., SALMAN, Z., GRAEF, T., BUSKE, C. 2018. Phase 3 Trial of Ibrutinib plus Rituximab in Waldenstrom's Macroglobulinemia. *N Engl J Med*, 378, 2399-2410.
- DIMOPOULOS, M. A., TROTMAN, J., TEDESCHI, A., MATOUS, J. V., MACDONALD, D., TAM, C., TOURNILHAC, O., MA, S., ORIOL, A., HEFFNER, L. T., SHUSTIK, C., GARCIA-SANZ, R., CORNELL, R. F., DE LARREA, C. F., CASTILLO, J. J., GRANELL, M., KYRTSONIS, M. C., LEBLOND, V., SYMEONIDIS, A., KASTRITIS, E., SINGH, P., LI, J., GRAEF, T., BILOTTI, E., TREON, S., BUSKE, C. 2017. Ibrutinib for patients with rituximab-refractory Waldenstrom's macroglobulinaemia (iINNOVATE): an open-label substudy of an international, multicentre, phase 3 trial. *Lancet Oncol*, 18, 241-250.
- EUSKIRCHEN, G. M., AUERBACH, R. K., DAVIDOV, E., GIANOULIS, T. A., ZHONG, G., ROZOWSKY, J., BHARDWAJ, N., GERSTEIN, M. B., SNYDER, M. 2011. Diverse roles and interactions of the SWI/SNF chromatin remodeling complex revealed using global approaches. *PLoS Genet*, 7, e1002008.
- FADIL, A. & TAYLOR, D. E. 1998. The lung and Waldenstrom's macroglobulinemia. *South Med J*, 91, 681-5.
- FLORES-MONTERO, J., DE TUTE, R., PAIVA, B., PEREZ, J. J., BOTTCHEER, S., WIND, H., SANOJA, L., PUIG, N., LECREVISSE, Q., VIDRIALES, M. B., VAN DONGEN, J. J., ORFAO, A. 2016. Immunophenotype of normal vs. myeloma plasma cells: Toward antibody panel specifications for MRD detection in multiple myeloma. *Cytometry B Clin Cytom*, 90, 61-72.
- FOA, R., GUARINI, A. 2013. A mechanism-driven treatment for chronic lymphocytic leukemia? *N Engl J Med*, 369, 85-7.
- FONSECA, R., HAYMAN, S. 2007. Waldenström macroglobulinaemia. *British Journal of Haematology*, 138, 700-720.
- GACHARD, N., PARRENS, M., SOUBEYRAN, I., PETIT, B., MARFAK, A., RIZZO, D., DEVESA, M., DELAGE-CORRE, M., COSTE, V., LAFORET, M. P., DE MASCAREL, A., MERLIO, J. P., BOUABDHALLA, K., MILPIED, N., SOUBEYRAN, P., SCHMITT, A., BORDESSOULE, D., COGNE, M. & FEUILLARD, J. 2013. IGHV gene features and MYD88

Quellenverzeichnis

- L265P mutation separate the three marginal zone lymphoma entities and Waldenstrom macroglobulinemia/lymphoplasmacytic lymphomas. *Leukemia*, 27, 183-9.
- GERTZ, M. A. 2012. Waldenstrom macroglobulinemia: 2012 update on diagnosis, risk stratification, and management. *Am J Hematol*, 87, 503-10.
- GERTZ, M. A. 2015. Waldenstrom macroglobulinemia: 2015 update on diagnosis, risk stratification, and management. *Am J Hematol*, 90, 346-54.
- GERTZ, M. A. 2017. Waldenstrom macroglobulinemia: 2017 update on diagnosis, risk stratification, and management. *Am J Hematol*, 92, 209-2017.
- GERTZ, M.A. 2019. Waldenstrom macroglobulinemia: 2019 update on diagnosis, risk stratification, and management. *Am J Hematol*, 94, 266-276.
- GERTZ, M. A., KYLE RA. 1995. Hyperviscosity syndrome. *J Intensive Care Med*, 10, 128-141.
- GIBSON, S. E., LEEMAN-NEILL, R. J., JAIN, S., PIAO, W., CIEPLY, K. M., SWERDLOW, S. H. 2016. Proliferation centres of chronic lymphocytic leukaemia/small lymphocytic lymphoma have enhanced expression of MYC protein, which does not result from rearrangement or gain of the MYC gene. *Br J Haematol*, 175, 173-5.
- GINE, E., MARTINEZ, A., VILLAMOR, N., LOPEZ-GUILLERMO, A., CAMOS, M., MARTINEZ, D., ESTEVE, J., CALVO, X., MUNTANOLA, A., ABRISQUETA, P., ROZMAN, M., ROZMAN, C., BOSCH, F., CAMPO, E., MONTSERRAT, E. 2010. Expanded and highly active proliferation centers identify a histological subtype of chronic lymphocytic leukemia ("accelerated" chronic lymphocytic leukemia) with aggressive clinical behavior. *Haematologica*, 95, 1526-33.
- GHOBRAL, I. M. 2012. Are you sure this is Waldenstrom macroglobulinemia? *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 2012, 586-94.
- GONZALEZ-AGUILAR, A., IDBAIH, A., BOISSELIER, B., HABBITA, N., ROSSETTO, M., LAURENCE, A., BRUNO, A., JOUVET, A., POLIVKA, M., ADAM, C., FIGARELLA-BRANGER, D., MIQUEL, C., VITAL, A., GHESQUIERES, H., GRESSIN, R., DELWAIL, V., TAILLANDIER, L., CHINOT, O., SOUBEYRAN, P., GYAN, E., CHOQUET, S., HOUILLIER, C., SOUSSAIN, C., TANGUY, M. L., MARIE, Y., MOKHTARI, K. & HOANG-XUAN, K. 2012. Recurrent mutations of MYD88 and TBL1XR1 in primary central nervous system lymphomas. *Clin Cancer Res*, 18, 5203-11.

Quellenverzeichnis

- GRADOWSKI, J. F., SARGENT, R. L., CRAIG, F. E., CIEPLY, K., FUHRER, K., SHERER, C., SWERDLOW, S. H. 2012. Chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma with cyclin D1 positive proliferation centers do not have CCND1 translocations or gains and lack SOX11 expression. *Am J Clin Pathol*, 138, 132-9.
- GROWKOVA, K., KRYUKOVA, E., KUFOVA, Z., FILIPOVA, J., SEVCIKOVA, T., RIHOVA, L., KASCAK, M., KRYUKOV, F., HAJEK, R. 2017. Waldenstrom's macroglobulinemia: Two malignant clones in a monoclonal disease? Molecular background and clinical reflection. *Eur J Haematol*, 99, 469-478.
- GUAN, B., WANG, T. L., SHIH IE, M. 2011. ARID1A, a factor that promotes formation of SWI/SNF-mediated chromatin remodeling, is a tumor suppressor in gynecologic cancers. *Cancer Res*, 71, 6718-27.
- GUPTA, D., LIM, M. S., MEDEIROS, L. J., ELENITOBA-JOHNSON, K. S. 2000. Small lymphocytic lymphoma with perifollicular, marginal zone, or interfollicular distribution. *Mod Pathol*, 13, 1161-1166.
- GUSTINE, J. N., MEID, K., DUBEAU, T., HUNTER, Z. R., XU, L., YANG, G., GHOBRIAL, I. M., TREON, S. P., CASTILLO, J. J. 2017. Serum IgM level as predictor of symptomatic hyperviscosity in patients with Waldenstrom macroglobulinaemia. *Br J Haematol*, 177, 717-725.
- HALLEK, M. 2017. Chronic lymphocytic leukemia: 2017 update on diagnosis, risk stratification, and treatment. *Am J Hematol*, 92, 946-965.
- HEROLD, G. und Mitarbeiter 2012. Innere Medizin, Köln, S. 65-71
- HO, A. W., HATJIHARISSI, E., CICCARELLI, B. T., BRANAGAN, A. R., HUNTER, Z. R., LELEU, X., TOURNILHAC, O., XU, L., O'CONNOR, K., MANNING, R. J., SANTOS, D. D., CHEMALY, M., PATTERSON, C. J., SOUMERAI, J. D., MUNSHI, N. C., MCEARCHERN, J. A., LAW, C. L., GREWAL, I. S., TREON, S. P. 2008. CD27-CD70 interactions in the pathogenesis of Waldenstrom macroglobulinemia. *Blood*, 112, 4683-9.
- HUNTER, Z. R., XU, L., YANG, G., ZHOU, Y., LIU, X., CAO, Y., MANNING, R. J., TRIPSAS, C., PATTERSON, C. J., SHEEHY, P., TREON, S. P. 2014. The genomic landscape of Waldenstrom macroglobulinemia is characterized by highly recurring MYD88 and WHIM-like CXCR4 mutations, and small somatic deletions associated with B-cell lymphomagenesis. *Blood*, 123, 1637-1646.
- HUNTER, Z. R., YANG, G., XU, L., LIU, X., CASTILLO, J. J., TREON, S. P. 2017. Genomics, Signaling, and Treatment of Waldenstrom Macroglobulinemia. *J Clin Oncol*, 35, 994-1001.
- INSUASTI-BELTRAN, G., GALE, J. M., WILSON, C. S., FOUCAR, K., CZUCHLEWSKI, D. R. 2015. Significance of MYD88 L265P Mutation

Quellenverzeichnis

- Status in the Subclassification of Low-Grade B-Cell Lymphoma/Leukemia. *Arch Pathol Lab Med*, 139, 1035-41.
- JANZ, S. 2013. Waldenstrom macroglobulinemia: clinical and immunological aspects, natural history, cell of origin, and emerging mouse models. *ISRN Hematol*, 2013, 815325.
- JEELALL, Y. S. & HORIKAWA, K. 2011. Oncogenic MYD88 mutation drives Toll pathway to lymphoma. *Immunol Cell Biol*, 89, 659-60.
- JEMAL, A., SIEGEL, R., WARD, E., MURRAY, T., XU, J., THUN, M. J. 2007. Cancer statistics 2007. *CA Cancer J Clin*, 57, 43-66.
- JIMENEZ, C., SEBASTIAN, E., CHILLON, M. C., GIRALDO, P., MARIANO HERNANDEZ, J., ESCALANTE, F., GONZALEZ-LOPEZ, T. J., AGUILERA, C., DE COCA, A. G., MURILLO, I., ALCOCEBA, M., BALANZATEGUI, A., SARASQUETE, M. E., CORRAL, R., MARIN, L. A., PAIVA, B., OCIO, E. M., GUTIERREZ, N. C., GONZALEZ, M., SAN MIGUEL, J. F. & GARCIA-SANZ, R. 2013. MYD88 L265P is a marker highly characteristic of, but not restricted to, Waldenstrom's macroglobulinemia. *Leukemia*, 27, 1722-8.
- JOHNSON, S. A., BIRCHALL, J., LUCKIE, C., OSCIER, D. G., OWEN, R. G. & HAEMATO-ONCOLOGY TASK FORCE OF THE BRITISH COMMITTEE FOR STANDARDS IN, H. 2006. Guidelines on the management of Waldenstrom macroglobulinaemia. *Br J Haematol*, 132, 683-97.
- KASEB H, MEWAWALLA P. Cancer, Lymphoma, Lymphoplasmacytic (Waldenstrom Macroglobulinemia) [Updated 2018 Oct 27]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): *StatPearls Publishing*; 2018 Jan.
- KAWAGOE, T., SATO, S., MATSUSHITA, K., KATO, H., MATSUI, K., KUMAGAI, Y., SAITOH, T., KAWAI, T., TAKEUCHI, O. & AKIRA, S. 2008. Sequential control of Toll-like receptor-dependent responses by IRAK1 and IRAK2. *Nat Immunol*, 9, 684-91.
- KAWAI, T. & AKIRA, S. 2010. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol*, 11, 373-84.
- KIEL, M. J., VELUSAMY, T., BETZ, B. L., ZHAO, L., WEIGELIN, H. G., CHIANG, M. Y., HUEBNER-CHAN, D. R., BAILEY, N. G., YANG, D. T., BHAGAT, G., MIRANDA, R. N., BAHLER, D. W., MEDEIROS, L. J., LIM, M. S., ELENITOBA-JOHNSON, K. S. 2012. Whole-genome sequencing identifies recurrent somatic NOTCH2 mutations in splenic marginal zone lymphoma. *J Exp Med*, 209, 1553-65.
- KING, R. L., HOWARD, M. T., HODNEFIELD, J. M., MORICE, W. G. 2013. IgM multiple myeloma: pathologic evaluation of a rare entity. *Am J Clin Pathol*, 140, 519-24.
- KIPPS, T. J., STEVENSON, F. K., WU, C. J., CROCE, C. M., PACKHAM, G.,

Quellenverzeichnis

- WIERDA, W. G., O'BRIEN, S., GRIBBEN, J., RAI, K. 2017. Chronic lymphocytic leukaemia. *Nat Rev Dis Primers*, 3, 17008.
- KRISTINSSON, S. Y., BJORKHOLM, M., GOLDIN, L. R., MCMASTER, M. L., TURESSON, I., LANDGREN, O. 2008. Risk of lymphoproliferative disorders among first-degree relatives of lymphoplasmacytic lymphoma/Waldenstrom macroglobulinemia patients: a population-based study in Sweden. *Blood*, 112, 3052-6.
- KYLE, R. A., BENSON, J. T., LARSON, D. R., THERNEAU, T. M., DISPENZIERI, A., KUMAR, S., MELTON, L. J., 3RD & RAJKUMAR, S. V. 2012. Progression in smoldering Waldenstrom macroglobulinemia: long-term results. *Blood*, 119, 4462-6.
- KYLE, R. A., GERTZ, M. A., WITZIG, T. E., LUST, J. A., LACY, M. Q., DISPENZIERI, A., FONSECA, R., RAJKUMAR, S. V., OFFORD, J. R., LARSON, D. R., PLEVAK, M. E., THERNEAU, T. M., GREIPP, P. R. 2003a. Review of 1027 patients with newly diagnosed multiple myeloma. *Mayo Clin Proc*, 78, 21-33.
- KYLE, R. A., THERNEAU, T. M., RAJKUMAR, S. V., OFFORD, J. R., LARSON, D. R., PLEVAK, M. F. & MELTON, L. J., 3RD 2002. A long-term study of prognosis in monoclonal gammopathy of undetermined significance. *N Engl J Med*, 346, 564-9.
- KYLE, R. A., THERNEAU, T. M., RAJKUMAR, S. V., OFFORD, J. R., LARSON, D. R., PLEVAK, M. F. & MELTON, L. J., 3RD 2003b. Long-term follow-up of IgM monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Semin Oncol*, 30, 169-71.
- KYLE, R. A., TREON, S. P., ALEXANIAN, R., BARLOGIE, B., BJORKHOLM, M., DHODAPKAR, M., LISTER, T. A., MERLINI, G., MOREL, P., STONE, M., BRANAGAN, A. R. & LEBLOND, V. 2003c. Prognostic markers and criteria to initiate therapy in Waldenstrom's macroglobulinemia: consensus panel recommendations from the Second International Workshop on Waldenstrom's Macroglobulinemia. *Semin Oncol*, 30, 116-20.
- LANDGREN, O., TAGEJA, N. 2014. MYD88 and beyond: novel opportunities for diagnosis, prognosis and treatment in Waldenstrom's Macroglobulinemia. *Leukemia*, 28, 1799-803.
- LELEU, X., EECKHOUTE, J., JIA, X., ROCCARO, A. M., MOREAU, A. S., FARAG, M., SACCO, A., NGO, H. T., RUNNELS, J., MELHEM, M. R., BURWICK, N., AZAB, A., AZAB, F., HUNTER, Z., HATJIHARISSI, E., CARRASCO, D. R., TREON, S. P., WITZIG, T. E., HIDESHIMA, T., BROWN, M., ANDERSON, K. C. & GHOBRIAL, I. M. 2008. Targeting NF-kappaB in Waldenstrom macroglobulinemia. *Blood*, 111, 5068-77.

Quellenverzeichnis

- LIM, K. H., YANG, Y. & STAUDT, L. M. 2012. Pathogenetic importance and therapeutic implications of NF-kappaB in lymphoid malignancies. *Immunol Rev*, 246, 359-78.
- LIN, P., MANSOOR, A., BUESO-RAMOS, C., HAO, S., LAI, R., MEDEIROS, L. J. 2003. Diffuse large B-cell lymphoma occurring in patients with lymphoplasmacytic lymphoma/Waldenstrom macroglobulinemia. Clinicopathologic features of 12 cases. *Am J Clin Pathol*, 120, 246-53.
- LIN, S. C., LO, Y. C. & WU, H. 2010. Helical assembly in the MyD88-IRAK4-IRAK2 complex in TLR/IL-1R signalling. *Nature*, 465, 885-90.
- LU, L., ZHU, F., ZHANG, M., LI, Y., DRENNAN, A. C., KIMPARA, S., RUMBALL, I., SELZER, C., CAMERON, H., KELLICUT, A., KELM, A., WANG, F., WALDMANN, T. A. & RUI, L. 2018. Gene regulation and suppression of type I interferon signaling by STAT3 in diffuse large B cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 115, E498-E505.
- MAES, B. & DE WOLF-PEETERS, C. 2002. Marginal zone cell lymphoma--an update on recent advances. *Histopathology*, 40, 117-26.
- MARTINEZ-LOPEZ, A., CURIEL-OLMO, S., MOLLEJO, M., CERECEDA, L., MARTINEZ, N., MONTES-MORENO, S., ALMARAZ, C., REVERT, J. B., PIRIS, M. A. 2015. MYD88 (L265P) somatic mutation in marginal zone B-cell lymphoma. *Am J Surg Pathol*, 39, 644-51.
- MAZZUCHELLI, M., FRUSTACI, A. M., DEODATO, M., CAIROLI, R., TEDESCHI, A. 2018. Waldenstrom's Macroglobulinemia: An Update. *Mediterr J Hematol Infect Dis*, 10, e2018004.
- MEDZHITOV, R., PRESTON-HURLBURT, P., KOPP, E., STADLEN, A., CHEN, C., GHOSH, S. & JANEWAY, C. A., JR. 1998. MyD88 is an adaptor protein in the hToll/IL-1 receptor family signaling pathways. *Mol Cell*, 2, 253-8.
- MELO, J. V., CATOVSKY, D. & GALTON, D. A. 1986. The relationship between chronic lymphocytic leukaemia and prolymphocytic leukaemia. II. Patterns of evolution of 'prolymphocytoid' transformation. *Br J Haematol*, 64, 77-86.
- MENTER, T., DIRNHOFER, S., TZANKOV, A. 2015. LEF1: a highly specific marker for the diagnosis of chronic lymphocytic B cell leukaemia/small lymphocytic B cell lymphoma. *J Clin Pathol*, 68, 473-8.
- MINNEMA, M. C., KIMBY, E., D'SA, S., FORNECKER, L. M., POULAIN, S., SNIJDERS, T. J., KASTRITIS, E., KREMER, S., FITSIORI, A., SIMON, L., DAVI, F., LUNN, M., CASTILLO, J. J., PATTERSON, C. J., LE GARFF-TAVERNIER, M., COSTOPOULOS, M., LEBLOND, V., KERSTEN, M. J., DIMOPOULOS, M. A., TREON, S. P. 2017. Guideline for the diagnosis, treatment and response criteria for Bing-Neel

Quellenverzeichnis

- syndrome. *Haematologica*, 102, 43-51.
- MONTEIRO, J. P., BENJAMIN, A., COSTA, E. S., BARCINSKI, M. A., BONOMO, A. 2005. Normal hematopoiesis is maintained by activated bone marrow CD4+ T cells. *Blood*, 105, 1484-91.
- MONTSERRAT, E., ROZMAN, C. 1983. Bone marrow biopsy in chronic lymphocytic leukaemia: a study of 208 cases. *Haematologia (Budap)*, 16, 73-79.
- MOREL, P., DUHAMEL, A., GOBBI, P., DIMOPOULOS, M. A., DHODAPKAR, M. V., MCCOY, J., CROWLEY, J., OCIO, E. M., GARCIA-SANZ, R., TREON, S. P., LEBLOND, V., KYLE, R. A., BARLOGIE, B., MERLINI, G. 2009. International prognostic scoring system for Waldenstrom macroglobulinemia. *Blood*, 113, 4163-70.
- MORRA, E., CESANA, C., KLERSY, C., BARBARANO, L., VARETTONI, M., CAVANNA, L., CANESI, B., TRESOLDI, E., MIQUELEIZ, S., BERNUZZI, P., NOSARI, A. M. & LAZZARINO, M. 2004. Clinical characteristics and factors predicting evolution of asymptomatic IgM monoclonal gammopathies and IgM-related disorders. *Leukemia*, 18, 1512-7.
- MORRA, E., CESANA, C., KLERSY, C., VARETTONI, M., CAVANNA, L., CANESI, B., TRESOLDI, E., BARBARANO, L., LAZZARINO, M., HEMATOLOGY/ONCOLOGY, S. & TRIALS GROUP, I. 2003. Predictive variables for malignant transformation in 452 patients with asymptomatic IgM monoclonal gammopathy. *Semin Oncol*, 30, 172-7.
- MUZIO, M., NI, J., FENG, P., DIXIT, V. M. 1997. IRAK (Pelle) family member IRAK-2 and MyD88 as proximal mediators of IL-1 signaling. *Science*, 278, 1612-5.
- NAUMANN, M. & SCHEIDEREIT, C. 1994. Activation of NF-kappa B in vivo is regulated by multiple phosphorylations. *EMBO J*, 13, 4597-607.
- NGO, V. N., YOUNG, R. M., SCHMITZ, R., JHAVAR, S., XIAO, W., LIM, K. H., KOHLHAMMER, H., XU, W., YANG, Y., ZHAO, H., SHAFFER, A. L., ROMESSER, P., WRIGHT, G., POWELL, J., ROSENWALD, A., MULLER-HERMELINK, H. K., OTT, G., GASCOYNE, R. D., CONNORS, J. M., RIMSZA, L. M., CAMPO, E., JAFFE, E. S., DELABIE, J., SMELAND, E. B., FISHER, R. I., BRAZIEL, R. M., TUBBS, R. R., COOK, J. R., WEISENBURGER, D. D., CHAN, W. C. & STAUDT, L. M. 2011. Oncogenically active MYD88 mutations in human lymphoma. *Nature*, 470, 115-9.
- NGUYEN-KHAC, F., LAMBERT, J., CHAPIRO, E., GRELIER, A., MOULD, S., BARIN, C., DAUDIGNON, A., GACHARD, N., STRUSKI, S., HENRY, C., PENTHER, D., MOSSAFA, H., ANDRIEUX, J., ECLACHE, V., BILHOU-NABERA, C., LUQUET, I., TERRE, C., BARANGER, L., MUGNERET, F., CHIESA, J., MOZZICONACCI, M. J., CALLET-BAUCHU, E.,

Quellenverzeichnis

- VERONESE, L., BLONS, H., OWEN, R., LEJEUNE, J., CHEVRET, S., MERLE-BERAL, H., LEBLONDON, V. 2013. Chromosomal aberrations and their prognostic value in a series of 174 untreated patients with Waldenstrom's macroglobulinemia. *Haematologica*, 98, 649-54.
- NOBILE-ORAZIO, E., MEUCCI, N., BALDINI, L., DI TROIA, A., SCARLATO, G. 2000. Long-term prognosis of neuropathy associated with anti-MAG IgM M-proteins and its relationship to immune therapies. *Brain*, 123, 710-17.
- OCIO, E. M., SCHOP, R. F., GONZALEZ, B., VAN WIER, S. A., HERNANDEZ-RIVAS, J. M., GUTIERREZ, N. C., GARCIA-SANZ, R., MORO, M. J., AGUILERA, C., HERNANDEZ, J., XU, R., GREIPP, P. R., DISPENZIERI, A., JALAL, S. M., LACY, M. Q., GONZALEZ-PAZ, N., GERTZ, M. A., SAN MIGUEL, J. F., FONSECA, R. 2007. 6q deletion in Waldenstrom macroglobulinemia is associated with features of adverse prognosis. *Br J Haematol*, 136, 80-6.
- OGURA, G., KIKUTI, Y. Y., KIKUCHI, T., CARRERAS, J., SATO, T. & NAKAMURA, N. 2013. MYD88 (L265P) Mutation in Malignant Lymphoma Using Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Section. *J Clin Exp Hematop*, 53, 175-7.
- ONDREJKA, S. L., LIN, J. J., WARDEN, D. W., DURKIN, L., COOK, J. R., HSI, E. D. 2013. MYD88 L265P somatic mutation: its usefulness in the differential diagnosis of bone marrow involvement by B-cell lymphoproliferative disorders. *Am J Clin Pathol*, 140, 387-94.
- ORELLANA, J. & FRIEDMAN, A. H. 1981. Ocular manifestations of multiple myeloma, Waldenstrom's macroglobulinemia and benign monoclonal gammopathy. *Surv Ophthalmol*, 26, 157-69.
- OWEN, R. G., BYNOE, A. G., VARGHESE, A., DE TUTE, R. M., RAWSTRON, A. C. 2011. Heterogeneity of histological transformation events in Waldenstrom's macroglobulinemia (WM) and related disorders. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*, 11, 176-9
- OWEN, R. G., TREON, S. P., AL-KATIB, A., FONSECA, R., GREIPP, P. R., MCMASTER, M. L., MORRA, E., PANGALIS, G. A., SAN MIGUEL, J. F., BRANAGAN, A. R. & DIMOPOULOS, M. A. 2003. Clinicopathological definition of Waldenstrom's macroglobulinemia: consensus panel recommendations from the Second International Workshop on Waldenstrom's Macroglobulinemia. *Semin Oncol*, 30, 110-5.
- PAIVA, B., CORCHETE, L. A., VIDRIALES, M. B., GARCIA-SANZ, R., PEREZ, J. J., AIRES-MEJIA, I., SANCHEZ, M. L., BARCENA, P., ALIGNANI, D., JIMENEZ, C., SARASQUETE, M. E., MATEOS, M. V., OCIO, E. M., PUIG, N., ESCALANTE, F., HERNANDEZ, J., CUELLO, R., GARCIA DE COCA, A., SIERRA, M., MONTES, M. C., GONZALEZ-LOPEZ, T. J., GALENDE, J., BAREZ, A., ALONSO, J., PARDAL, E., ORFAO, A.,

Quellenverzeichnis

- GUTIERREZ, N. C., SAN MIGUEL, J. F. 2015. The cellular origin and malignant transformation of Waldenstrom macroglobulinemia, *Blood*, 125, 2370-2380.
- PALLADINI, G., RUSSO, P., BOSONI, T., SARAI, G., LAVATELLI, F., FOLI, A., BRAGOTTI, L. Z., PERFETTI, V., OBICI, L., BERGESIO, F., ALBERTINI, R., MORATTI, R., MERLINI, G. 2009. AL amyloidosis associated with IgM monoclonal protein: a distinct clinical entity. *Clin Lymphoma Myeloma*, 9, 80-3.
- PALUDO, J., ABEYKOON, J. P., SHREDERS, A., ANSELL, S. M., KUMAR, S., AILAWADHI, S., KING, R. L., KOEHLER, A. B., REEDER, C. B., BUADI, F. K., DISPENZIERI, A., LACY, M. Q., DINGLI, D., WITZIG, T. E., GO, R. S., GONSALVES, W. I., KOURELIS, T., WARSAME, R., LEUNG, N., HABERMANN, T. M., HAYMAN, S., LIN, Y., KYLE, R. A., RAJKUMAR, S. V., GERTZ, M. A., KAPOOR, P. 2018. Bendamustine and rituximab (BR) versus dexamethasone, rituximab, and cyclophosphamide (DRC) in patients with Waldenstrom macroglobulinemia. *Ann Hematol*, 97, 1417-1425.
- PEREZ-ANDRES, M., PAIVA, B., NIETO, W. G., CARAUX, A., SCHMITZ, A., ALMEIDA, J., VOGT, R. F., JR., MARTI, G. E., RAWSTRON, A. C., VAN ZELM, M. C., VAN DONGEN, J. J., JOHNSEN, H. E., KLEIN, B., ORFAO, A., PRIMARY HEALTH CARE GROUP OF SALAMANCA FOR THE STUDY OF, M. B. L. 2010. Human peripheral blood B-cell compartments: a crossroad in B-cell traffic. *Cytometry B Clin Cytom*, 78 Suppl 1, S47-60.
- PHEKOO, K. J., JACK, R. H., DAVIES, E., MOLLER, H., SCHEY, S. A. 2008. The incidence and survival of Waldenstrom's Macroglobulinaemia in South East England. *Leuk Res*, 32, 55-9.
- PONZONI, M., KANELIS, G., POULIOU, E., BALIAKAS, P., SCARFO, L., FERRERI, A. J., DOGLIONI, C., BIKOS, V., DAGKLIS, A., ANAGNOSTOPOULOS, A., GHIA, P., STAMATOPOULOS, K., PAPADAKI, T. 2012. Bone marrow histopathology in the diagnostic evaluation of splenic marginal-zone and splenic diffuse red pulp small B-cell lymphoma: a reliable substitute for spleen histopathology? *Am J Surg Pathol*, 36, 1609-18.
- POULAIN, S., ROUMIER, C., DECAMBRON, A., RENNEVILLE, A., HERBAUX, C., BERTRAND, E., TRICOT, S., DAUDIGNON, A., GALIEGUE-ZOUITINA, S., SOENEN, V., THEISEN, O., GRARDEL, N., NIBOUREL, O., ROCHE-LESTIENNE, C., QUESNEL, B., DUTHILLEUL, P., PREUDHOMME, C. & LELEU, X. 2013. MYD88 L265P mutation in Waldenstrom macroglobulinemia. *Blood*, 121, 4504-11.
- PUENTE, X. S., PINYOL, M., QUESADA, V., CONDE, L., ORDONEZ, G. R.,

Quellenverzeichnis

- VILLAMOR, N., ESCARAMIS, G., JARES, P., BEA, S., GONZALEZ-DIAZ, M., BASSAGANYAS, L., BAUMANN, T., JUAN, M., LOPEZ-GUERRA, M., COLOMER, D., TUBIO, J. M., LOPEZ, C., NAVARRO, A., TORNADOR, C., AYMERICH, M., ROZMAN, M., HERNANDEZ, J. M., PUENTE, D. A., FREIJE, J. M., VELASCO, G., GUTIERREZ-FERNANDEZ, A., COSTA, D., CARRIO, A., GUIJARRO, S., ENJUANES, A., HERNANDEZ, L., YAGUE, J., NICOLAS, P., ROMEO-CASABONA, C. M., HIMMELBAUER, H., CASTILLO, E., DOHM, J. C., DE SANJOSE, S., PIRIS, M. A., DE ALAVA, E., SAN MIGUEL, J., ROYO, R., GELPI, J. L., TORRENTS, D., OROZCO, M., PISANO, D. G., VALENCIA, A., GUIGO, R., BAYES, M., HEATH, S., GUT, M., KLATT, P., MARSHALL, J., RAINE, K., STEBBINGS, L. A., FUTREAL, P. A., STRATTON, M. R., CAMPBELL, P. J., GUT, I., LOPEZ-GUILLERMO, A., ESTIVILL, X., MONTSERRAT, E., LOPEZ-OTIN, C. & CAMPO, E. 2011. Whole-genome sequencing identifies recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia. *Nature*, 475, 101-5.
- QUESADA, V., CONDE, L., VILLAMOR, N., ORDONEZ, G. R., JARES, P., BASSAGANYAS, L., RAMSAY, A. J., BEA, S., PINYOL, M., MARTINEZ-TRILLOS, A., LOPEZ-GUERRA, M., COLOMER, D., NAVARRO, A., BAUMANN, T., AYMERICH, M., ROZMAN, M., DELGADO, J., GINE, E., HERNANDEZ, J. M., GONZALEZ-DIAZ, M., PUENTE, D. A., VELASCO, G., FREIJE, J. M., TUBIO, J. M., ROYO, R., GELPI, J. L., OROZCO, M., PISANO, D. G., ZAMORA, J., VAZQUEZ, M., VALENCIA, A., HIMMELBAUER, H., BAYES, M., HEATH, S., GUT, M., GUT, I., ESTIVILL, X., LOPEZ-GUILLERMO, A., PUENTE, X. S., CAMPO, E., LOPEZ-OTIN, C. 2011. Exome sequencing identifies recurrent mutations of the splicing factor SF3B1 gene in chronic lymphocytic leukemia. *Nat Genet*, 44, 47-52.
- RAJKUMAR, S. V., DIMOPOULOS, M. A., PALUMBO, A., BLADE, J., MERLINI, G., MATEOS, M. V., KUMAR, S., HILLEGASS, J., KASTRITIS, E., RICHARDSON, P., LANDGREN, O., PAIVA, B., DISPENZIERI, A., WEISS, B., LELEU, X., ZWEEGMAN, S., LONIAL, S., ROSINOL, L., ZAMAGNI, E., JAGANNATH, S., SEZER, O., KRISTINSSON, S. Y., CAERS, J., USMANI, S. Z., LAHUERTA, J. J., JOHNSEN, H. E., BEKSAC, M., CAVO, M., GOLDSCHMIDT, H., TERPOS, E., KYLE, R. A., ANDERSON, K. C., DURIE, B. G., MIGUEL, J. F. 2014. International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma. *Lancet Oncol*, 15, e538-48.
- RAWSTRON, A. C., ORFAO, A., BEKSAC, M., BEZDICKOVA, L., BROOIMANS, R. A., BUMBEA, H., DALVA, K., FUHLER, G., GRATAMA, J., HOSE, D., KOVAROVA, L., LIOZNOV, M., MATEO, G., MORILLA, R., MYLIN, A. K., OMEDE, P., PELLAT-DECEUNYNCK, C., PEREZ ANDRES, M., PETRUCCI, M., RUGGERI, M., RYMKIEWICZ, G.,

Quellenverzeichnis

- SCHMITZ, A., SCHREDER, M., SEYNAEVE, C., SPACEK, M., DE TUTE, R. M., VAN VALCKENBORGH, E., WESTON-BELL, N., OWEN, R. G., SAN MIGUEL, J. F., SONNEVELD, P., JOHNSEN, H. E. 2008. Report of the European Myeloma Network on multiparametric flow cytometry in multiple myeloma and related disorders. *Haematologica*, 93, 431-8.
- RINALDI, A., MIAN, M., KWEE, I., ROSSI, D., DEAMBROGI, C., MENSAH, A. A., FORCONI, F., SPINA, V., CENCINI, E., DRANDI, D., LADETTO, M., SANTACHIARA, R., MARASCA, R., GATTEI, V., CAVALLI, F., ZUCCA, E., GAIDANO, G., BERTONI, F. 2011. Genome-wide DNA profiling better defines the prognosis of chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol*, 154, 590-9.
- RIVERA, A. I., LI, M. M., BELTRAN, G., KRAUSE, J. R. 2002. Trisomy 4 as the sole cytogenetic abnormality in a Waldenstrom macroglobulinemia. *Cancer Genet Cytogenet*, 133, 172-3.
- ROCCARO A., SACCO A., JIMENEZ C., MAISO P., MOSCHETTA M., MISHIMA Y., KUHNE M. R., CARDARELLI P. M., JESUS F S.M. GARCIA-SANZ R., GHOBRIAL I.M. 2013. A Novel Activating Mutation Of CXCR4 Plays a Crucial Role In Waldenstrom Macroglobulinemia Biology, *Blood*, 122, 272.
- ROSENTHAL, J. A., CURRAN, W. J., JR. & SCHUSTER, S. J. 1998. Waldenstrom's macroglobulinemia resulting from localized gastric lymphoplasmacytoid lymphoma. *Am J Hematol*, 58, 244-5.
- ROSSI, D. Role of MYD88 in lymphoplasmacytic lymphoma diagnosis and pathogenesis. 2014. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.*, 2014, 113-8.
- ROSSI, D., GAIDANO, G. 2016. Richter syndrome: pathogenesis and management. *Semin Oncol*, 43, 311-9.
- ROSSI, D., RASI, S., SPINA, V., BRUSCAGGIN, A., MONTI, S., CIARDULLO, C., DEAMBROGI, C., KHIABANIAN, H., SERRA, R., BERTONI, F., FORCONI, F., LAURENTI, L., MARASCA, R., DAL-BO, M., ROSSI, F. M., BULIAN, P., NOMDEDEU, J., DEL POETA, G., GATTEI, V., PASQUALUCCI, L., RABADAN, R., FOA, R., DALLA-FAVERA, R., GAIDANO, G. 2013. Integrated mutational and cytogenetic analysis identifies new prognostic subgroups in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 121, 1403-12.
- ROZMAN, C. & MONTSERRAT, E. 1995. Chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*, 333, 1052-7.
- SACCO, A., FENOTTI, A., AFFO, L., BAZZANA, S., RUSSO, D., PRESTA, M.,

Quellenverzeichnis

- MALAGOLA, M., ANASTASIA, A., MOTTA, M., PATTERSON, C. J., ROSSI, G., IMBERTI, L., TREON, S. P., GHOBRIAL, I. M., ROCCARO, A. M. 2017. The importance of the genomic landscape in Waldenstrom's Macroglobulinemia for targeted therapeutical interventions. *Oncotarget*, 8, 35435-35444.
- SALIDO, M., BARO, C., OSCIER, D., STAMATOPOULOS, K., DIERLAMM, J., MATUTES, E., TRAVERSE-GLEHEN, A., BERGER, F., FELMAN, P., THIEBLEMONT, C., GESK, S., ATHANASIADOU, A., DAVIS, Z., GARDINER, A., MILLA, F., FERRER, A., MOLLEJO, M., CALASANZ, M. J., FLORENSA, L., ESPINET, B., LUNO, E., WLODARSKA, I., VERHOEF, G., GARCIA-GRANERO, M., SALAR, A., PAPADAKI, T., SERRANO, S., PIRIS, M. A., SOLE, F. 2010. Cytogenetic aberrations and their prognostic value in a series of 330 splenic marginal zone B-cell lymphomas: a multicenter study of the Splenic B-Cell Lymphoma Group. *Blood*, 116, 1479-88.
- SANGER, F., NICKLEN, S. & COULSON, A. R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 74, 5463-7.
- SCHMID, C., KIRKHAM, N., DISS, T., ISAACSON, P. G. 1992. Splenic marginal zone cell lymphoma. *Am J Surg Pathol*, 16, 455-66.
- SCHMIDT, J., FEDERMANN, B., SCHINDLER, N., STEINHILBER, J., BONZHEIM, I., FEND, F. & QUINTANILLA-MARTINEZ, L. 2015. MYD88 L265P and CXCR4 mutations in lymphoplasmacytic lymphoma identify cases with high disease activity. *Br J Haematol*, 169, 795-803.
- SCHOP, R. F., VAN WIER, S. A., XU, R., GHOBRIAL, I., AHMANN, G. J., GREIPP, P. R., KYLE, R. A., DISPENZIERI, A., LACY, M. Q., RAJKUMAR, S. V., GERTZ, M. A. & FONSECA, R. 2006. 6q deletion discriminates Waldenstrom macroglobulinemia from IgM monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Cancer Genet Cytogenet*, 169, 150-3.
- SEIFFERT, M., DIETRICH, S., JETHWA, A., GLIMM, H., LICHTER, P., ZENZ, T. 2012. Exploiting biological diversity and genomic aberrations in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma*, 53, 1023-31.
- STAIGER, A. M., OTT, M. M., PARMENTIER, S., ROSENWALD, A., OTT, G., HORN, H., GRIESE, E. U. 2015. Allele-specific PCR is a powerful tool for the detection of the MYD88 L265P mutation in diffuse large B cell lymphoma and decalcified bone marrow samples. *Br J Haematol*, 171, 145-8.
- STEINGRIMSSON, V., LUND, S. H., TURESSON, I., GOLDIN, L. R., BJORKHOLM, M., LANDGREN, O., KRISTINSSON, S. Y. 2015. Population-based study on the impact of the familial form of Waldenstrom macroglobulinemia on overall survival. *Blood*, 125, 2174-5.

Quellenverzeichnis

- STONE, M. J., BOGEN, S.A. 2012. Evidence-based focused review of management of hyperviscosity syndrome. *Blood*, 119, 2205-8
- STONE, M. J., BOGEN, S.A. 2013. Role of plasmapheresis in Waldenstrom's macroglobulinemia. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*, 13, 238-240.
- SWERDLOW, S.H., CAMPO, E., HARRIS, N.L., JAFFE, E. S., PILERI, S. A., STEIN, H., 2017. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. World Health Organization. 4th revised Ed. ISBN: 978-92-8324494-3.
- SWERDLOW, S. H., CAMPO, E., PILERI, S. A., HARRIS, N. L., STEIN, H., SIEBERT, R., ADVANI, R., GHIELMINI, M., SALLES, G. A., ZELENETZ, A. D., JAFFE, E. S. 2016a. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood*, 127, 2375-90.
- SWERDLOW, S. H., KUZU, I., DOGAN, A., DIRNHOFER, S., CHAN, J. K., SANDER, B., OTT, G., XERRI, L., QUINTANILLA-MARTINEZ, L., CAMPO, E. 2016b. The many faces of small B cell lymphomas with plasmacytic differentiation and the contribution of MYD88 testing. *Virchows Arch*, 468, 259-75.
- TAKEDA, K. & AKIRA, S. 2004. TLR signaling pathways. *Semin Immunol*, 16, 3-9.
- TANDON, B., SWERDLOW, S. H., HASSERJIAN, R. P., SURTI, U., GIBSON, S. E. 2015. Chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma: another neoplasm related to the B-cell follicle? *Leuk Lymphoma*, 56, 3378-86.
- THIEBLEMONT, C., FELMAN, P., CALLET-BAUCHU, E., TRAVERSE-GLEHEN, A., SALLES, G., BERGER, F. & COIFFIER, B. 2003. Splenic marginal-zone lymphoma: a distinct clinical and pathological entity. *Lancet Oncol*, 4, 95-103.
- TOURNILHAC, O., SANTOS, D. D., XU, L., KUTOK, J., TAI, Y. T., LE GOUILL, S., CATLEY, L., HUNTER, Z., BRANAGAN, A. R., BOYCE, J. A., MUNSHI, N., ANDERSON, K. C. & TREON, S. P. 2006. Mast cells in Waldenstrom's macroglobulinemia support lymphoplasmacytic cell growth through CD154/CD40 signaling. *Ann Oncol*, 17, 1275-82.
- TREON, S. P., CAO, Y., XU, L., YANG, G., LIU, X., HUNTER, Z. R. 2014. Somatic mutations in MYD88 and CXCR4 are determinants of clinical presentation and overall survival in Waldenstrom macroglobulinemia, *Blood*, 123, 2791-6.
- TREON, S. P., GERTZ, M. A., DIMOPOULOS, M., ANAGNOSTOPOULOS, A., BLADE, J., BRANAGAN, A. R., GARCIA-SANZ, R., JOHNSON, S., KIMBY, E., LEBLOND, V., FERMAND, J. P., MALONEY, D. G., MERLINI, G., MOREL, P., MORRA, E., NICHOLS, G., OCIO, E. M., OWEN, R. &

Quellenverzeichnis

- STONE, M. J. 2006a. Update on treatment recommendations from the Third International Workshop on Waldenstrom's macroglobulinemia. *Blood*, 107, 3442-6.
- TREON, S. P., GUSTINE, J., XU, L., MANNING, R. J., TSAKMAKLIS, N., DEMOS, M., MEID, K., GUERRERA, M. L., MUNSHI, M., CHAN, G., CHEN, J., KOFIDES, A., PATTERSON, C. J., YANG, G., LIU, X., SEVERNS, P., DUBEAU, T., HUNTER, Z. R., CASTILLO, J. J. 2018. MYD88 wild-type Waldenstrom Macroglobulinaemia: differential diagnosis, risk of histological transformation, and overall survival. *Br J Haematol*, 180, 374-380.
- TREON, S. P. & HUNTER, Z. R. 2013. A new era for Waldenstrom macroglobulinemia: MYD88 L265P. *Blood*, 121, 4434-6.
- TREON, S. P., HUNTER, Z. R., AGGARWAL, A., EWEN, E. P., MASOTA, S., LEE, C., SANTOS, D. D., HATJIHARISSI, E., XU, L., LELEU, X., TOURNILHAC, O., PATTERSON, C. J., MANNING, R., BRANAGAN, A. R. & MORTON, C. C. 2006b. Characterization of familial Waldenstrom's macroglobulinemia. *Ann Oncol*, 17, 488-94.
- TREON, S. P., MOREL, P., LEBLOND, V. & FERMAND, J. P. 2005. Report of the Third International Workshop on Waldenstrom's macroglobulinemia. *Clin Lymphoma*, 5, 215-6.
- TREON, S. P., TRIPSAS, C., HANZIS, C., IOAKIMIDIS, L., PATTERSON, C. J., MANNING, R. J., SHEEHY, P., TURNBULL, B., HUNTER, Z. R. 2012a. Familial disease predisposition impacts treatment outcome in patients with Waldenstrom macroglobulinemia. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*, 12, 433-7.
- TREON, S. P., TRIPSAS, C. K., MEID, K., WARREN, D., VARMA, G., GREEN, R., ARGYROPOULOS, K. V., YANG, G., CAO, Y., XU, L., PATTERSON, C. J., RODIG, S., ZEHNDER, J. L., ASTER, J. C., HARRIS, N. L., KANAN, S., GHOBRIAL, I., CASTILLO, J. J., LAUBACH, J. P., HUNTER, Z. R., SALMAN, Z., LI, J., CHENG, M., CLOW, F., GRAEF, T., PALOMBA, M. L. & ADVANI, R. H. 2015. Ibrutinib in previously treated Waldenstrom's macroglobulinemia. *N Engl J Med*, 372, 1430-40.
- TREON, S.P., TRIPSAS C. K., YANG G., CAO Y., XU L., HUNTER Z., CROPPER S. J., MOSTYN P., MEID K., WARREN D., PATTERSON C., VARMA G., LAUBACH J.P., PABA-PRADA C.E., KUNSMAN J., GHOBRIAL I.M., KANAN S., ADVANI R.H., PALOMBA M.L. 2013. A Prospective Multicenter Study Of The Bruton's Tyrosine Kinase Inhibitor Ibrutinib In Patients With Relapsed Or Refractory Waldenstrom's Macroglobulinemia. *Blood*, 122, 251.
- TREON, S. P., XU, L., YANG, G., ZHOU, Y., LIU, X., CAO, Y., SHEEHY, P., MANNING, R. J., PATTERSON, C. J., TRIPSAS, C., ARCAINI, L.,

Quellenverzeichnis

- PINKUS, G. S., RODIG, S. J., SOHANI, A. R., HARRIS, N. L., LARAMIE, J. M., SKIFTER, D. A., LINCOLN, S. E. & HUNTER, Z. R. 2012b. MYD88 L265P somatic mutation in Waldenstrom's macroglobulinemia. *N Engl J Med*, 367, 826-33.
- USMANI, S., SEXTON, R., CROWLEY, J. & BARLOGIE, B. 2011. Autologous stem cell transplantation as a care option in Waldenstrom's macroglobulinemia. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*, 11, 139-42.
- VAN DONGEN JJ, LANGERAK AW, BRÜGGEMANN M, EVANS PA, HUMMEL M, LAVENDER FL, DELABESSE E, DAVI F, SCHUURING E, GARCÍA-SANZ R, VAN KRIEKEN JH, DROESE J, GONZÁLEZ D, BASTARD C, WHITE HE, SPAARGAREN M, GONZÁLEZ M, PARREIRA A, SMITH JL, MORGAN GJ, KNEBA M, MACINTYRE EA. Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. *Leukemia* 2003; 17: 2257-2317.
- VARETTONI, M., ARCAINI, L., ZIBELLINI, S., BOVERI, E., RATTOTTI, S., RIBONI, R., CORSO, A., ORLANDI, E., BONFICHI, M., GOTTI, M., PASCUTTO, C., MANGIACAVALLI, S., CROCI, G., FIACCADORI, V., MORELLO, L., GUERRERA, M. L., PAULLI, M. & CAZZOLA, M. 2013. Prevalence and clinical significance of the MYD88 (L265P) somatic mutation in Waldenstrom's macroglobulinemia and related lymphoid neoplasms. *Blood*, 121, 2522-8.
- VARETTONI, M., ZIBELLINI, S., DEFRANCESCO, I., FERRETTI, V. V., RIZZO, E., MALCOVATI, L., GALLI, A., PORTA, M. G. D., BOVERI, E., ARCAINI, L., CANDIDO, C., PAULLI, M., CAZZOLA, M. 2017. Pattern of somatic mutations in patients with Waldenstrom macroglobulinemia or IgM monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Haematologica*, 102, 2077-2085.
- VIJAY, A. & GERTZ, M. A. 2007. Waldenstrom macroglobulinemia. *Blood*, 109, 5096-103.
- VITOLO, U., FERRERI, A. J. & MONTOTO, S. 2008. Lymphoplasmacytic lymphoma-Waldenstrom's macroglobulinemia. *Crit Rev Oncol Hematol*, 67, 172-85.
- WANG, H., CHEN, Y., LI, F., DELASALLE, K., WANG, J., ALEXANIAN, R., KWAK, L., RUSTVELD, L., DU, X. L., WANG, M. 2012. Temporal and geographic variations of Waldenstrom macroglobulinemia incidence: a large population-based study. *Cancer*, 118, 3793-800
- WESCHE, H., HENZEL, W. J., SHILLINGLAW, W., LI, S. & CAO, Z. 1997. MyD88: an adapter that recruits IRAK to the IL-1 receptor complex. *Immunity*, 7, 837-47.

Quellenverzeichnis

- WIEGAND, K. C., SHAH, S. P., AL-AGHA, O. M., ZHAO, Y., TSE, K., ZENG, T., SENZ, J., MCCONECHY, M. K., ANGLÉSIO, M. S., KALLOGER, S. E., YANG, W., HERAVI-MOUSSAVI, A., GIULIANY, R., CHOW, C., FEE, J., ZAYED, A., PRENTICE, L., MELNYK, N., TURASHVILI, G., DELANEY, A. D., MADORE, J., YIP, S., MCPHERSON, A. W., HA, G., BELL, L., FEREDAY, S., TAM, A., GALLETTA, L., TONIN, P. N., PROVENCHER, D., MILLER, D., JONES, S. J., MOORE, R. A., MORIN, G. B., OLOUMI, A., BOYD, N., APARICIO, S. A., SHIH IE, M., MES-MASSON, A. M., BOWTELL, D. D., HIRST, M., GILKS, B., MARRA, M. A., HUNTSMAN, D. G. 2010. ARID1A mutations in endometriosis-associated ovarian carcinomas. *N Engl J Med*, 136, 1532-43.
- XU, L., HUNTER, Z. R., YANG, G., ZHOU, Y., CAO, Y., LIU, X., MORRA, E., TROJANI, A., GRECO, A., ARCAINI, L., VARETTONI, M., BROWN, J. R., TAI, Y. T., ANDERSON, K. C., MUNSHI, N. C., PATTERSON, C. J., MANNING, R. J., TRIPSAS, C. K., LINDEMAN, N. I. & TREON, S. P. 2013. MYD88 L265P in Waldenstrom macroglobulinemia, immunoglobulin M monoclonal gammopathy, and other B-cell lymphoproliferative disorders using conventional and quantitative allele-specific polymerase chain reaction. *Blood*, 121, 2051-8.
- YANG, G., BUHRLAGE, S. J., TAN, L., LIU, X., CHEN, J., XU, L., TSAKMAKLIS, N., CHEN, J. G., PATTERSON, C. J., BROWN, J. R., CASTILLO, J. J., ZHANG, W., ZHANG, X., LIU, S., COHEN, P., HUNTER, Z. R., GRAY, N., TREON, S. P. 2016. HCK is a survival determinant transactivated by mutated MYD88, and a direct target of ibrutinib. *Blood*, 127, 3237-52.
- YANG, G., ZHOU, Y., LIU, X., XU, L., CAO, Y., MANNING, R. J., PATTERSON, C. J., BUHRLAGE, S. J., GRAY, N., TAI, Y. T., ANDERSON, K. C., HUNTER, Z. R. & TREON, S. P. 2013. A mutation in MYD88 (L265P) supports the survival of lymphoplasmacytic cells by activation of Bruton tyrosine kinase in Waldenstrom macroglobulinemia. *Blood*, 122, 1222-32.
- ZENZ, T., MERTENS, D., KUPPERS, R., DOHNER, H., STILGENBAUER, S. 2010. From pathogenesis to treatment of chronic lymphocytic leukaemia. *Nat Rev Cancer*, 10, 37-50.

11 Ehrenwörtliche Erklärung

Ehrenwörtliche Erklärung zu meiner Dissertation „Etablierung der *MYD88-L265P* Mutationsanalyse mittels Schmelzpunktanalyse am FFPE-Material lymphoplasmozytischer Lymphome“

Sehr geehrte Damen und Herren,

Hiermit erkläre ich, dass ich die Dissertation selbstständig verfasst habe und keine weiteren, als die angegebenen Hilfsmittel verwendet wurden. Wörtliche oder inhaltliche Stellen, die anderen Quellen entstammen, wurden als solche gekennzeichnet.

Die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis wurden gemäß der Promotionsordnung der Eberhard-Karls-Universität Tübingen uneingeschränkt eingehalten.

Die Arbeit wurde im Institut für Pathologie und Neuropathologie der Universität Tübingen in der Abteilung Allgemeine Pathologie, Molekulare Pathologie und Pathologische Anatomie unter Betreuung von Prof. Dr. Leticia Quintanilla-Fend durchgeführt. Die Konzeption der Studie erfolgte durch Prof. Dr. Leticia Quintanilla-Fend, Oberärztin im Pathologischen Institut in Tübingen. Die Fallauswahl und die erneute pathologische Begutachtung erfolgten gemeinsam mit Frau Prof. Dr. Leticia Quintanilla-Fend. Sämtliche Versuche wurden nach Einarbeitung und Supervidierung durch Janine Schmidt und Dr. Irina Bonzheim von mir durchgeführt. Die statistische Auswertung erfolgte eigenständig. Ich versichere, das Manuskript selbstständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Ich versichere, dass Dritte keinerlei Geldwerte von mir bekommen haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der Dissertation stehen.

Die Dissertation wurde in keinem anderen, weder im Inland noch im Ausland, als diesem Promotionsverfahren eingereicht.

Ort, Datum

Unterschrift

12 Veröffentlichungen

Teile der Vorliegenden Dissertation wurden bereits in folgender Publikation veröffentlicht:

MYD88 L265P and CXCR4 mutations in lymphoplasmocytic lymphoma identify cases with high disease activity

Autoren:

Schmidt J, Federmann B, Schindler N, Steinhilber J, Bonzheim I, Fend F, Quintanilla-Martinez L

Publikation:

2015 John Wiley & Sons Ltd, British Journal of Haematology, 2015, 169, 795–803. First published online 29 March 2015. doi: 10.1111/bjh.13361

13 Danksagung

Ich bedanke mich ganz herzlich bei allen, die mich bei der Erstellung meiner Dissertation unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Leticia Quintanilla-Fend und Herr Prof. Dr. Falko Fend für die Möglichkeit der Promotion am Pathologischen Institut in Tübingen und der Vergabe des interessanten Themas.

Zudem möchte ich mich bei Dr. Irina Bonzheim und Janine Schmidt für die kompetente und zuverlässige Unterstützung bedanken, welche zum Gelingen der Arbeit maßgeblich beigetragen hat.