

Zentrum für Innere Medizin der Universität Ulm

Klinik für Innere Medizin III

Hämatologie, Onkologie, Rheumatologie, Infektionskrankheiten und Palliativmedizin

Ärztlicher Direktor: Herr Prof. Dr. med. Hartmut Döhner

Inzidenz und prognostische Bedeutung der Mutation p.L265P im *MYD88*-Gen bei Patienten mit Multiplem Myelom

Dissertation zu Erlangung des Doktorgrades der Medizin der
Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

von Franziska Christina Waldmann

geboren in Tettwang

2016

Amtierender Dekan: Prof. Dr. rer. nat. Thomas Wirth

1. Berichterstatter: PD Dr. med. Christian Langer

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Jens Huober

Tag der Promotion: 19. Mai 2017

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	III
1. Einleitung.....	1
1.1. Definition	1
1.2. Epidemiologie des Multiplen Myeloms	1
1.3. Diagnosestellung und Diagnosekriterien des Multiplen Myeloms.....	2
1.4. Klinik des Multiplen Myeloms	4
1.5. Stadieneinteilung des Multiplen Myeloms	5
1.6. Pathogenese des Multiplen Myeloms.....	6
1.7. Das <i>MYD88</i> -Gen und die die Rolle des NF- κ B-Signalweges in der Pathogenese des Multiplen Myeloms	9
1.8. Zielsetzung der Arbeit	12
2. Patienten, Material und Methoden	13
2.1. Auswahl der Patienten	13
2.2. Angewendete Methoden	13
2.3. Verwendete Materialien	14
2.4. Materialgewinnung und –aufbereitung	16
2.5. Desoxyribonukleinsäure Extraktion	17
2.6. Polymerasekettenreaktion.....	18
2.7. Gelelektrophorese.....	20
2.8. Aufreinigung der Polymerasekettenreaktion Produkte	21
2.9. Cycle Sequencing Reaction	22
2.10. Auswertung der Sequenzen	24
2.11. Statistische Analyse und Datenauswertung	25
3. Ergebnisse.....	27
3.1. Klinik	27
3.2. Laborparameter.....	31

3.3. Genetik.....	32
4. Diskussion.....	44
4.1. Die Mutation p.L265P im <i>MYD88</i> -Gen beim Multiplen Myelom.....	44
4.2. Verwendete Methoden	45
4.3. Mutationen im <i>MYD88</i> -Gen in anderen hämatologischen Erkrankungen.....	46
4.4. Bedeutung der Mutation p.L265P im <i>MYD88</i> -Gen	48
5. Zusammenfassung	52
6. Literaturverzeichnis	54
7 Danksagung	66
8 Lebenslauf.....	67

Abkürzungsverzeichnis

+	Zugewinn
ABC	Activated B-cell-like
AL	Akute Leukämie
ALL	Akute lymphatische Leukämie
AML	Akute myeloische Leukämie
ARID1A	AT-rich interactive domain-containing protein 1A
AS-PCR	Allel-spezifische PCR
β_2 -MG	β_2 -Mikroglobulin
B-NHL	Non-Hodgkin Lymphom der B-Zell Reihe
BTK	Bruton tyrosine kinase
CCND	Cyclin D
CLL	Chronisch lymphatische Leukämie
CR	Komplette Remission
CSR	Cycle sequencing reaction
CT	Computertomographie
DD	Death domain
ddNTP	Didesoxynukleosidtriphosphat
del	Deletion
dl	Deziliter
DLBCL	Diffus großzelliges B-Zell-Lymphom
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxynukleosid-Triphosphate
FGFR3	Fibroblast growth factor receptor 3
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung

G	Giga
g	Gramm
Hb	Hämoglobin
HRMA	High resolution melting analysis
ID	Intermediary domain
Ig	Immunglobulin
IGHV	Immunoglobulin Heavy Chain Variable Gene
IKK	NF-κB kinase Komplex
IL	Interleukin
IMWG	International Myeloma Working Group
IRAK1	Interleukin-1 receptor associated kinase
IRAK4	Interleukin-4 receptor associated kinase
ISS	Internationales Staging System
kg/m ²	Kilogramm/Meter ²
KM	Knochenmark
K-RAS	V-KI-RAS2 kirsten rat sarcome viral oncogene homolog
l	Liter
LDH	Laktatdehydrogenase
LPL	Lymphoplasmozytisches Lymphom
LS	Längenstandard
mA	Milliampere
MAFB	V-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene family, protein B
MALT	Mukosa-assoziiertes lymphatisches Gewebe
mg	Milligramm
MGUS	Monoklonale Gammopathie unklarer Signifikanz

ml	Milliliter
MM	Multiples Myelom
mmol	Millimol
μl	Mikroliter
μmol	Mikromol
M-Protein	Monoklonales Protein
MRT	Magnetresonanztomographie
MYC	V-MYC avian myelocytomatosis viral oncogene homolog
MYD88	Myeloid differentiation primary response 88
MZL	Marginalzonen Lymphom
NF-κB	Nukleärer Faktor ‚kappa-Leichtketten-enhancer‘ aktivierter B Zellen
ng	Nanogramm
NGS	Next-generation-sequencing
N-RAS	Neuroblastoma RAS viral oncogene homolog
PB	Peripheres Blut
PCR	Polymerasekettenreaktion
pmol	Pikomol
rpm	Revolutions per minute
RNA	Ribonukleinsäure
SCT	Stammzelltransplantation
SEER	Surveillance, Epidemiology and End Results
SNP	Single nucleotid polymorphism
t	Translokation
TAK1	Transforming-growth-factor-β-activated kinase
TIR	Toll-like/Interleukin-1 Rezeptor

TLR	Toll-like Rezeptor
TRAF6	Tumor-necrosis-factor-receptor-associated factor 6
U	Unit
UBC13	Ubiquitin-conjugating enzyme 13
UEV1A	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 1
UV	Ultraviolett
WM	Morbus Waldenström

1 Einleitung

1.1 Definition

Das Multiple Myelom (MM) ist eine Plasmazellerkrankung und wird den Non-Hodgkin Lymphomen der B-Zell-Reihe zugeordnet (B-NHL) [112]. Charakteristisch für das MM sind die klonale Proliferation maligner Plasmazellen im Knochenmark (KM), monoklonale Proteine im Blut und Urin und damit assoziierte Organschäden [89]. Ein einzelner Plasmazellklon, der sich den Apoptosemechanismen entzieht, proliferiert unkontrolliert und destruktiv im KM. Die maligne entarteten Plasmazellen produzieren typischerweise ein monoklonales Immunglobulin (Ig), welches als monoklonale Gammopathie oder auch Paraproteinämie bezeichnet wird. Meistens kommt es zur Sekretion intakter Immunglobuline vom Typ IgG (60%) oder IgA (24%), selten vom Typ IgM oder IgD (3%). Die Plasmazellen können auch nur Ig-Leichtketten (Kappa oder Lambda) bilden (11%) [44]. Diese im Urin ausgeschiedenen unvollständigen Eiweißleichtketten werden Bence-Jones Proteine genannt und die Tumorformen, die diese Immunglobuline bilden, Leichtketten-Myelom. Patienten, die an einem MM leiden, zeigen ein komplexes klinisches Bild, bei dem multiple Organsysteme betroffen sein können.

1.2 Epidemiologie des Multiplen Myeloms

Das MM macht ungefähr ein Prozent aller neoplastischen Krankheiten aus, sowie zehn Prozent aller hämatologischen bösartigen Tumoren [25]. Nach der Gesundheitsberichterstattung des Bundes lag 2010 die mittlere altersstandardisierte Inzidenzrate für bösartige immunproliferative Krankheiten in Deutschland bei 6,0/100000 für Männer und bei 3,9/100000 für Frauen [40]. Das National Cancer Institute (Surveillance, Epidemiology and End Results (SEER) Programm) zeigt ähnliche Zahlen für die USA mit einer mittleren jährlichen Inzidenzrate von 7,4/100000 bei Männern und 4,7/100000 bei Frauen. Geschlechtsunabhängig beträgt die mittlere Inzidenzrate 5,8/100000. Die jährliche Inzidenzrate steigt mit dem Alter an. Am höchsten ist sie im Alter zwischen 80 und 84 mit einem Wert von 39,1/100000 [49].

Die monoklonale Gammopathie unklarer Signifikanz (MGUS) ist eine obligate Präkanzerose des MM und tritt bei den über 50 Jährigen mit einer Prävalenz von circa drei Prozent auf. Das Risiko einer Progression in ein MM liegt bei circa einem Prozent pro Jahr und das Risiko ein MM zu bekommen ist bei einer Vorerkrankung mit einer MGUS 25-fach erhöht [62, 63]. Neben den altersabhängigen und geschlechtsspezifischen Unterschieden besteht auch eine ethnische Variabilität beim

Erkrankungsrisiko. Die Inzidenzrate ist bei African Americans mit 11,7/100000 deutlich höher als bei Kaukasiern mit 5,3/100000 [49]. Epidemiologische Studien lassen vermuten, dass eine chronische Antigenstimulation des Immunsystems ein Faktor für die MM Entwicklung ist. Nach einer Studie von Brown et al. 2008 an 4061 MM Patienten mit vorbestehenden Autoimmun- und Infektionskrankheiten lag ein signifikant erhöhtes MM-Risiko vor [18]. Dieses Ergebnis wurde auch durch eine Studie von Landgren et al. an 8406 schwedischen MM Patienten bestätigt [66]. In mehreren Studien wurde ein Zusammenhang zwischen Übergewicht (> 25 Kilogramm/Meter² (kg/m²)) und einem erhöhten Risiko ein MM zu entwickeln festgestellt [14]. Des Weiteren gibt es MM Fälle bei denen eine klare familiäre Häufung beobachtet wurde [43, 46, 76]. Mehrere Studien haben genetische Prädispositionen festgestellt, bei denen es sich um sogenannte single nucleotid polymorphisms (SNPs) handelt. SNPs sind Veränderungen eines einzelnen Basenpaares in bestimmten Risikoregionen, wie z.B. 3p22.1; 17p15.3; 3q26.2; 17p11.2. Diese SNPs führen zu einem erhöhten Risiko ein MM zu entwickeln [17, 24, 122]. Von den exogenen Einflussfaktoren ist die Strahlenexposition am besten untersucht und belegt. Atombomben Überlebende von Hiroshima hatten ein 60% größeres MM-Mortalitätsrisiko als Nichtexponierte. Ein Drittel der japanischen Myelomtoten zwischen 1950 und 1985 ließ sich auf die Atomstrahlung von 1945 zurückführen [105].

1.3 Diagnosestellung und Diagnosekriterien des Multiplen Myeloms

Besteht bei einem Patienten der Verdacht auf ein MM wird eine ausführliche Anamnese erhoben und eine klinische Untersuchung durchgeführt. Zur weiteren Standard Diagnostik des MM gehören eine Routine Laboruntersuchung mit Bestimmung des Blutbildes und weiterer Parameter wie Kalzium, Serum β_2 -Mikroglobulin (β_2 -MG), Kreatinin und Laktatdehydrogenase (LDH). Zum Nachweis und der genaueren Bestimmung des monoklonales Proteins werden eine Serum- und Urin Elektrophorese und eine Immunfixation durchgeführt [60]. Zur Beurteilung einer Knochenbeteiligung wird eine Bildgebung („low dose“ Computertomographie (CT) oder eine Magnetresonanztomographie (MRT)) veranlasst. Durch eine Knochenmarkzytologie und – histologie bekommt man Informationen über die Quantität und Qualität der Hämatopoese und über das Ausmaß der Infiltration mit atypischen Myelomzellen, welches zu den Diagnosekriterien gezählt wird.

Eine molekular-zytogenetische Untersuchung mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) detektiert Chromosomenaberrationen, indem Fluoreszenz markierte Desoxyribonukleinsäure (DNA) Sonden an definierte DNA Stellen binden. Diese Chromosomenaberrationen können zur Prognoseabschätzung genutzt werden. Dabei gelten die Translokationen t(4;14), t(14;16) und die Deletion (del) der Chromosomenregion 17p13 als prognostisch ungünstig. Dagegen ist der

Nachweis einer Translokation t(11;14) oder t(6;14) mit einer günstigeren Prognose assoziiert [3, 38, 71, 82].

Um das Krankheitsbild besser definieren zu können und eine Grenze zwischen der MGUS, dem asymptomatischen MM, das auch smouldering MM bezeichnet wird, und dem manifesten MM zu ziehen, wurden von der „International Myeloma Working Group“ (IMWG) Diagnosekriterien erstellt, die im November 2014 aktualisiert wurden [51, 97], und in der Abbildung 1 dargestellt sind.

Diagnose	Symptomatisches Multiples Myelom	Smouldering Multiples Myelom	Monoklonale Gammopathie unklarer Signifikanz
Kriterien			
Klonale Plasmazellen im Knochenmark	≥ 10%	≥ 10%	< 10%
	und	und/oder	und
Monoklonales Protein im Serum	Nachweisbar	≥ 30 g/l	< 30 g/l
	und/oder		
Monoklonales Protein im Urin	Nachweisbar		
	und	und	und
Myelom definierendes Event	Nachweisbar	Nicht nachweisbar	Nicht nachweisbar

Abbildung 1: Die Diagnosekriterien der International Myeloma Working Group (IMWG) anhand deren die Unterscheidung zwischen einem symptomatischen Multiplen Myelom (MM), einem smouldering MM und einer monoklonalen Gammopathie unklarer Signifikanz möglich ist [51, 97]

Ein symptomatisches MM ist gekennzeichnet durch einen Plasmazellanteil im Knochenmark von > 10% nachweisbaren monoklonalen Proteinen (M-Proteine) im Serum und/oder im Urin und das Vorhandensein eines der sogenannten Myelom definierenden Events, die zu den „CRAB“ Kriterien (Calcium, Renal insufficiency, Anaemia, Bone lesions) zusammengefasst werden. Dazu zählen eine Hyperkalziämie (Serumkalzium ≥ 11 Milligramm/Deziliter (mg/dl) oder > 1 mg/dl über der normalen Obergrenze), eine Niereninsuffizienz (Serum Kreatinin > 1,77 Millimol/Liter (mmol/l) oder Kreatinin Clearance < 40 Milliliter (ml)), eine Anämie (Hämoglobin (Hb) < 10 Gramm/Deziliter (g/dl) oder > 2 g/dl der altersentsprechenden Untergrenze: Männer < 12 g/dl; Frauen < 10 g/dl) und

Knochenläsionen (Osteolysen, Osteoporose oder pathologische Frakturen). Seit November 2014 werden auch das Vorhandensein eines Plasmazellanteiles von $\geq 60\%$ im Knochenmark, mehr als eine diagnostizierte fokale Läsion in der MRT und die Ratio der freien Leichtketten im Serum (Lambda - Leichtketten/Kappa - Leichtketten) von ≥ 100 zu den sogenannten Myelomdefinierenden Events und den Diagnosekriterien des symptomatischen MM dazugezählt [97].

Wird bei einem Patienten kein monoklonales Protein im Serum und/oder im Urin gefunden, leidet jedoch an Endorganschäden und weist $> 10\%$ Plasmazellen im Knochenmark auf, dann spricht man von einem nicht sekretorischen MM [13]. Ein smouldering MM liegt vor, wenn der Patient keines der Myelomdefinierenden Events aufweist, aber die restlichen Diagnosekriterien eines MM erfüllt. Sind $< 10\%$ Plasmazellen im Knochenmark zu finden, das monoklonale Protein beträgt < 30 g/l im Serum und/oder Urin und es liegt kein Anhalt für einen Endorganschaden vor, so erfüllt der Patient die Diagnosekriterien einer MGUS.

1.4 Klinik des Multiplen Myeloms

Zu den typischen klinischen Auffälligkeiten eines symptomatischen MM gehören wie in 1.3. beschrieben die sogenannten Myelom assoziierten „CRAB“ Kriterien (Hyperkalziämie, renale Dysfunktion, Anämie und Knochenläsionen). Die häufigsten Symptome, über die Patienten bei der Diagnosestellung berichten, sind Knochenschmerzen (58%), Müdigkeit (32%) und Gewichtsverlust (24%). Seltener klagten Patienten über Parästhesien (5%) und Fieber (0,7%) [59]. Bei den meisten Patienten sind Knochenschmerzen, die oftmals schleichend beginnen und progredient sind, das Leitsymptom, das zur Diagnosestellung führt. Bis zu 80% der Patienten haben bei der Diagnosestellung bereits pathologische Frakturen, wobei am häufigsten die Wirbelsäule betroffen ist [75]. Die Knochenläsionen entstehen durch die Stimulierung der Osteoklasten bei gleichzeitiger Inhibierung der Osteoblasten [1, 101]. Ein weiteres Zeichen der Krankheitsaktivität sind Blutbildbeeinträchtigungen, wobei die tumorbedingte normochrome, makrozytäre Anämie (Hb < 12 g/dl) mit circa 70% am häufigsten bei der Diagnosestellung zu finden ist [59]. Im Verlauf der Erkrankung ist diese bei fast allen Patienten feststellbar. Sie kann sich durch Blässe, Müdigkeit oder Schwäche bemerkbar machen. Die Anämie korreliert zum großen Teil mit der Tumorlast und ist damit Ausdruck der Knochenmarkverdrängung durch die Myelomzellen. Eine Niereninsuffizienz kann jedoch auch ein Kofaktor für die Entstehung einer Anämie sein [11]. Eine Niereninsuffizienz, definiert als eine Erhöhung des Serumkreatinin Wertes > 2 mg/dl, wird bei 20-40% der Patienten diagnostiziert [12, 33, 41, 59]. In den meisten Fällen ist die „Myelomniere“ eine Folge der vermehrten Ausscheidung monoklonaler Leichtketten und deren Ablagerung hauptsächlich in die Tubuli. Andere

Faktoren wie Hyperkalziämie, Dehydrierung, nephrotoxische Medikamente und Kontrastmittel können weitere Ursachen der Niereninsuffizienz sein oder die toxischen Effekte der Leichtketten verstärken [29, 125].

Zu den häufigsten Todesursachen der Krankheit zählen wiederkehrende Infektionen, bei denen es sich hauptsächlich um bakterielle Infektionen handelt. Dabei führt die Produktion dysfunktionaler Immunglobuline bei gleichzeitiger Suppression der Bildung normaler Immunglobuline zur Immunschwäche und diese wird zusätzlich durch die häufig vorliegende Leukopenie und abnorme Lymphozytenfunktion verschlimmert [1, 52, 102].

1.5 Stadieneinteilung des Multiplen Myeloms

Die Stadieneinteilung kann nach zwei unterschiedlichen Stagingssystemen vorgenommen werden. Die Einteilung nach Salmon und Durie berücksichtigt Parameter wie den Hb-Wert, den Kalziumwert, die Anzahl an Knochenläsionen und die Konzentration der Immunglobuline. Man kann mit dieser Einteilung eine grobe Abschätzung der vorhandenen Tumormasse vornehmen, jedoch lassen sich damit weder sichere prognostische Aussagen noch Therapieverläufe vorhersagen. Das International Staging System (ISS) wurde 2005 von der IMWG anhand klinischer und laborchemischer Daten von 10 750 Myelompatienten entwickelt [44]. Es teilt die Patienten anhand der leicht verfügbaren Parameter Serum Albumin und Serum β_2 -MG in drei prognostische Gruppen ein. Dabei beträgt im Stadium I das mediane Überleben der Patienten 62 Monate, im Stadium II sind es noch 44 Monate und im Stadium III leben die Patienten im Durchschnitt 29 Monate. Tabelle 1 zeigt die Kriterien, die zur Zuordnung in das jeweilige Stadium notwendig sind.

Tabelle 1: Die Kriterien der zwei unterschiedlichen Stadieneinteilungen des Multiplen Myeloms [31, 44]
 dl: Deziliter; g: Gramm; l: Liter; mg: Milligramm; mmol: Millimol

Stadium	Internationales Staging System	Salmon und Durie
1	Serum β_2 -Mikroglobulin < 3,5 mg/l und Serum Albumin \geq 3,5 g/dl	Alle Kriterien müssen erfüllt sein: 1. Hämoglobin > 10 g/dl 2. Serumkalzium normal (< 2,6 mmol/l) 3. Normale Knochenstruktur oder einzelne solitäre Knochenläsion 4. Paraproteinkonzentration gering: - Immunglobulin G < 5 g/dl - Immunglobulin A < 3 g/dl - Leichtketten im Urin < 4 g/24 Stunden
2	Serum β_2 -Mikroglobulin < 3,5 mg/l und Serum Albumin < 3,5 g/dl oder Serum β_2 -Mikroglobulin 3,5 – 5,5 mg/l	Weder Stadium I noch III
3	Serum β_2 -Mikroglobulin \geq 5,5 mg/l	Mindestens eines der folgenden Kriterien muss erfüllt sein: 1. Hämoglobin < 8,5 g/dl 2. Serumkalzium erhöht (> 3 mmol/l) 3. Multiple Osteolysen 4. Paraproteinkonzentration hoch: - Immunglobulin G > 7 g/dl - Immunglobulin A > 5 g/dl - Leichtketten im Urin > 12 g/24 Stunden
		Zusatz A: Serumkreatinin < 2 mg/dl Zusatz B: Serumkreatinin > 2 mg/dl

1.6 Pathogenese des Multiplen Myeloms

1.6.1 Die normale B-Zell Differenzierung

Die Entwicklung der Plasmazelle geht von einer pluripotenten hämatopoetischen Stammzelle aus und kann in zwei Phasen unterteilt werden. Die erste Phase ist antigenunabhängig und findet im KM statt. Dabei entwickelt sich die B-Zelle über die Entwicklungsstufen der lymphoiden Stammzelle, der pro B-Zelle, der prä B-Zelle zur naiven B-Zelle [4]. Wichtig für diese Reifung ist die Entwicklung

unterschiedlicher Antigenrezeptoren, um eine möglichst große Antigendiversität zu erreichen. Dies entsteht durch die V(D)J Rekombination. Hierbei werden die Exons für den variablen Teil der leichten und schweren Immunglobulinketten durch Rekombination der verschiedenen V, D, J Varianten im Genom gebildet [57]. Durch diesen Entwicklungsschritt entstehen unreife B-Zellen, die als erste fähig sind vollständige IgM an der Oberfläche zu exprimieren. Diese unreifen B-Zellen verlassen das Knochenmark und werden zu reifen naiven B-Zellen, sobald sie im Blut angelangt sind. Voraussetzung hierfür ist, dass die B-Zellen Selbsttoleranz besitzen. Das heißt, dass sie nicht gegen Autoantigene reagieren. Sie können nun IgM und IgD auf ihrer Oberfläche exprimieren [4]. Die reifen B-Zellen wandern in die sekundären Lymphorgane ein, in denen die zweite Phase beginnt. Diese ist antigenabhängig und entspricht der Differenzierung der B-Zellen zu unterschiedlichen Plasmazellen. Durch Antigenstimulation entstehen viele kurzlebige Plasmazellen, auch Prä-Keimzentrums-Zellen genannt, die circa drei Tage leben und vor allem niedrig affine Antikörper vom Typ IgM produzieren. Die restlichen Zellen durchlaufen in den Keimzentren spezifische B-Zell Modifikationen, wie zum Beispiel die somatische Hypermutation. Einige dieser somatisch hypermutierten IgM positiven Zellen werden zu Gedächtniszellen. Der Rest differenziert sich zu Post-Keimzentrums-Plasmablasten, die zusätzlich einen IgH Isotypenswitch durchlaufen, ins Knochenmark migrieren und sich dort zu langlebigen Plasmazellen entwickeln [25, 48, 56, 96, 103]. Bei der somatischen Hypermutation wird eine Duplikation, eine Deletion oder eine Punktmutation in die DNA der variablen IgH Region eingefügt, um Antikörper zu produzieren, die sehr spezifisch gegenüber dem Antigen sind und dieses optimal binden können [42, 57]. Bei einem IgH Isotypenswitch kommt es zu einem Wechsel der exprimierten Immunglobuline von IgM oder IgD hin zu IgG, IgA oder auch IgE. Dabei bleibt die V(D)J Region und damit die Spezifität des Antikörpers gleich, jedoch verändert sich die Funktion des Antikörpers [58]. Somatische Hypermutationen und der IgH Isotypenswitch sind Schlüsselstellen im Rahmen der Entwicklung und der Onkogenese langlebiger Plasmazellen.

1.6.2 Genetische Veränderungen beim Multiplen Myelom

Bei der Pathogenese des MM geht man von einem mehrstufigen Prozess verschiedener Mutationen und Translokationen in mehreren Signalwegen aus, die die intrinsische Biologie der Plasmazellen derart verändern, dass dadurch das typische Krankheitsbild des MM hervorgerufen wird [80]. Dabei entwickeln sich die malignen Plasmazellen aus den langlebigen post-Keimzentrums B-Zellen [1, 6, 25, 89, 103]. Die frühen initialen Ereignisse in der Entstehung eines MM kann man in strukturelle und numerische Chromosomenveränderungen unterteilen. Diese chromosomalen Veränderungen findet man in nahezu allen MM Patienten [30, 37]. Bei den strukturellen

Chromosomenaberrationen handelt es sich vor allem um Translokationen im Bereich der Ig-Switch-Region auf Chromosom 14q32.33 [5]. Diese IgH Translokationen entstehen durch Doppelstrangbrüche im Laufe der spezifischen B-Zell Modifikationen, vor allem während dem IgH Isotypenswitch und seltener während der somatischen Hypermutation [7]. In frühen Stadien des MM findet man IgH Translokationen in 20-60% der Zellen, während im fortgeschrittenen Stadium bis zu 90% der Tumorzellen derartige Translokationen haben [7, 25]. Diese Translokationen können zur Immortalisierung der Plasmazellen führen und dysregulieren die Aktivierung verschiedener Onkogene. Zu den häufigsten gehören *Cyclin D1 (CCND1)*, *Cyclin D3 (CCND3)*, *Fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR3)* und *V-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene family, protein B (MAFB)* [8, 21-23, 50, 103, 104]. Die numerischen Aberrationen werden unter dem Begriff Aneuploidie zusammengefasst. Dabei unterscheidet man hyperdiploide Karyotypen (48-74 Chromosomen) und nicht-hyperdiploide (< 48 oder > 75 Chromosomen). Die nicht-hyperdiploiden können weiter unterteilt werden in hypodiploid, pseudodiploid und subtetraploid [109]. Bei ungefähr der Hälfte der MM Patienten findet man einen nicht-hyperdiploiden Karyotyp zusammen mit einer hohen Prävalenz (80%) an IgH Translokationen und Veränderungen des Chromosoms 13. Hiervon werden Plasmazellen mit einem hyperdiploiden Karyotyp unterschieden, die typischerweise mit Trisomien der Chromosomen 3, 5, 7, 9, 11, 15, 19 und 21 einhergehen und selten eine IgH Translokation (Prävalenz 30%) oder eine Aberration des Chromosoms 13 aufweisen. Weitere häufige numerische Chromosomenveränderungen sind Monosomien der Chromosomen 13, 14, 16 und 22 [6, 25, 36, 47, 70, 108, 111]. In der Abbildung 2 sind einige der wichtigsten und häufigsten zytogenetischen Aberrationen aufgelistet, die in der Pathogenese des MM eine Rolle spielen.

gains		losses		translocations	
+9q34	59%	del 13q14	42%	t(14q32)	54%
+11q25	48%	del 1p22	21%		
+1q21.2	33%	del 8p11	14%	t(11;14)	17%
		del 6q21	11%	t(4;14)	14%
		del 22q11	11%	t(14;16)	3%
		del 17p13	9%		

Abbildung 2: Die zytogenetischen Aberrationen, die mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) bei 289 neu diagnostizierten Multiplen Myelom Patienten nachgewiesen wurden [70]
 +: Zugewinn; del: Deletion; t: Translokation

Aufgrund der erworbenen genetischen Instabilität der Plasmazellen können dieser Phase der Krankheitsinitiierung weitere genetische Veränderungen (Genamplifikation, Mutationen oder epigenetische Veränderungen) folgen. Diese führen zur Dysregulation und Aktivierung weiterer Protoonkogene. Diese sekundären Veränderungen entstehen nicht durch B-Zell spezifische DNA Modifikationen, sind meist unbalanciert und komplexer. Sie haben einen Krankheitsprogress zur Folge und lösen den Übergang in eine meist behandlungsbedürftige Erkrankung aus. Zu diesen sekundären Veränderungen gehören Deletionen des Chromosoms 17p13 (9-10%), somatische Aktivierungsmutationen in Genen wie *FGFR3*, *Neuroblastoma RAS viral oncogene homolog (N-RAS)* und *V-KI-RAS2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog (K-RAS)* und komplexe karyotypische Veränderungen im *V-MYC avian myelocytomatosis viral oncogene homolog (MYC)* Gen [84, 103, 106, 118]. Bei der Pathogenese des MM können auch epigenetische Veränderungen in Form von Methylierung, Acetylierung, Phosphorylierung oder Ubiquitinierung der DNA oder der Histone und die Dysregulation der MicroRNA, eine kurze nichtkodierende Ribonukleinsäure (RNA), eine Rolle spielen [80, 100]. Es ist nicht sehr viel über die epigenetischen Veränderungen, die zum Krankheitsprogress führen, bekannt, jedoch scheint die Methylierung spezifischer Gene die häufigste epigenetische Veränderung zu sein [119]. In den letzten Jahren haben mehrere Studien gezeigt, dass vermutlich jedem MM eine MGUS vorausgeht, die oft unerkannt oder subklinisch verläuft [65, 98]. Die frühen genetischen Veränderungen sind sowohl in den Zellen des MM als auch bereits in MGUS Zellen früh nachweisbar [6, 35, 61, 73]. Im Gegensatz dazu korrelieren die sekundären chromosomalen Aberrationen und Mutationen stark mit der Krankheitsprogression und werden nur in Zellen der MM Patienten gefunden. Beispielsweise kommen Mutationen in den Genen *N-RAS* und *K-RAS* häufig (45-55%) beim MM vor, aber sehr selten bei der MGUS und spielen eine wichtige Rolle bei der Tumorentwicklung und einer Therapieresistenz [6, 9, 26, 56, 106].

1.7 Das *MYD88*-Gen und die Rolle des NF- κ B-Signalweges in der Pathogenese des Multiplen Myeloms

Unter den genetischen Veränderungen, die bei MM Patienten gefunden werden, gibt es eine Vielfalt, die zur konstitutiven Aktivierung des anti-apoptotischen NF- κ B-Signalweges führen und damit den Zelltod blockieren (z.B. Deletionen von 13q14 und 17p13) [2, 55, 110]. Es konnte gezeigt werden, dass der Transkriptionsfaktor, der nukleäre Faktor 'kappa-Leichtketten-enhancer' aktivierter B Zellen (NF- κ B), für das Überleben und die Proliferation der Tumorzellen erforderlich ist. Aktiviertes NF- κ B tritt in den Zellkern ein und führt zur Transkription von Genen, die zum Überleben notwendig sind, blockiert die Apoptose und fördert die Tumorentwicklung [28, 116]. Dies zeigt die Wichtigkeit des

NF- κ B Signalweges in der Pathogenese des MM. Allgemein gibt es unterschiedliche Möglichkeiten den NF- κ B Signalweg zu aktivieren. Eine davon geht über das *myeloid differentiation primary response 88 (MYD88)* Gen. Das *MYD88*-Gen ist auf dem Chromosom 3p22 lokalisiert und hat 11 Splicevarianten. Die häufigste der 11 Varianten ist *MYD88-201*. Diese hat 5 kodierende Exone und eine Transkriptionslänge von 2871 Basenpaaren, die 957 Aminosäuren entsprechen. *MYD88* wurde erstmals 1990 als ein Protein beschrieben, welches während der terminalen Differenzierung von myeloischen Zellvorstufen auftrat [74]. 1997 wurde erstmals dessen Zusammenhang mit dem Interleukin-1 (IL1) Rezeptor beschrieben [83, 123]. Das *MYD88*-Gen kodiert das Schlüsseladaptorprotein der meisten Toll-like Rezeptoren (TLR), der IL1 und Interleukin-18 (IL18) Rezeptoren. Es übermittelt die Rezeptorsignale mithilfe von Interleukin-4 receptor associated kinase (IRAK4), Interleukin-1 receptor associated kinase (IRAK1) und tumor-necrosis-factor-receptor-associated factor 6 (TRAF6) und setzt einen Signalweg in Gange, in dem weitere Faktoren eine Rolle spielen (u.a. ubiquitierte Faktoren UEV1A (ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 1), UBC13 (ubiquitin-conjugating enzyme 13) und TAK1 (transforming-growth-factor- β -activated kinase)). Eine schematische Darstellung des Signalweges ist in Abbildung 3 dargestellt. Diese Verkettung und Verarbeitung von Signalen führt am Ende unter anderem zur Aktivierung des NF- κ B kinase Komplexes (IKK) und des NF- κ B Signalweges [20, 77].

Nicht nur die Tumorzellen des MM brauchen die konstitutive Aktivität des Faktors NF- κ B zum Überleben, sondern auch die Zellen des diffus großzelligen B-Zell-Lymphoms (DLBCL) vom activated B-cell-like (ABC) Subtyp. Bei dieser lymphatischen Erkrankung konnte in einer Studie von Ngo et al. bei 39% der Patienten Mutationen im *MYD88*-Gen detektiert werden. Eine Mutation (p.V52M) lag dabei in der death domain (DD) des *MYD88*-Gens und zwei Mutationen (p.S49G/I) wurden zwischen der death Domäne und der Toll-like/IL1 Rezeptor (TIR) Domäne, der sogenannten intermediary Domäne (ID), detektiert. Die meisten Mutationen (p.V217F, p.W218R, p.S219C, p.I220T, p.S222R, p.M232T, p.S243N und p.L265P) wurden jedoch in der TIR Domäne gefunden. Bei 29% der untersuchten ABC DLBCL Tumorpatienten wurde eine Mutation im Exon 5 des *MYD88*-Gens an der Genomposition c.38182641T>C rekurrent gefunden. Dabei handelt es sich um eine non-synonymous Punktmutation, die in der TIR Domäne des *MYD88*-Gens an der Aminosäureposition 265 zu einem Aminosäureaustausch von Leuzin zu Prolin (p.L265P) führt.

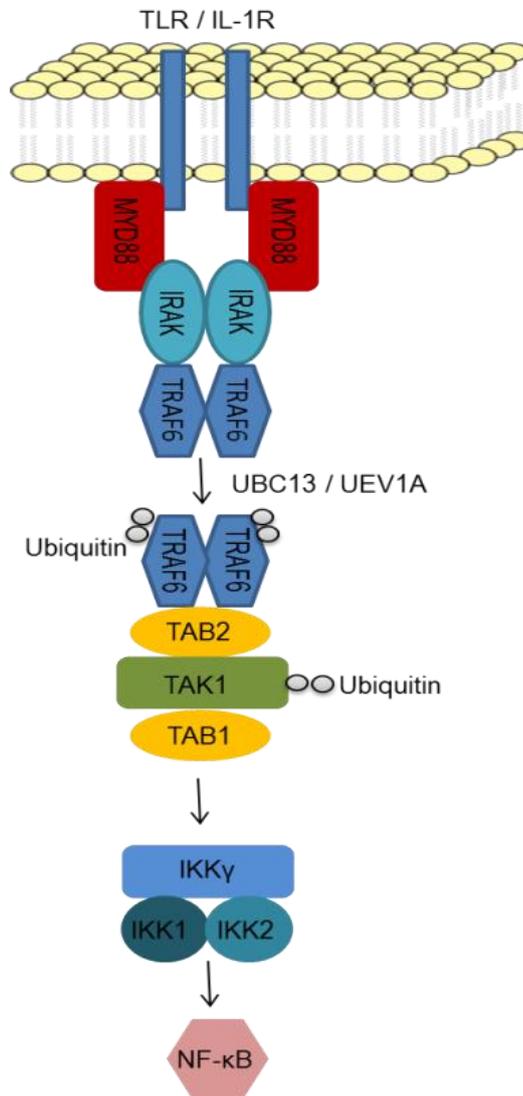


Abbildung 3: Vereinfachte Darstellung des Signalweges der NF-κB Aktivierung ([20, 87]; modifiziert) MYD88 übermittle als Schlüsseladaptorprotein der Toll-like Rezeptoren (TLR) und Interleukin 1 Rezeptoren (IL-1R) die Rezeptorsignale mithilfe von Interleukin-4 receptor associated kinase (IRAK4), Interleukin-1 receptor associated kinase (IRAK1) und tumor-necrosis-factor-receptor-associated factor 6 (TRAF6). Dies setzt einen Signalweg in Gange, an dem weitere Faktoren wie UEV1A (ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 1), UBC13 (ubiquitin-conjugating enzyme 13) und TAK1 (transforming-growth-factor-β-activated kinase) eine Rolle spielen und am Ende zur Aktivierung des NF-κB kinase Komplexes (IKK) und des NF-κB Signalweges führt.

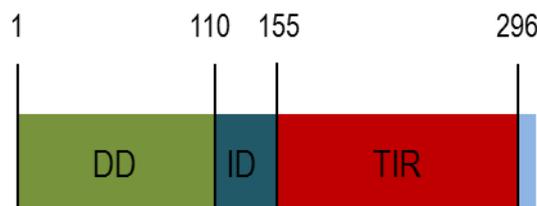


Abbildung 4: Schematischer Aufbau der Proteindomänen des MYD88-Gens ([87], modifiziert) Das MYD88-Protein besteht aus einer death domain (DD), einer intermediary domain (ID) und einer Toll/interleukin-1 Rezeptor (TIR) Domäne. Die Zahlen geben die entsprechenden Aminosäurepositionen an.

Die Mutation p.L265P ist eine „gain of function“ Mutation und fördert das Zellüberleben, indem sie die Zytokin-Freisetzung (IL6, IL10) fördert und verschiedene Signalwege aktiviert, unter anderem den NF- κ B Signalweg. Dieser Zusammenhang zeigt, dass die *MYD88* Mutation wesentlich für die Pathogenese und für das Überleben der Lymphomzellen ist [85].

Das DLBCL ist wie das MM eine neoplastische Erkrankung und gehört zu den aggressiven Non-Hodgkin-Lymphomen, die von den reifen B-Zellen ausgehen. Die Differenzierung der B-Zellen aus denen ein DLBCL hervorgeht ähnelt in großen Teilen der Differenzierung der Plasmazellen. Bei beiden Krankheiten hat der NF- κ B Signalweg in der Pathogenese einen hohen Stellenwert. Diese Ähnlichkeiten der beiden Krankheitsbilder ließen vermuten, dass die Mutationen im *MYD88*-Gen nicht nur beim DLBCL vorkommen, sondern auch beim MM eine Rolle spielen könnten.

1.8 Zielsetzung der Arbeit

Die Ziele dieser Arbeit waren die Bestimmung der Inzidenz der somatischen Mutation p.L265P im *MYD88*-Gen bei 151 Patienten mit einem symptomatischen MM. Hierfür wurde das Exon 5 des *MYD88*-Gens an der aus KM gewonnenen DNA des Patientenkollektivs mittels Sanger Sequenzierung analysiert. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die Charakterisierung der Kohorte und Korrelation zu klinischen Symptomen, dem Erkrankungsverlauf, Laborwerten, und zur molekularen Zytogenetik (FISH Analyse).

2 Patienten, Material und Methoden

2.1 Auswahl der Patienten

Untersucht wurden 151 Patienten, die im Zeitraum von 1998 bis 2010 die Erstdiagnose eines symptomatischen MM gestellt bekamen und in der Abteilung für Innere Medizin III der Universitätsklinik Ulm mittels einer Hochdosis Melphalan Therapie und autologer Stammzelltransplantation (SCT) behandelt wurden. Die Patienten konnten über das klinikeigene elektronische Arztbriefverzeichnis PMS identifiziert werden. Eine letzte Voraussetzung zur Aufnahme in die Studie war, dass genügend DNA dieser Patienten zur Verfügung stand.

2.2 Angewendete Methoden

In Abbildung 5 ist der Algorithmus der durchgeführten Methoden von der Zellgewinnung bis hin zur Sequenzierung und statistischen Analyse zusammengefasst.

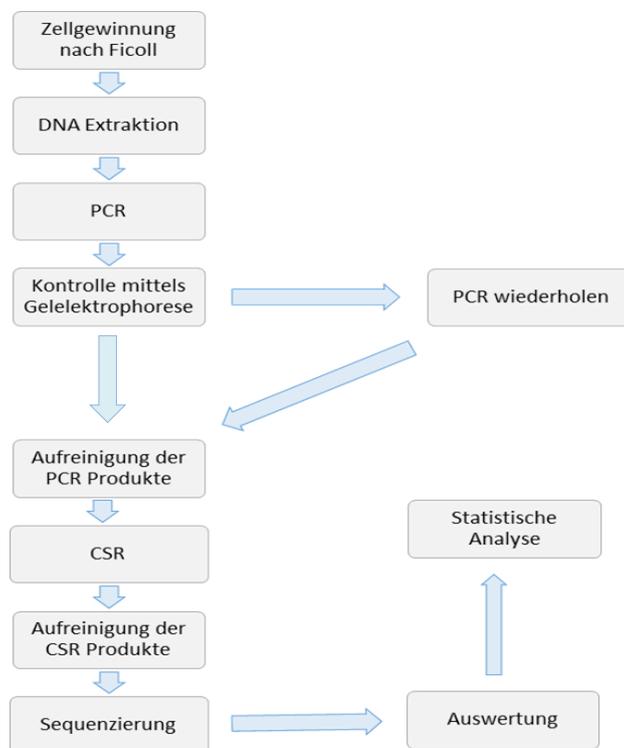


Abbildung 5: Zusammenfassung der angewendeten Methoden

CSR: Cycle sequencing reaction; DNA: Desoxyribonukleinsäure; PCR: Polymerasekettenreaktion

2.3 Verwendete Materialien

2.3.1 Liste aller Reagenzien, Labor- und Verbrauchsmaterialien

Die nachfolgend aufgeführten Reagenzien und Chemikalien wurden von den nebenstehenden Firmen bezogen:

Reagenzien, Verbrauchsmaterial	Hersteller
1x TAE Puffer	Eigene Herstellung
10x BlueJuice Loading Buffer	Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, USA
Agarose	Lonza, Basel
AllPrep DNA/RNA Mini Kit	Quiagen, Hilden
Ampli Taq Gold [®] with Gene Amp (10 x PCR Gold Puffer und Mgcl ₂)	Applied Biosystems, Darmstadt
Aqua ad iniectabilia	Braun, Melsungen
BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems, Darmstadt
Deoxynucleoside Triphosphate Set PCR Grade	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
DMSO Art no: D4540	Sigma, St. Louis, USA
DyeEx 2.0 Spin Kit (250)	Qiagen, Hilden
Einmal-Injektions-Kanüle (Gr. 12)	Braun, Melsungen
Elektrophoresekammer mit Schlitten, Schiene, Kabeln und Kämmen	Kammer: Fa. MBT Gießen Schlitten, Schiene, Kämmen: wissenschaftliche Werkstatt Uni Ulm
Essigsäure 100%	AppliChem, Darmstadt
Ethidiumbromid 0,07%,	AppliChem, Darmstadt
EtOH absolute	Sigma-Aldrich, Seelze
Ficoll Separating Solution (Pancoll human)	PAN Biotech, Aidenbach
Pipettenspitzen, steril (Barrier Tip)	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Primer (<i>MYD88</i> -Seq-E5F, <i>MYD88</i> -Seq-E5R)	Eurofins MWG Operon, Ebersberg
QIAquick PCR Purification Kit (250)	Qiagen, Hilden

RLT Puffer Plus, AllPrep DNA/RNA Kit	Quiagen, Hilden
RPMI 1640 Medium	Biochrom, Berlin
Spritzen (1 ml)	Becton Dickinson, Heidelberg
TrackIt 1kb Ladder	Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, USA
Trizma base, minimum 99,9% titration	Sigma Aldrich, Seelze
UltraPure™ 0,5 M EDTA, pH 8.0	Gibco, Carlsbad, Kalifornien, USA

2.3.2 Geräteliste

Geräte	Hersteller
Geldokumentationssystem Molecular Imager Gel Doc XR System 170-8170	Bio Rad, München
MicroAmp Optical 96 Well Reaction Plate	Applied Biosystems, Darmstadt
Mikrowellengerät	Firma Siemens
Nanodrop ND 1000 Spectrophotometer	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Sequenziergerät Sequencer 3130XL	Applied Biosystems, Darmstadt
Thermocycler Gene Amp System 2720	Applied Biosystems, Darmstadt
Waage	Fa. Sartorius AG, Göttingen
Zellzahlgerät Sysmex XS-80	Sysmex Europe GmbH, Norderstedt
Zentrifuge Biofuge A	Heraeus, Hanau
Zentrifuge Biofuge pico	Heraeus, Hanau
Electrophoresis Power Supply E835	Fa. Consort

2.4 Materialgewinnung und -aufbereitung

Die Mutationsanalyse des *MYD88*-Gens wurde an Plasmazellen des KM durchgeführt, das durch eine Beckenkammpunktion und Aspiration des KM gewonnen wurde. Direkt nach der Entnahme wurden die Proben im Verhältnis 1:10 heparinisiert (Natrium-Heparin). Die für die weiteren Schritte benötigten mononukleären Zellen wurden mit dem Prinzip der Dichtegradientenzentrifugation mittels Ficoll extrahiert. Dabei hat man sich die unterschiedliche Dichte zwischen den Zellen und dem Ficoll Medium zu Nutze gemacht. Das Ficoll Medium, das aus Saccharose und Epichlorhydrin besteht, hat mit 1,077 g/ml eine geringere Dichte als Erythrozyten und Granulozyten, jedoch eine größere Dichte als Lymphozyten und Monozyten. Das Probenmaterial das aus dem KM gewonnen wurde, wurde mit RPMI Medium im Verhältnis 1:1 verdünnt. Anschließend wurde das verdünnte Probenmaterial im Verhältnis 1:1 auf das Ficoll Medium, Ficoll Separating Solution, aufgetragen. Dabei musste darauf geachtet werden, dass sich die Schichten beim Auftragen nicht vermischen. Während der 20 minütigen Zentrifugation mit 280 revolutions per minute (rpm) wanderten Erythrozyten, Granulozyten, Thrombozyten und tote Zellen auf den Boden. Die mononukleären Zellen reichert sich aufgrund ihrer Dichte in der sogenannten „Interphase“, zwischen Plasma und Ficollschicht, an und konnten mit einer sterilen Pipette ab pipettiert werden. Nach zweimaligem Waschen mit 1xPBS und anschließender Zentrifugation (7 Minuten bei 1200 rpm), bei der Verunreinigungen und mögliche Ficollreste entfernt wurden, wurde die Zellzahl mit Hilfe des Zellzahlgerätes Sysmex XS-800i der Firma Sysmex Europe GmbH bestimmt. Die Lagerung der mononukleären Zellen erfolgte bei -80°C als Pellets mit maximal 1×10^7 Zellen.

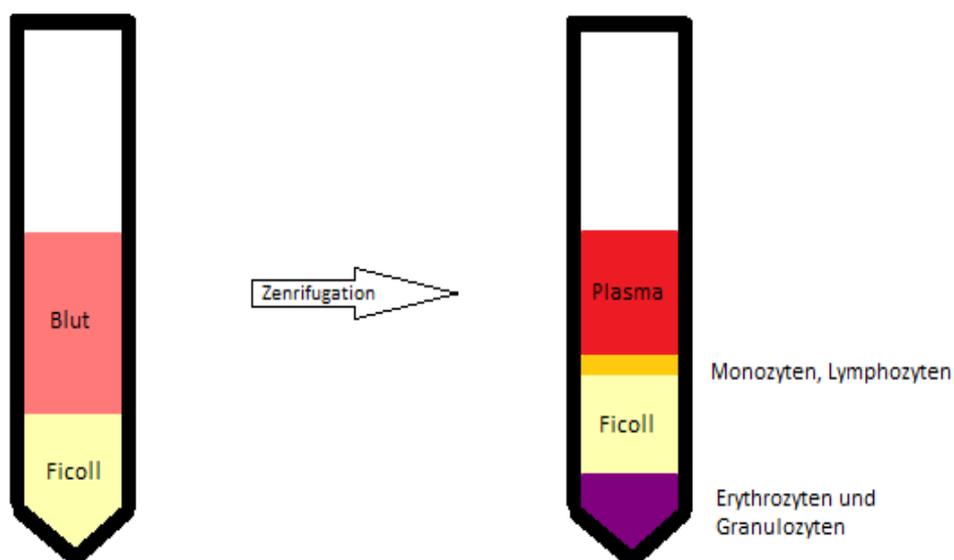


Abbildung 6: Durchführung der Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation und Gewinnung mononukleärer Zellen

2.5 Desoxyribonukleinsäure Extraktion

Die DNA Extraktion wurde auf Eis mit dem AllPrep DNA/RNA Mini Kit durchgeführt.

Bestandteile des AllPrep DNA/RNA Kits:

AllPrep DNA Mini Spin Columns
Collection Tubes (1,5 ml)
Collection Tubes (2 ml)
Buffer AW1 (concentrate)
Buffer AW2 (concentrate)
Buffer EB

Vor erstmaligem Gebrauch des Kits mussten die Puffer AW1 und AW2 nach Anleitung mit 100% Ethanol gelöst werden. Die bei -80°C gelagerten Zellpellets wurden in 600 Mikroliter (μl) RLT-Puffer gelöst und durch mehrmaliges Auf- und Abziehen in einer 1 ml Heparin Spritze zerstört. Das im RLT-Puffer enthaltene Guanidiniumthiocyanat wirkt chaotrop, das heißt es besitzt die Fähigkeit Wasserstoffbrückenbindungen zu zerstören. Das entstandene Lysat wurde auf die im Kit enthaltenen AllPrep DNA Säulen pipettiert und eine Minute bei 13000 rpm zentrifugiert, wobei die DNA in der Säule gebunden wurde, während sich die RNA im Durchfluss befand. Um die DNA weiter aufzubereiten wurden die Säulen mit 500 μl AW1 Puffer gewaschen und 30 Sekunden bei 13000 rpm zentrifugiert. Das im AW1 Puffer enthaltene chaotrope Salz denaturierte weitere Proteine, die bei der Zentrifugation aus der Säule gespült und anschließend im Durchfluss verworfen wurden. Um die DNA von verbliebenen Salzen zu reinigen wurde der Vorgang mit 500 μl AW2-Puffer wiederholt. Nach einer einminütigen Trockenzentrifugation der Säulen bei 13000 rpm wurde diese auf ein neues Eppendorf-Gefäß positioniert. Um die noch an den Säulen gebundene DNA zu lösen wurden 100 μl EB Puffer pipettiert und nach 5 Minuten Inkubationszeit für eine Minute lang bei 13000 rpm zentrifugiert. Dieser Schritt wurde ein zweites Mal mit 50 μl EB Puffer wiederholt. Um die Qualität der nun erhaltenen und gereinigten DNA zu beurteilen, erfolgte eine visuelle Kontrolle durch eine Gelelektrophorese auf einem 1,5%-Agarosegel. Hierfür wurden 2 μl der DNA-Lösung, 6 μl Aqua ad iniectabilia und 2 μl BlueJuice Gel loading Buffer in die Geltaschen pipettiert. Zusätzlich erfolgte eine Konzentrationsbestimmung der enthaltenen DNA. Diese wurde aus 2 μl der DNA-Lösung mit Hilfe des Nanodrop ND-1000 Spectrophotometer (Fa. Thermo Scientific) durchgeführt. Die restliche DNA wurde bis zum weiteren Gebrauch bei -20°C zwischengelagert.

2.6 Polymerasekettenreaktion

Um die Mutation p.L265P im *MYD88*-Gen untersuchen zu können wurde das Exon 5 des *MYD88*-Gens mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) vervielfältigt. Hierfür wurde die zuvor extrahierte DNA aus den mononukleären Zellen der Patienten verwendet.

2.6.1.1 Primer

Die Primer wurden von der Firma Eurofins MWG (Ebersberg) lyophilisiert bezogen. Um diese für die PCR benutzen zu können wurden aus den Primer-Stammlösungen durch mehrfache Verdünnung Arbeitslösungen hergestellt. Im ersten Schritt wurde die Primer-Stammlösung mit 574 μl beziehungsweise 524 μl dH_2O verdünnt, um eine Stammlösung der Konzentration 100 Pikomol/Mikroliter ($\text{pmol}/\mu\text{l}$) herzustellen. Da die Arbeitslösung, die für die Durchführung der PCR benutzt wurde, eine Konzentration von 10 $\text{pmol}/\mu\text{l}$ haben musste, wurde die Primer-Stammlösung ein weiteres Mal mit dH_2O im Verhältnis 1:10 verdünnt. Die hergestellte Primer-Arbeitslösung wurde bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

Verwendete Primer:

Primer 1/Vorwärtsprimer *MYD88*-Seq-E5F: 5' - GTTGTTAACCCTGGGGTTGAAG - 3'

Primer 2/Rückwärtsprimer *MYD88*-Seq-E5R: 5' - GCAGAAGTACATGGACAGGCAG - 3'

Dabei hat der Vorwärtsprimer, der mit F für forward abgekürzt wurde, den DNA Strang in Richtung $5' \rightarrow 3'$ abgelesen und der Rückwärtsprimer in Richtung $3' \rightarrow 5'$ und war mit einem R für reverse gekennzeichnet.

2.6.1.2 Reaktionsansatz und Durchführung

Die DNA Probe wurde mit Aqua ad iniectabilia zu einer Konzentration von 100 Nanogramm/Mikroliter ($\text{ng}/\mu\text{l}$) verdünnt. Die Desoxynukleosid-Triphosphate (dNTPs) wurden ebenfalls im Vorfeld im Verhältnis 1:1 mit Aqua ad iniectabilia verdünnt. Die Herstellung des Mastermix erfolgte nicht auf Eis, da sonst das verwendete Dimethylsulfoxid (DMSO) gefroren wäre und nicht mehr seine Funktion hätte ausüben können. Das DMSO, ein organisches Lösungsmittel, verhinderte die Ausbildung von Sekundärstrukturen der DNA und wird allgemein vor allem bei GC-reichen DNA Sequenzen eingesetzt. Der verwendete PCR Puffer erhöhte und stabilisierte die Primer-Bindung und trug zur Konstanzhaltung des pH-Wertes bei. Die Ampli Taq Gold® DNA Polymerase, die den gewünschten Genabschnitt replizierte, ist im Gegensatz zu anderen DNA Polymerasen auch bei hohen Temperaturen thermostabil und denaturiert während der PCR bei der Erhitzung auf 95°C im Gegensatz zu DNA Polymerasen mesophiler Organismen nicht. Sie ist eine modifizierte Form einer DNA Polymerase, die ursprünglich aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* (=Taq) stammt.

Jeder PCR Ansatz enthielt:

10x PCR Puffer	2,5 µl	} Master Mix
Forward Primer Arbeitslösung (10pmol/µl)	1 µl	
Reverse Primer Arbeitslösung (10pmol/µl)	1 µl	
dNTPs (10 mM)	0,25 µl	
25 mM MgCl ₂	1,5 µl	
Taq DNA Polymerase (5 U/µl)	0,25 µl	
dH ₂ O	18,5 µl	
DMSO	1,25 µl	
DNA Probe (100ng/µl)	1 µl	

Zusätzlich wurde pro hergestelltem Master Mix ein PCR Ansatz ohne Zugabe der DNA Probe pipettiert und als Negativkontrolle verwendet. Die eigentliche PCR Reaktion erfolgte im Thermocycler 2720 *Thermal Cycler* der Firma Applied Biosystems. Hierbei wurde die DNA nach folgendem Protokoll amplifiziert.

PCR-Protokoll:

Temperatur	Zeit	Zyklusanzahl
95°C	10 Minuten	1
95°C	15 Sekunden	32
65°C	15 Sekunden	32
72°C	1 Minute	32
72°C	5 Minuten	1
8°C	∞	

Die Taq Polymerase lag bei Raumtemperatur in inaktivem Zustand vor und um diese zu aktivieren musste sie vor Beginn der eigentlichen PCR für 10 Minuten bei 95°C inkubiert werden. Als erster Schritt kam es zur Denaturierung der DNA. Bei 95°C trennten sich die komplementären DNA Stränge, was die Voraussetzung für die Primer Hybridisierung darstellte. Durch rasches Herabkühlen der Temperatur auf 65°C lagerten sich die Primer an den passenden komplementären DNA Abschnitt und bildeten eine stabile Verbindung mit diesem. Die passenden Nukleotide wurden von der Taq Polymerase eingebaut und amplifizierte somit den ausgewählten DNA Abschnitt. Dieser Schritt fand bei 72°C statt, da die Taq Polymerase unter dieser Temperatur optimal arbeitet. Dieser

Vorgang wurde 32 Zyklen wiederholt bis ausreichend Genkopien vorlagen. Anschließend wurden die PCR Produkte abgekühlt und bis zur weiteren Verwendung bei 8°C im Kühlschrank aufbewahrt.

2.7 Gelelektrophorese

Um zu überprüfen ob die PCR Reaktion und die Amplifizierung der gewollten Genabschnitte erfolgreich war, und um Verunreinigungen des PCR Ansatzes auszuschließen, wurde eine Agarose-Gelelektrophorese gemacht. Diese funktionierte wie ein Sieb für die DNA Fragmente, wodurch sie nach deren Länge im elektrischen Feld aufgetrennt wurden. Die negativ geladenen Nukleinsäuremoleküle wanderten bei Anlegen eines elektrischen Feldes in Richtung Pluspol, wobei sich die Wanderungsgeschwindigkeit dabei indirekt proportional zu der Größe der DNA Fragmente verhielt. Das heißt die kleineren Fragmente wanderten schneller durch das Gel zum Pluspol. Um die Länge der aufgetrennten DNA Fragmente bestimmen zu können, wurde ein Längenstandard (LS) als Vergleich mit pipettiert.

2.7.1 Herstellung eines Agarosegels

In einem Erlenmeyerkolben wurden 1,5 g Agarose mit 100 ml des zuvor selbst hergestellten 1 x TAE (Tris-Acetat-EDTA) Puffer in der Mikrowelle erwärmt, bis die Agarose vollständig gelöst war. Mithilfe eines magnetischen Rührgerätes wurde es vermischt und gleichzeitig etwas abgekühlt. Durch Abkühlen bildete sich ein über Wasserstoffbrücken vernetztes Gel des Agarosegemisches. Um später die entstehenden Banden sichtbar machen zu können wurde pro 100 ml Agarosegel zwei Tropfen Ethidiumbromid 0,07% beigemischt. Das flüssige Gel wurde in einen Gelschlitten umgefüllt, der mit Kämmen für die späteren Geltaschen bestückt war. Nachdem das Gel vollständig abgekühlt war und die Kämmen entfernt waren, wurde es in die Elektrophoresekammer gelegt und konnte für die Gelelektrophorese benutzt werden.

2.7.2 Durchführung der Agarose-Gelelektrophorese

In die Geltaschen des vorher gefertigten 1,5%igen Agarosegels wurden 8 µl des PCR Produktes mit 2 µl 10x BlueJuice Loading Buffer pipettiert. Der Ladepuffer verhinderte das Auslaufen der PCR Produkte aus den Geltaschen durch Erhöhung der Dichte. Um eine Kontamination auszuschließen wurde ebenfalls eine Negativkontrolle mitgeführt. Die erste und letzte Geltasche wurde leergelassen. Diese wurden jeweils mit 4-5 µl des LS Trackit 1kb befüllt. Die Auftrennung der DNA Fragmente erfolgte bei einer Spannung von 150 Volt (V) und einer Stromstärke von 500 Milliampere (mA) über 30 Minuten. Anschließend wurden die Banden mit Hilfe des zuvor hinzugefügten Ethidiumbromids unter Ultraviolett (UV)-Licht sichtbar gemacht. Hierbei macht man sich die fluoreszierende Wirkung des Ethidiumbromid zu Nutze, welches sich zwischen die Basenpaare einlagerte. Die nun

sichtbare Bandenanordnung wurde mit Hilfe des UV-Transluminator-Systems *Molecular Imager Gel Doc XR System 170-8170* der Firma Bio Rad photographiert.

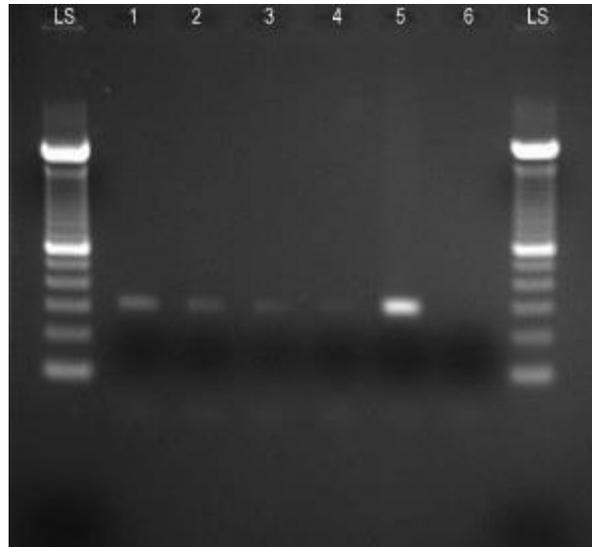


Abbildung 7: Photographie einer Agarose-Gelelektrophorese

In der ersten und letzten Tasche ist der Längenstandard (LS) Trackit 1kb zu sehen. An Position 1-5 erkennt man die Auftrennung der Patienten DNA und an Position 6 wurde die Negativkontrolle aufgetragen.

2.8 Aufreinigung der Polymerasekettenreaktion Produkte

Ziel dieses Schrittes war es die PCR Produkte von unerwünschten Bestandteilen, wie zum Beispiel überschüssigen PCR Primerresten, der DNA Polymerase, Verunreinigungen und nicht eingebauten Nukleotiden, zu reinigen. Dies wurde mit Hilfe des QIAquick® PCR Purification Kit der Firma Qiagen gemacht, die sich hierfür die selektiven Bindungseigenschaften einer Silicagel-Membran zu Nutze machen.

Bestandteile des QIAquick Purification Kit:

QIAquick spin columns
PB Puffer
PE Puffer
EB Puffer
Collection tubes

Die QIAquick Aufreinigungssäulen wurden in die zugehörigen Sammel tubes gesteckt. Das PCR Produkt wurde direkt auf die Membran der Säule (QIAquick spin column) pipettiert und 200 µl PB Puffer direkt darauf pipettiert. Dieses Gemisch wurde bei 13000 rpm für eine Minute zentrifugiert. Dabei band die DNA unter hoher Salzkonzentration (Guanidinhydrochlorid) in der stationären Phase

der Säulen, während die oben genannten unerwünschten Bestandteile ungehindert durch die Säule fließen und verworfen wurden. Um Salze zu entfernen, die die Elution der gebundenen DNA erschweren, wurde 600 µl des PE Puffers hinzu pipettiert und erneut bei 13000 rpm eine Minute lang zentrifugiert. Nach Verwerfen des durchgelaufenen Puffers wurde bei 13000 rpm eine Minute trocken zentrifugiert, um den kompletten Waschpuffer zu entfernen. Nun war die DNA ohne Kontaminationen in der Membran gebunden und musste als letzter Schritt hieraus gelöst werden. Die Säulen wurden in ein neues Eppendorf-Tube (1,5 ml) gesetzt und 30 µl EB Puffer in die Säule pipettiert. Nach 5 minütiger Inkubationszeit wurde ein letztes Mal bei 13000 rpm für eine Minute zentrifugiert. Das nun gereinigte PCR Produkt wurde in diesem Schritt aus der stationären Phase gelöst und befand sich im Durchfluss. Dieses Eluat wurde in ein neues Eppendorf-Tube (1,5 ml) überführt und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C im Kühlschrank gelagert.

2.9 Cycle Sequencing Reaction

2.9.1 Prinzip und Durchführung

Die Cycle sequencing reaction (CSR) ist eine notwendige lineare PCR Amplifikation zur Dekodierung der Basenabfolge. Im Gegensatz zur PCR wurde hier pro Reaktionsansatz nur ein Primer, entweder der forward oder der reverse Primer verwendet. Dieser band an das 3`Ende der Einzelstrang DNA und die DNA Polymerase (AmpliTaQ DNA Polymerase) bildete den komplementären Strang. Zusätzlich zu den bei der PCR verwendeten dNTP`s wurden vier unterschiedliche Didesoxynukleosidtriphosphate (ddNTP`s) hinzugefügt, welche mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markiert waren. Wurden diese ddNTP`s von der DNA Polymerase nach dem Zufallsprinzip eingebaut kam es zum sofortigen Abbruch der Kettenverlängerung. Die ddNTP`s besitzen keine freie 3`-OH Gruppe, die zur Ausbildung von Phosphodiesterbrücken zur Kettenverlängerung benötigt werden. Dadurch entstanden unterschiedlich lange DNA Fragmente, die sich in ihrer Länge um jeweils eine Base unterschieden und mit dem jeweils spezifischen Farbstoff der Base für A, C, G und T endeten. Anschließend wurden die DNA Fragmente mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und die Basensequenz konnte mit Hilfe eines Sequenziergerätes ermittelt werden. Die Sequenzierungsreaktion wurde mit Hilfe des Big Dye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit durchgeführt. Im verwendeten Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Mix („Big Dye“) waren die fluoreszenzmarkierten ddNTP`s (dye terminators), die ungelabelten dNTP`s und die DNA Polymerase (AmpliTaQ DNA Polymerase) in optimalen Konzentrationen enthalten. Da der Big Dye sehr wärmeempfindlich ist, musste der CSR Ansatz auf Eis pipettiert werden und wurde bei -20°C gelagert.

Jeder CSR Ansatz enthielt:

Big Dye	2 μ l	}	Master - Mix
5x Sequenzierung Puffer	1,7 μ l		
H ₂ O (DEPC)	8,3 μ l		
Primer (F oder R)	1 μ l		
DNA Produkt (aufgereinigtes PCR Produkt)	2 μ l		
<hr/> Gesamtmenge	<hr/> 15 μ l		

Der fertige Mastermix wurde in den Thermocycler *2720 Thermal Cycler* der Firma Applied Biosystems überführt, in dem die Amplifikation der DNA nach folgendem Protokoll stattfand.

CSR Protokoll:

Temperatur	Zeit	Zyklen
96°C	1 Minute	1
96°C	10 Sekunden	25
52°C	5 Sekunden	25
60°C	2 Minuten	25
4°C	∞	

Analog zu dem PCR Protokoll sind dies die optimalen Bedingungen unter denen die DNA Doppelstränge denaturiert werden und die Amplifikation nach oben beschriebenem Prinzip stattfinden konnte.

2.9.2 Aufreinigung der Cycle Sequencing Reaction Produkte

Das CSR Produkt musste noch von den überschüssigen Stoppnukleotiden (ddNTP's) und der Big Dye Lösung gereinigt werden, die von der DNA Polymerase nicht eingebaut wurden, und die anschließende Sequenzanalyse behindert hätten. Hierfür wurde das DyeEx® 2.0 Spin Kit benutzt, welches sich das Prinzip der Gelchromatographie zu Nutze macht. Die Trennung fand aufgrund der Molekülmasse statt. In der Säule befand sich eine poröse Polymermatrix mit Poren in die kleine Moleküle diffundierten und somit in der Matrix festgehalten wurden. Die Porengröße war so gewählt, dass nur die freien Stoppnukleotide von der stationären Phase zurückgehalten wurden. Die DNA Fragmente, die einen größeren Durchmesser haben, konnten die Gelmatrix durchqueren und befanden sich am Ende aufgereinigt im Durchfluss.

Die Säulen (DyeEx® Spin Columns) wurden zunächst gevortext, um die Polymermatrix zu resuspendieren. Zur weiteren Vorbereitung musste der Deckel durch eine Vierteldrehung gelockert und unten aufgebrochen werden. Die Spin Columns wurden in den Collection-Tubes für drei Minuten bei 2800 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Spin Columns, die nun eine feste Gel-Matrix enthielten, in neue Auffang-Tubes überführt. Im Anschluss wurde das gesamte CSR Produkt auf die Säulen pipettiert. Hierbei musste man darauf achten, dass beim Pipettieren das Gel nicht berührt wurde und die CSR Produkte mittig auf das Gel pipettiert wurden. Nach einer weiteren dreiminütigen Zentrifugation bei 2800 rpm befand sich nun das aufgereinigte CSR Produkt im Überstand, während die Stoppnukleotide und andere Verunreinigungen in der stationären Phase der Gelmatrix hängen geblieben waren. Bis zur eigentlichen Sequenzierung wurde das aufgereinigte CSR Produkt in einem Eppendorf-Tube bei -20°C gelagert.

2.9.3 Sequenzierung und Identifizierung von Mutationen

Die aufgereinigten CSR Produkte wurden in eine 96-Well MicroAmp Platte (Applied Biosystems) überführt. Dabei musste darauf geachtet werden, dass die Platte immer in 16er Blöcken befüllt war. Der Rest wurde mit 15 µl Formamid aufgefüllt, um die Entstehung von Luftblasen zu verhindern. Im Sequenziergerät *3130xl Genetic Analyzer®*, Applied Biosystems, wurden die fluoreszenzmarkierten ddNTP's identifiziert und die DNA Sequenz Base für Base als Abfolge von Fluoreszenzsignalen dekodiert. Durch eine elektrophoretische Auftrennung der Kettenabbruchfragmente über ein hochauflösendes Polymer wurden die fluoreszenzmarkierten DNA Fragmente der Länge nach aufgetrennt. Auf ihrer Wanderung von der Anode zur Kathode kamen die Nukleotide an einem Argon-Ionen-Laserstrahl vorbei, der die Fluoreszenzfarbstoffe der ddNTP's zur Emission von Fluoreszenz Signalen anregte. Diese Fluoreszenz Signale wurden mittels der speziellen Computersoftware Applied BioSystems-Software in eine graphische Darstellung konvertiert. Gleichzeitig konnte anhand der Stranglänge die Position der Base innerhalb der Gensequenz ermittelt werden. Jedem Stoppnukleotid ist ein bestimmter Fluoreszenzfarbstoff zugeordnet (grün = Adenosin, schwarz = Guanin, blau = C, rot = Thymin). Die entstandene Abfolge der verschiedenen farbigen Fluoreszenzpeaks entsprach der Basensequenz und wurde interpretiert.

2.10 Auswertung der Sequenzen

Die dargestellte Sequenz wurde mit der Originalsequenz des *MYD88*-Genabschnittes (*MYD88* Referenzsequenz: NCBI NM_002468 auf dem Chromosom 3p22) verglichen, um Deletionen, Insertionen, Punktmutationen etc. zu detektieren. Führte eine genetische Veränderung in dem jeweiligen Codon zu einem Aminosäureaustausch wurde diese Mutation als R = replacement

Mutation bezeichnet. Fand kein Austausch der Aminosäure statt wurde diese als s = silent Mutation bezeichnet.

2.11 Statistische Analyse und Datenauswertung

2.11.1 Ausgewertete klinische Daten

Die Untersuchungen und die Auswertung der klinischen Daten wurden gemäß dem Ethikvotum 307/08 durchgeführt. Die relevanten Patientendaten konnten aus den ärztlichen Patientenprogrammen (SAP und PMS) und aus den Arztbriefen der Patienten entnommen werden. Auf die Labordaten konnte man in der Datenbank zurückgreifen. Eine letztmalige Prüfung des Vitalstatus erfolgte im Mai 2014. Alle Parameter, die in der Auswertung berücksichtigt wurden, sind in der Tabelle 2 aufgelistet.

Tabelle 2: Die ausgewerteten klinischen Daten und Laborwerte

Allgemeine Parameter	<ul style="list-style-type: none"> - Geschlecht - Geburtsdatum - Zeitpunkt der Erstdiagnose - Alter bei Erstdiagnose - Letzter Kontakt - Vitalstatus - Todesursache
Klinische Parameter	<ul style="list-style-type: none"> - Schwerekettenotyp (Immunglobulin G, Immunglobulin A, Immunglobulin D) - Leichtkettenotyp (Kappa, Lambda) - Stadieneinteilung nach Salmon und Durie - Internationales Staging System Stadium - Event (Rezidiv, Progress, Tod) - Therapieart (Single Hochdosistherapie + Stammzelltransplantation oder Double Hochdosistherapie + Stammzelltransplantation)
Laborparameter	<ul style="list-style-type: none"> - Leukozyten - Hämoglobin - Thrombozyten - Kalzium - Laktatdehydrogenase - Albumin im Serum - β-2-Mikroglobulin - Kreatin

Die Daten wurden in einer Excel Tabelle (Microsoft Excel 1997-2003) gesammelt. Folgende Programme wurden zur statistischen Analyse verwendet: Microsoft Excel 1997-2003 (Microsoft Corporation, Redmond, USA), IBM SPSS Statistics V19 (IBM Corporation, Armonk, USA). Das Gesamtüberleben wurde vom Zeitpunkt der Diagnose bis zum Tod, unabhängig von der Todesursache, definiert, und das ereignisfreie Überleben vom Zeitpunkt der Diagnose bis zum Eintreten eines Ereignisses (Tod, Progress, Rezidiv). Dabei wird ein Rezidiv als ein erneuter Ausbruch der Krankheit nach einer kompletten Remission (CR) definiert. Von einem Progress spricht man bei der Verschlechterung der Krankheit ohne vorherige CR [32]. Die statistischen Tests wurden alle doppelseitig durchgeführt. Die Überlebenszeit wurde mittels der Kaplan-Meier-Methode geschätzt und Differenzen zwischen den Subgruppen mit dem log-rank-Test berechnet [129, 130]. Statistische Signifikanz wurde bei einem p-Wert $\leq 5\%$ erreicht.

3 Ergebnisse

3.1 Klinik

3.1.1 Alter und Geschlecht

Das untersuchte Patientenkollektiv, welches aus 151 Patienten bestand, setzte sich aus 70 (46,4%) Frauen und 81 (53,6%) Männern zusammen. Die Patienten waren bei der Erstdiagnose im Median 59 Jahre alt. Nur drei Patienten (1,9%) hatten ein Lebensalter von unter 40 Jahren bei ihrer Erstdiagnose. Der jüngste Patient war 32 Jahre alt. Vier Patienten (2,6%) waren bei ihrer Erstdiagnose über 70 Jahre alt. Der älteste Patient war 73 Jahre alt. Durch das Einschlusskriterium einer Hochdosistherapie ergab sich ein relativ junges Durchschnittsalter der Patienten.

3.1.2 Monoklonales Immunglobulin

Das häufigste monoklonale Immunglobulin beim Patientenkollektiv war das IgG mit 64,2%. Das heißt bei 97 der Patienten konnte man IgG als monoklonales Immunglobulin nachweisen. IgA konnte bei 27 Patienten (17,9%) nachgewiesen werden und IgD nur bei zwei Patienten (1,3%) des Kollektivs. Bei 25 der 151 Patienten konnten in der Immunfixation nur monoklonale Leichtketten nachgewiesen werden. Das heißt 16,6% der Patienten hatten einen reinen Leichtkettentyp des MM. 105 Patienten (69,5%) wiesen monoklonale Leichtketten vom Typ Kappa auf. Bei den restlichen 46 Patienten (30,5%) konnte man Leichtketten vom Typ Lambda nachweisen.

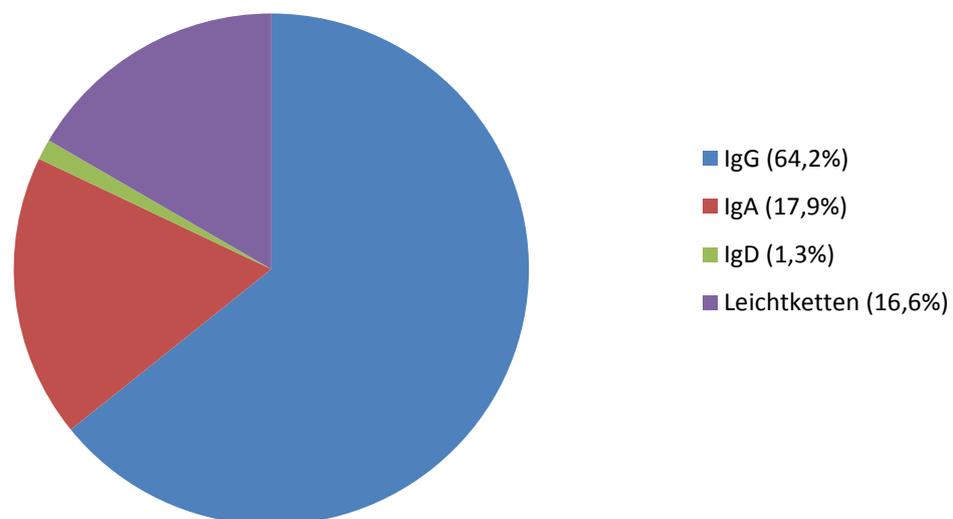


Abbildung 8: Verteilung der unterschiedlichen monoklonalen Immunglobuline (Ig) in Prozent der 151 Patienten mit einem Multiplen Myelom (Universitätsklinik Ulm, 1998 - 2010)

3.1.3 Stadieneinteilung der Krankheit

Die Patienten wurden sowohl nach der Stadieneinteilung Salmon und Durie, als auch nach dem ISS in ein Stadium eingeteilt [31, 44]. Bei der Stadieneinteilung nach Salmon und Durie erfüllte der Großteil der Patienten (70,2%; 106 Patienten) die Kriterien für das Stadium IIIA. Zehn Patienten (6,6%) wurden in das Stadium IA eingestuft und 15 Patienten (10%) wurden dem Stadium IIA zugeordnet. Die übrigen 20 Patienten (13,2%) waren bereits im Stadium IIIB. Bei der ISS Einteilung, die nur die Laborwerte β_2 -MG und Albumin im Serum berücksichtigt, wurde der Großteil mit 67 Patienten (44,4%) dem Stadium I zugeordnet. 47 Patienten (31,1%) wurden aufgrund ihrer Labordaten in das Stadium II eingeteilt und 34 Patienten (22,5%) erfüllten bereits die Kriterien für das Stadium III. Drei Patienten konnten in kein Stadium eingestuft werden, da nicht alle notwendigen Labordaten vorhanden waren.

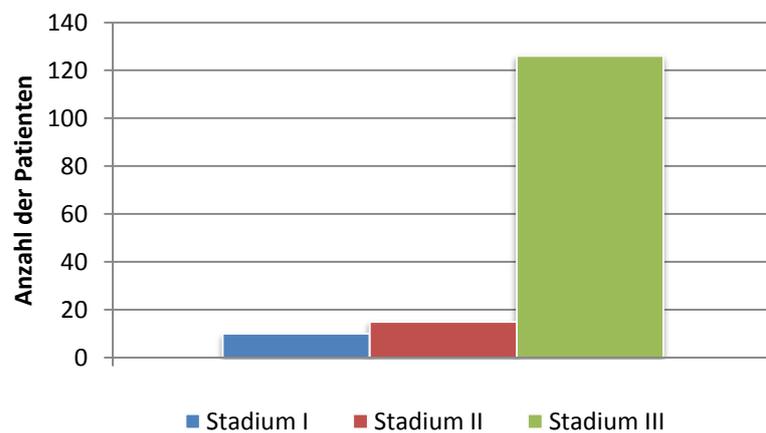


Abbildung 9: Verteilung der 151 Patienten mit einem Multiplen Myelom (Universitätsklinik Ulm, 1998 - 2010) in das entsprechende Stadium nach der Stadieneinteilung nach Salmon und Durie

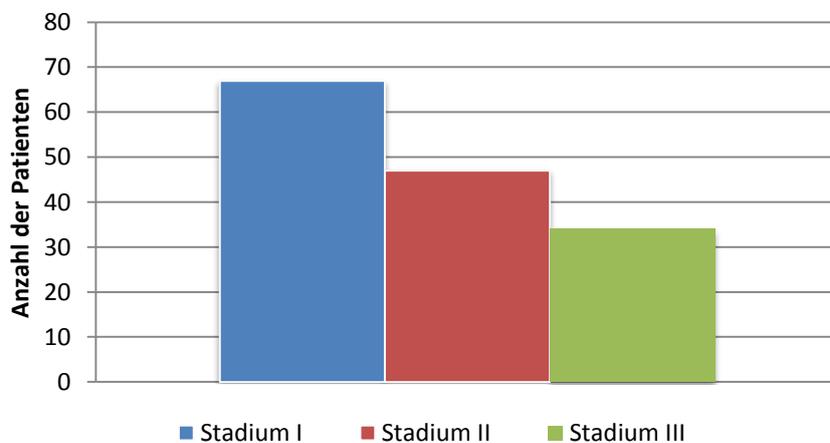


Abbildung 10: Verteilung der 151 Patienten mit einem Multiplen Myelom (Universitätsklinik Ulm, 1998 - 2010) in das entsprechende Stadium nach der International Staging System Stadieneinteilung

3.1.4 Klinischer Verlauf

Um den klinischen Verlauf der Krankheit zu analysieren wurde untersucht, ob die Patienten im Krankheitsverlauf ein Event (Rezidiv, Progress, Tod) erlitten und ob die Patienten verstarben. Bei verstorbenen Patienten wurde nach dem Sterbedatum und der zum Tode führenden Ursache geschaut. Zusätzlich wurde die mittlere Gesamtüberlebenszeit und die ereignisfreie Überlebenszeit des gesamten Patientenkollektivs bestimmt und in Kaplan-Meier-Kurven dargestellt.

Die mediane Beobachtungszeit des Patientenkollektivs beginnend mit dem Zeitpunkt der Erstdiagnose eines MM, die zwischen 1998 und 2010 gestellt wurde, bis zum Tod des Patienten beziehungsweise bis zum Zeitpunkt des letzten Patientenkontaktes betrug 1380 Tage (3,8 Jahre). 74 Patienten (49%) lebten bei der letzten Prüfung des Vital-Status im Mai 2014 noch, während 51% (77 Patienten) inzwischen verstorben waren oder im Laufe der Datenauswertung verstarben. Die meisten Patienten (70,1%; 54 Patienten) starben aufgrund ihres Tumors. Bei zehn der verstorbenen Patienten stand das Versterben im Zusammenhang mit der Therapie. Dabei wurden sechs dieser Patienten mit einer Double Hochdosistherapie behandelt und die restlichen vier Patienten mit einer Single Hochdosistherapie. Bei vier Patienten führte eine andere Ursache zum Tode. Ein Patient verstarb an den Folgen einer Bypass-Operation. Die anderen drei Patienten verstarben an einem Infekt, der nicht direkt tumor- oder therapieassoziiert war. Bei neun der verstorbenen Patienten war es anhand der bestehenden Informationen nicht möglich die genaue Todesursache zu ermitteln. Die Gesamtüberlebenszeit lag bei unserem Patientenkollektiv im Median bei 81,9 Monaten und ist in der Abbildung 11 dargestellt. Im Laufe ihrer Erkrankung erlitten 75,5% der Patienten (114 Patienten) ein Event. Dabei hatten 76 Patienten (66,7%) einen Progress, während 25 Patienten (21,9%) ein Rezidiv bekamen. Die ereignisfreie Überlebenszeit, die bei unserem Patientenkollektiv im Median bei 36 Monaten lag, ist in der Abbildung 12 dargestellt.

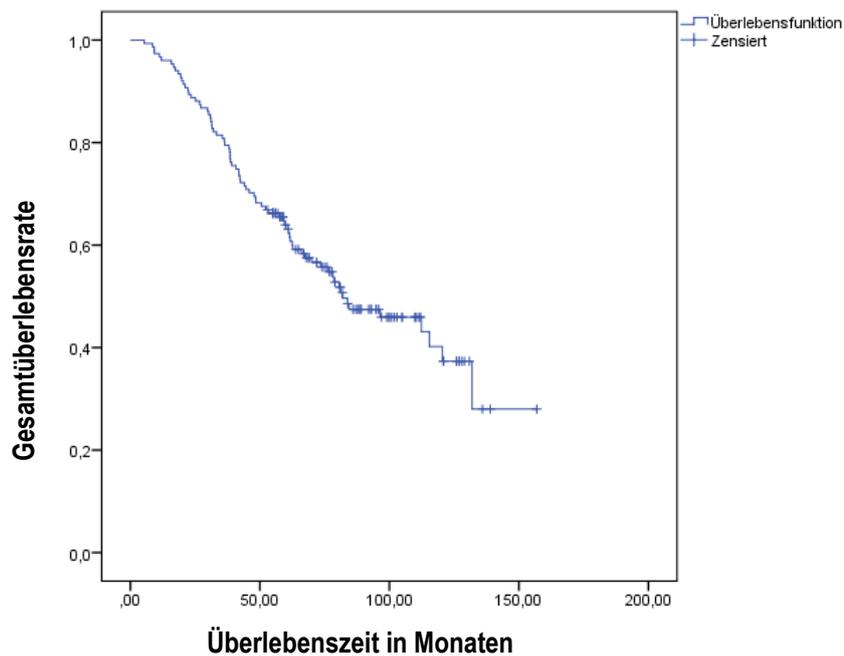


Abbildung 11: Kaplan-Meier-Kurve für das Gesamtüberleben des gesamten Studienkollektivs (151 Patienten mit einem Multiplen Myelom, Universitätsklinik Ulm, 1998 - 2010). Auf der x-Achse ist die Überlebenszeit in Monaten, auf der y-Achse die Gesamtüberlebensrate aufgetragen.

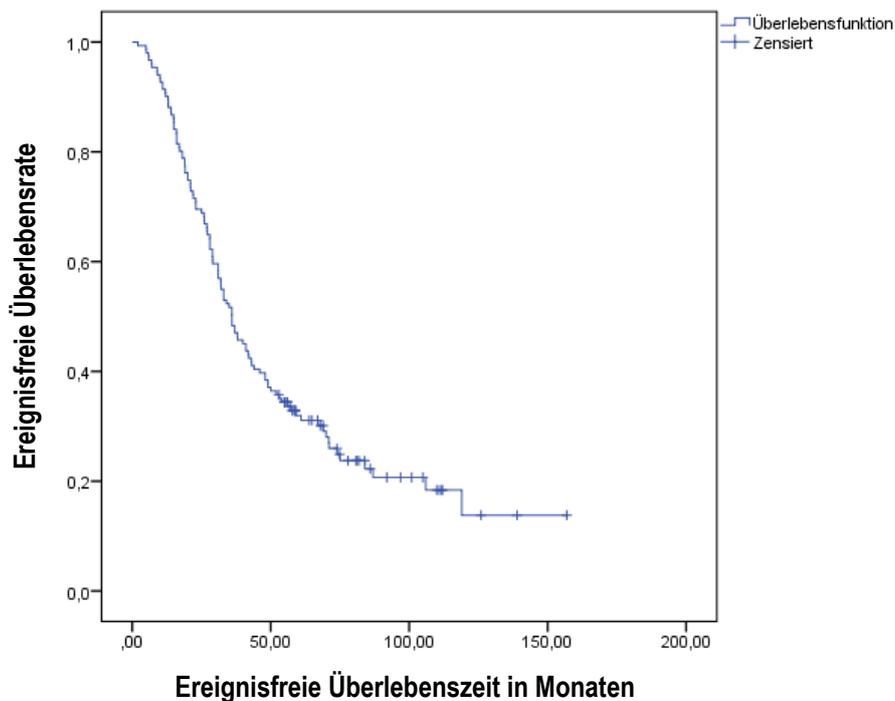


Abbildung 12: Kaplan-Meier-Kurve für das ereignisfreie Überleben des gesamten Studienkollektivs (151 Patienten mit einem Multiplen Myelom, Universitätsklinik Ulm, 1998 - 2010). Auf der x-Achse ist die ereignisfreie Überlebenszeit in Monaten, auf der y-Achse die ereignisfreie Überlebensrate aufgetragen.

3.2 Laborparameter

Tabelle 3: Übersicht der ausgewerteten Laborwerte der 151 Patienten mit einem Multiplen Myelom (Universitätsklinik Ulm, 1998 - 2010)

dl: Deziliter; G: Giga; g: Gramm; l: Liter; mg: Milligramm; μ mol: Mikromol; U: Unit

Laborwert	Median	Minimum	Maximum	Referenzbereich
Leukozyten	5,6 G/l	0,9 G/l	35,9 G/l	4,4 - 11,3 G/l
Thrombozyten	245 G/l	24 G/l	603 G/l	150 - 450 G/l
Hämoglobin	11,1 g/dl	6,5 g/dl	15,7 g/dl	♂ 14 - 17,4 g/dl ♀ 12 - 15,3 g/dl
Kalzium	2,27 μ mol/l	1,79 μ mol/l	3,49 μ mol/l	2,2 - 3,6 μ mol/l
Laktatdehydrogenase	177 U/l	67 U/l	1771 U/l	< 250 U/l
Albumin im Serum	41 g/l	3,5 g/l	66,9 g/l	35 - 53 g/l
β_2 -Mikroglobulin	3,57 mg/l	0,89 mg/l	57,3 mg/l	0,00 - 3,00 mg/l
Kreatinin	93 μ mol/l	38 μ mol/l	1570 μ mol/l	62 - 106 μ mol/l

3.2.1 Leukozyten, Thrombozyten und Hämoglobin

Die Leukozytenwerte lagen bei Diagnosestellung zwischen 0,9 Giga/Liter (G/l) und 35,9 G/l. Der mittlere Leukozytenwert lag bei 5,6 G/l. Leukozytenwerte, die sich unter dem laborspezifischen Normalwert befanden, wurden bei 35 Patienten (23,2%) gefunden. Der kleinste gemessene Thrombozytenwert betrug 24 G/l und der höchste 603 G/l. Der Median lag bei 245 G/l. 20 Patienten (13,2%) hatten eine Thrombozytopenie, das heißt, dass der Thrombozytenwert unter 150 G/l lag. Die gemessenen Hb-Werte reichten von 6,5 mg/dl bis 15,7 mg/dl. Der mittlere gemessene Hb-Wert der untersuchten Patienten lag bei 11,1 mg/dl. Eine Anämie, definiert als Hb-Wert < 14 g/dl bei Männern und bei Frauen < 12 g/dl, hatten 74,1% der Patienten. Insgesamt hatten 97 Patienten des Kollektivs einen Hb-Wert unter 12 mg/dl.

3.2.2 Kalzium, Albumin und Kreatin

Die mittlere Kalziumkonzentration der Patienten lag bei 2,27 Mikromol/Liter (μ mol/l). Die Werte variierten von 1,79 μ mol/l bis 3,49 μ mol/l. Die gemessenen Albumin Werte reichten von 3,5 g/l bis 66,9 g/l. Der Median betrug hierbei 41 g/l. Der maximal gemessene Kreatinwert betrug 1570 μ mol/l und der niedrigste Wert lag bei 38 μ mol/l. Der Median des Patientenkollektivs betrug 93 μ mol/l. Erhöhte Werte des Kreatin konnte man bei 50 Patienten nachweisen.

3.2.3 LDH und β_2 -Mikroglobulin

Die Werte der LDH hatten eine große Breite. Die Patienten hatten Werte von 67 Unit/Liter (U/l) bis 1771 U/l. Der Median betrug 177 U/l. Bei 22 Patienten wurde eine LDH > 250 U/l gemessen. Die Werte des β_2 -MG variierten zwischen 0,89 mg/l und 57,3 mg/l. Der Durchschnittswert lag bei 3,57 mg/l. 92 Patienten (60,9%) hatten ein β_2 -MG Wert von > 3,00 mg/l und lag damit über dem Normwert.

3.3 Genetik

3.3.1 Analyse der Mutation p.L265P im *MYD88*-Gen

Bei der Auswertung der Sanger Sequenzierungs basierten molekulargenetischen Analyse des Exon 5 des *MYD88*-Gens auf Chromosom 3p22 konnte bei keinem der 151 untersuchten MM Patienten unseres Patientenkollektivs die somatische Mutation p.L265P gefunden werden.

3.3.2 Verteilung und Inzidenz der chromosomalen Aberrationen

Von allen 151 Patienten stand Material zur molekular zytogenetischen Diagnostik zur Verfügung. Mittels einer FISH Analyse konnten alle Patienten auf bestimmte chromosomale Aberrationen hin untersucht werden. Bei 55 Patienten war zu wenig KM vorhanden, um alle sieben chromosomalen Veränderungen (+9q34; +1q21; t(4;14); t(11;14); t(14;16); del17p13 und del13q14) zu untersuchen. Somit beziehen sich die folgenden Angaben auf die 96 Patienten (63,5%), bei denen nach allen sieben Veränderungen geschaut werden konnte und ein vollständiger Datensatz vorhanden war, während sich die Inzidenzen der einzelnen chromosomalen Aberrationen auf die Patientenanzahl bezieht, bei der die jeweilige Aberration untersucht wurde.

Bei sechs der 96 Patienten mit vollständigem Datensatz (6,2%) war keine der untersuchten chromosomalen Regionen aberrant. Somit wiesen 93,8% der Patienten mindestens eine chromosomale Veränderung auf. Am häufigsten (bei 36 Patienten; 37,5%) wurde genau eine chromosomale Veränderung festgestellt. Aberrationen auf zwei chromosomalen Loci hatten 26 Patienten (27,1%) und auch Veränderungen von drei chromosomalen Loci wurde bei 23 Patienten (24%) nachgewiesen. Vier chromosomale Veränderungen konnten bei fünf Patienten (5,2%) gefunden werden. Mehr als vier Veränderungen der sieben untersuchten chromosomalen Loci wies keiner der Patienten auf.

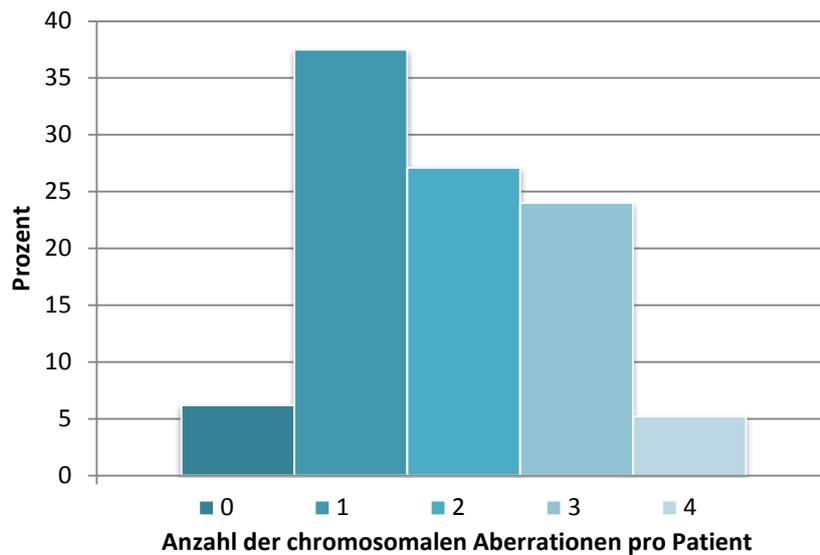


Abbildung 13: Anzahl der chromosomalen Aberrationen pro Patient. Die Zahlen beziehen sich auf die 96 Patienten mit einem Multiplen Myeom (Universitätsklinik Ulm, 1998 - 2010), bei denen alle sieben chromosomalen Aberrationen untersucht wurden.

Von den sieben untersuchten chromosomalen Veränderungen wurden am häufigsten ein Zugewinn (+) auf der chromosomalen Bande 9q34 gefunden. Diese +9q34 konnte man bei 50,8% der Patienten (n=63/124) detektieren. Als zweithäufigste Chromosomenaberration konnte bei 67 der 151 Patienten (44,4%) eine del13q14 gefunden werden. Die weiteren Inzidenzen der untersuchten chromosomalen Veränderungen sind in der Tabelle 4 in absteigender Reihenfolge aufgelistet.

Tabelle 4: Inzidenz der untersuchten chromosomalen Veränderungen mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH). Die Angabe der Inzidenz in Prozent bezieht sich auf die Anzahl der Patienten mit einem Multiplen Myelom (Universitätsklinik Ulm, 1998 - 2010), bei denen die jeweilige chromosomale Aberration untersucht wurde.

del: Deletion; +: Zugewinn; t: Translokation

Chromosomale Aberrationen (FISH)	Inzidenz
+9q34	50,8% (n = 63/124)
del13q14	44,4% (n = 67/151)
+1q21	28,6% (n = 36/126)
t(4;14)	20,0% (n = 30/150)
t(11;14)	19,4% (n = 27/139)
del17p13	6,7% (n = 10/150)
t(14;16)	2,5% (n = 3/120)

+9q34

Insgesamt wurden KM Proben von 124 Patienten auf eine Veränderung auf 9q34 untersucht. Bei 64 Patienten konnte eine Aberration festgestellt werden. Somit war eine Veränderung auf dieser Bande mit einer Inzidenz von 51,6% am häufigsten. Dabei wurde bei einem Patienten eine Deletion festgestellt, während die restlichen 63 Patienten Zugewinne hatten. Hierbei handelte es sich bei 52 Patienten (81,3%) um eine Trisomie und bei den restlichen 11 Patienten (17,2%) um eine Tetrasomie.

del13q14

Alle 151 Patienten wurden auf eine Veränderung der chromosomalen Bande 13q14 untersucht. Eine Deletion lag bei 67 Patienten (44,4%) vor und war somit die zweithäufigste Aberration in dem Patientenkollektiv. Zugewinne von 13q14 konnte in keiner der Proben gefunden werden.

+1q21

Insgesamt wurden 126 Patientenproben auf Aberrationen der chromosomalen Bande 1q21 untersucht. Die Analyse ergab, dass bei 37 Patienten (29,4%) eine Veränderung vorlag. Bei einem Patienten konnte eine Deletion festgestellt werden und bei 36 Patienten ein Zugewinn. Hierbei handelte es sich bei 31 Patienten um einen triploiden Chromosomensatz und bei den restlichen fünf Patienten um eine Tetrasomie.

t(4;14)

Bei einem Patienten war nicht genügend KM zu Verfügung, sodass insgesamt bei 150 Patienten die Proben auf eine Translokation *t(4;14)* untersucht wurden. Bei 30 Patienten konnte diese Translokation nachgewiesen werden. Somit lag bei 20% der untersuchten Patienten diese Translokation vor.

t(11;14)

Insgesamt wurde bei 139 Patienten die aufgearbeitete KM Probe auf eine Translokation *t(11;14)* hin geprüft. Bei 27 der Patienten konnte diese festgestellt werden. Somit lag die Inzidenz der *t(11;14)* bei 19,4%.

del17p13

Von 150 Patienten wurden die Proben auf Veränderungen des kurzen Arms des Chromosoms 17 untersucht. Die Analyse ergab, dass bei 18 Patienten (12%) eine Veränderung vorlag. Hierbei konnte bei 10 (6,7%) Patienten eine Deletion gefunden werden, während die restlichen 8 Patienten einen Zugewinn in Form eines triploiden Chromosomensatzes zeigten.

t(14;16)

Insgesamt wurden 120 Patientenproben auf eine vorliegende Translokation *t(14;16)* untersucht. Diese war mit einer Inzidenz von 2,5% die am seltensten auftretende chromosomale Veränderung und wurde nur bei drei der untersuchten Patienten gefunden.

3.3.3 Ereignisfreies- und Gesamtüberleben in Bezug auf chromosomale Veränderungen

Um das Patientenkollektiv noch genauer zu analysieren wurde sowohl das ereignisfreie Überleben als auch das Gesamtüberleben in Abhängigkeit der unterschiedlichen genetischen Aberrationen mittels Kaplan Meier Analysen dargestellt (Abbildungen 14-27).

3.3.3.1 Ereignisfreies Überleben

Patienten, die einen Zugewinn im 9q34 Locus aufweisen, hatten ein signifikant längeres ($p=0,04$) ereignisfreies Überleben. Bei allen anderen Mutationen kann beim Vorhandensein einer Aberration oder Translokation mit einem durchschnittlich früheren Auftreten eines Events gerechnet werden. Das kürzeste mediane ereignisfreie Überleben wiesen Patienten mit Nachweis einer *t(14;16)* auf (im Median 16 Monate früher). Ebenfalls war der Nachweis einer *del17p13* sowie einer *t(4;14)* mit einem signifikant kürzeren ereignisfreien Überleben assoziiert. Tabelle 5 gibt einen Überblick über die Medianwerte und den Unterschied der durchschnittlichen Zeit des ereignisfreien Überlebens je nach chromosomaler Veränderung.

Tabelle 5: Prognostische Signifikanz auf das ereignisfreie Überleben (Mediane Überlebenszeit in Monaten) der Patienten mit einem Multiplem Myelom (Universitätsklinik Ulm, 1998 - 2010) und der jeweiligen chromosomalen Veränderung, die mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) untersucht wurden.

+: Zugewinn; del: Deletion; t: Translokation

Chromosomale Aberrationen (FISH)	Medianwert des ereignisfreien Überlebens mit vorhandener Aberration im Vergleich zum Medianwert des ereignisfreien Überlebens ohne vorhandene Aberration	Signifikanzwert p
+9q34	40 Monate versus 31 Monate	0,04
del13q14	33 Monate versus 41 Monate	0,06
+1q21	29 Monate versus 36 Monate	0,36
<i>t(4;14)</i>	29 Monate versus 41 Monate	0,004
<i>t(11;14)</i>	33 Monate versus 36 Monate	0,16
del17p13	21,3 Monate versus 36,8 Monate	0,009
<i>t(14;16)</i>	20 Monate versus 36 Monate	0,01

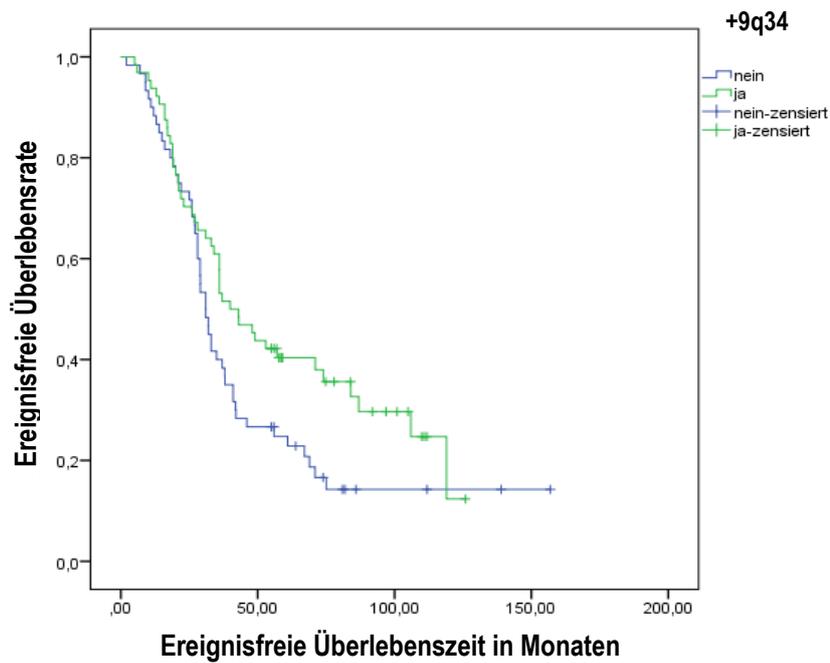


Abbildung 14: Kaplan-Meier-Kurve für das ereignisfreie Überleben von 124 Patienten mit einem Multiplen Myelom (Universitätsklinik Ulm, 1998 - 2010) in Abhängigkeit eines Zugewinns (+) auf 9q34. Auf der x-Achse ist die ereignisfreie Überlebenszeit in Monaten, auf der y-Achse die ereignisfreie Überlebensrate aufgetragen.

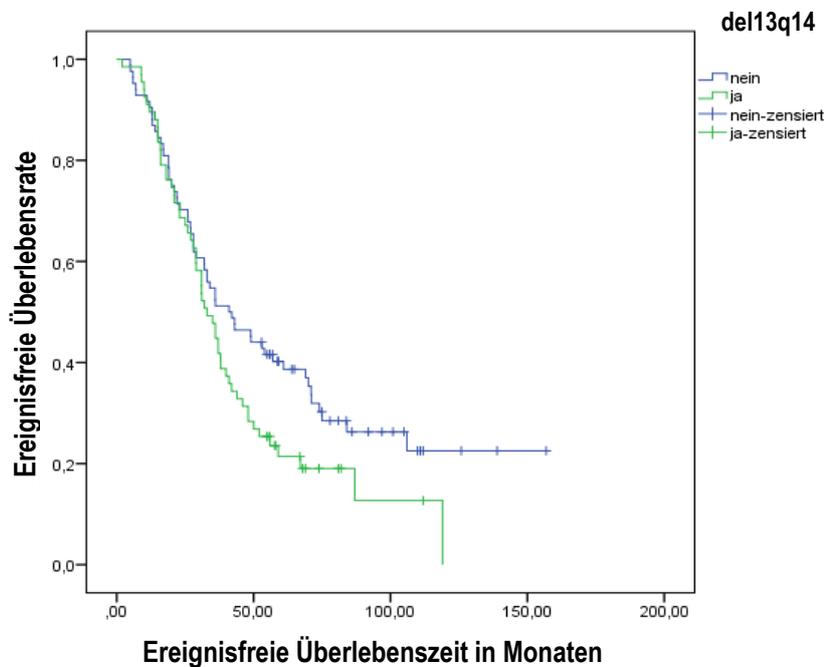


Abbildung 15: Kaplan-Meier-Kurve für das ereignisfreie Überleben von 151 Patienten mit einem Multiplen Myelom (Universitätsklinik Ulm, 1998 - 2010) in Abhängigkeit einer Deletion (del) 13q14. Auf der x-Achse ist die ereignisfreie Überlebenszeit in Monaten, auf der y-Achse die ereignisfreie Überlebensrate aufgetragen.

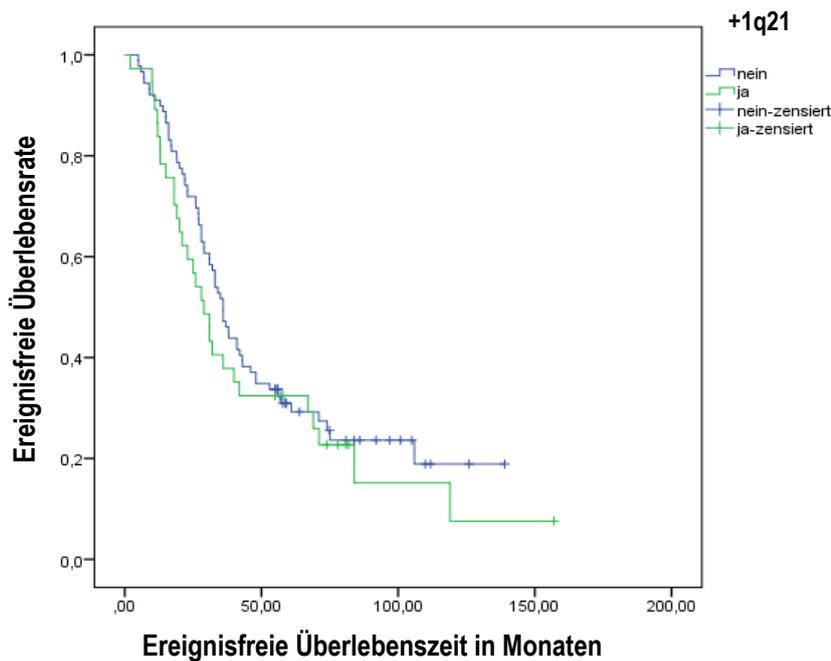


Abbildung 16: Kaplan-Meier-Kurve für das ereignisfreie Überleben von 126 Patienten mit einem Multiplen Myelom (Universitätsklinik Ulm, 1998-2010) in Abhängigkeit eines Zugewinns (+) auf 1q21. Auf der x-Achse ist die ereignisfreie Überlebenszeit in Monaten, auf der y-Achse die ereignisfreie Überlebensrate aufgetragen.

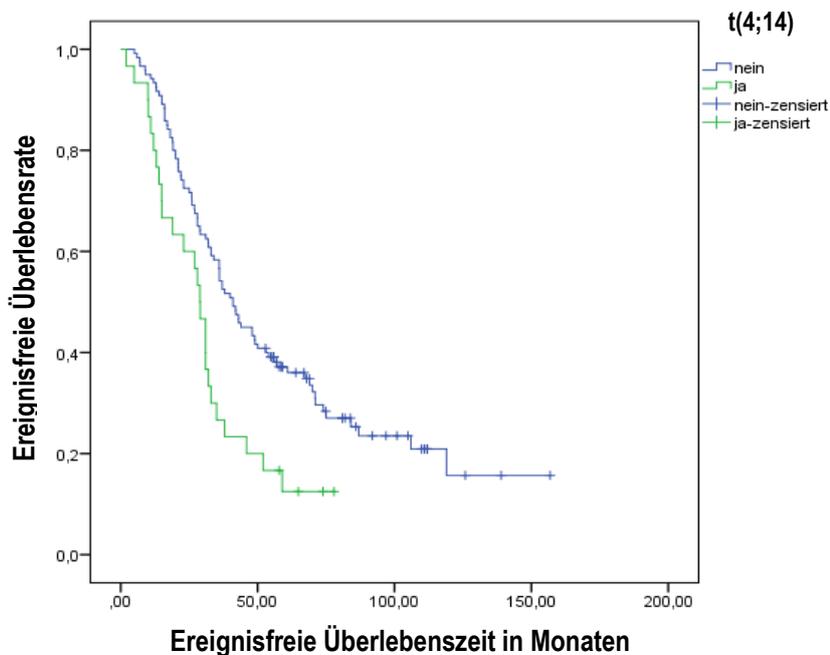


Abbildung 17: Kaplan-Meier-Kurve für das ereignisfreie Überleben von 150 Patienten mit einem Multiplen Myelom (Universitätsklinik Ulm, 1998 - 2010) in Abhängigkeit einer Translokation t(4;14). Auf der x-Achse ist die ereignisfreie Überlebenszeit in Monaten, auf der y-Achse die ereignisfreie Überlebensrate aufgetragen.

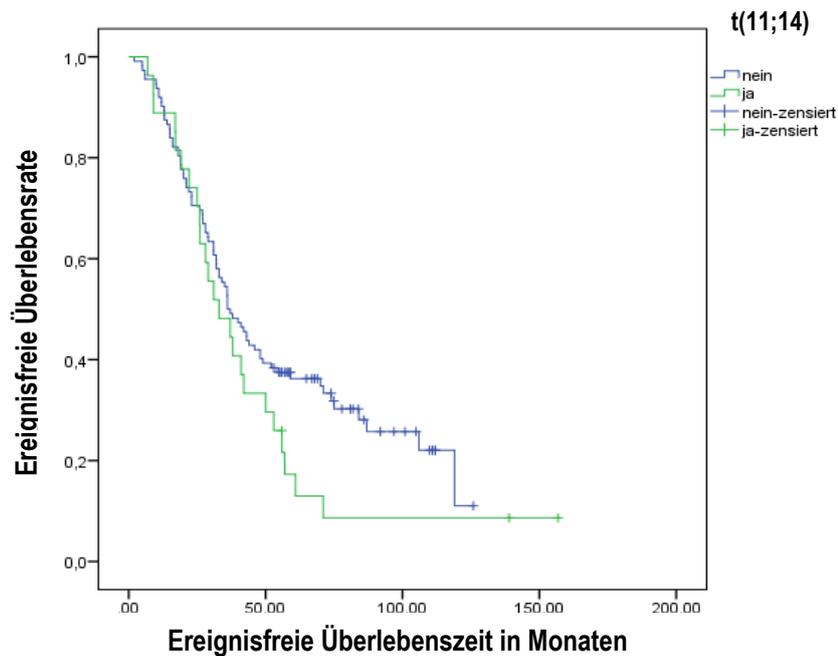


Abbildung 18: Kaplan-Meier-Kurve für das ereignisfreie Überleben von 139 Patienten mit einem Multiplen Myelom (Universitätsklinik Ulm, 1998 - 2010) in Abhängigkeit einer Translokation $t(11;14)$. Auf der x-Achse ist die ereignisfreie Überlebenszeit in Monaten, auf der y-Achse die ereignisfreie Überlebensrate aufgetragen.

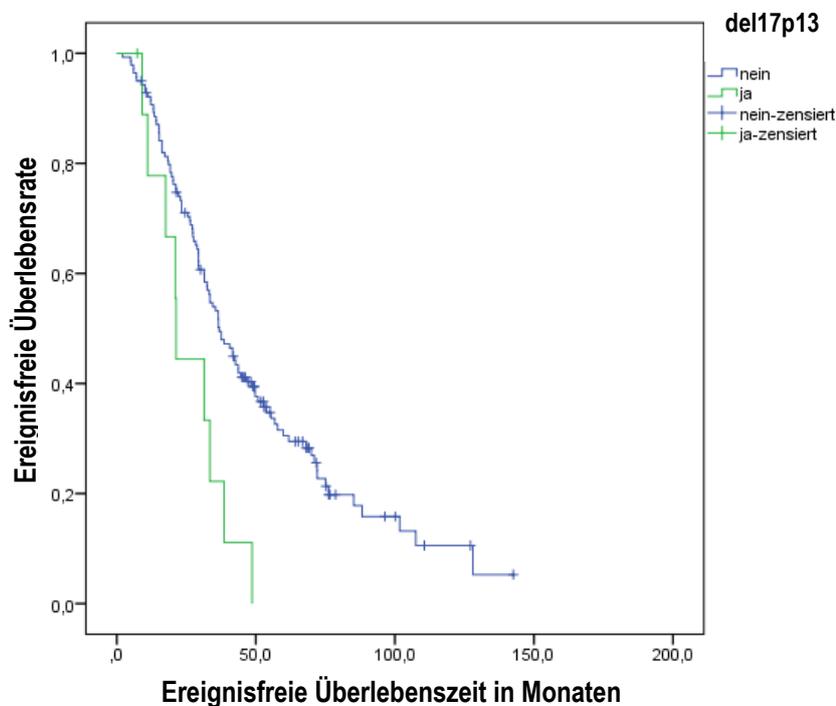


Abbildung 19: Kaplan-Meier-Kurve für das ereignisfreie Überleben von 150 Patienten mit einem Multiplen Myelom (Universitätsklinik Ulm, 1998 - 2010) in Abhängigkeit einer Deletion (del) 17q13. Auf der x-Achse ist die ereignisfreie Überlebenszeit in Monaten, auf der y-Achse die ereignisfreie Überlebensrate aufgetragen.

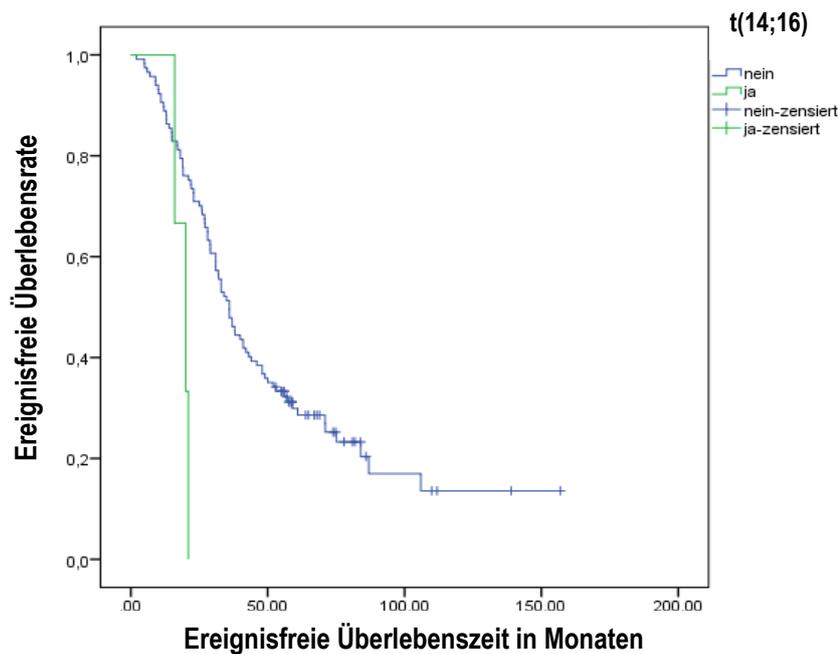


Abbildung 20: Kaplan-Meier-Kurve für das ereignisfreie Überleben von 120 Patienten mit einem Multiplen Myelom (Universitätsklinik Ulm, 1998 - 2010) in Abhängigkeit einer Translokation $t(14;16)$. Auf der x-Achse ist die ereignisfreie Überlebenszeit in Monaten, auf der y-Achse die ereignisfreie Überlebensrate aufgetragen.

3.3.3.2 Gesamtüberleben

Patienten mit Nachweis eines Zugewinns auf 9q34 wiesen ein längeres medianes Gesamtüberleben auf, welches jedoch nicht das statistische Signifikanzniveau erreichte. Mit einem statistisch signifikant kürzeren Überleben verbunden waren das Vorhandensein einer $t(4;14)$ und $t(14;16)$ und die einer $del17p13$. Tabelle 6 gibt einen Überblick über die Medianwerte des Gesamtüberlebens der Patienten.

Tabelle 6: Prognostische Signifikanz auf das Gesamtüberleben (Mediane Überlebenszeit in Monaten) der Patienten mit einem Multiplen Myelom (Universitätsklinik Ulm, 1998 - 2010) und der jeweiligen chromosomalen Veränderung, die mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) untersucht wurden.

+: Zugewinn; del: Deletion; t: Translokation

Chromosomale Aberrationen (FISH)	Medianwert des Gesamtüberleben mit vorhandener Aberration im Vergleich zum Medianwert des Gesamtüberleben ohne vorhandene Aberration	Signifikanzwert p
+9q34	112,4 Monate versus 73,4 Monate	0,19
del13q14	62,8 Monate versus 115,4 Monate	0,02
+1q21	61,7 Monate versus 81,1 Monate	0,2
t(4;14)	44 Monate versus 112,4 Monate	0,003
t(11;14)	81,1 Monate versus 83,8 Monate	0,7
del17p13	32,4 Monate versus 81,8 Monate	< 0,001
t(14;16)	33,3 Monate versus 80,6 Monate	0,03

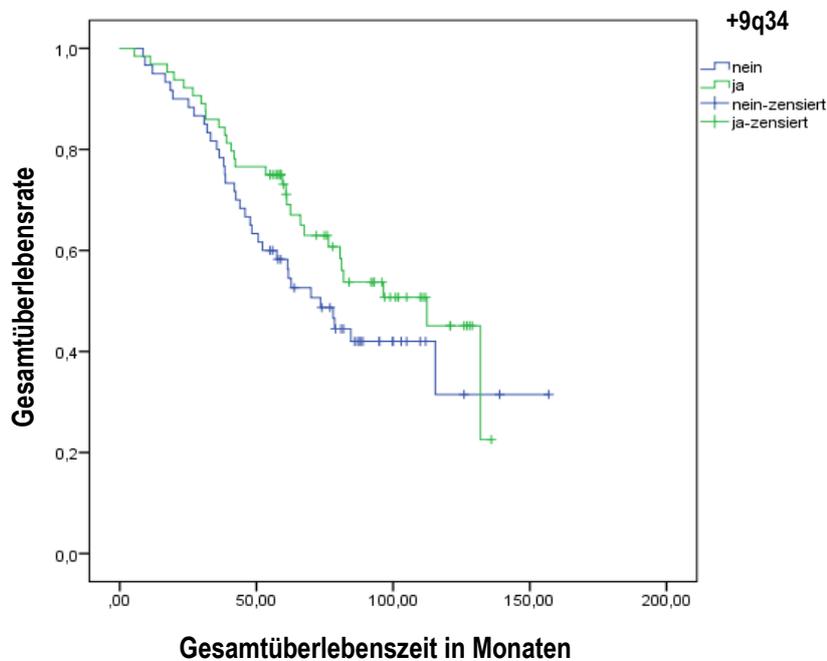


Abbildung 21: Kaplan-Meier-Kurve für das Gesamtüberleben von 124 Patienten mit einem Multiplen Myelom (Universitätsklinik Ulm, 1998 - 2010) in Abhängigkeit eines Zugewinns (+) auf 9q34. Auf der x-Achse ist die Gesamtüberlebenszeit in Monaten, auf der y-Achse die Gesamtüberlebensrate aufgetragen.

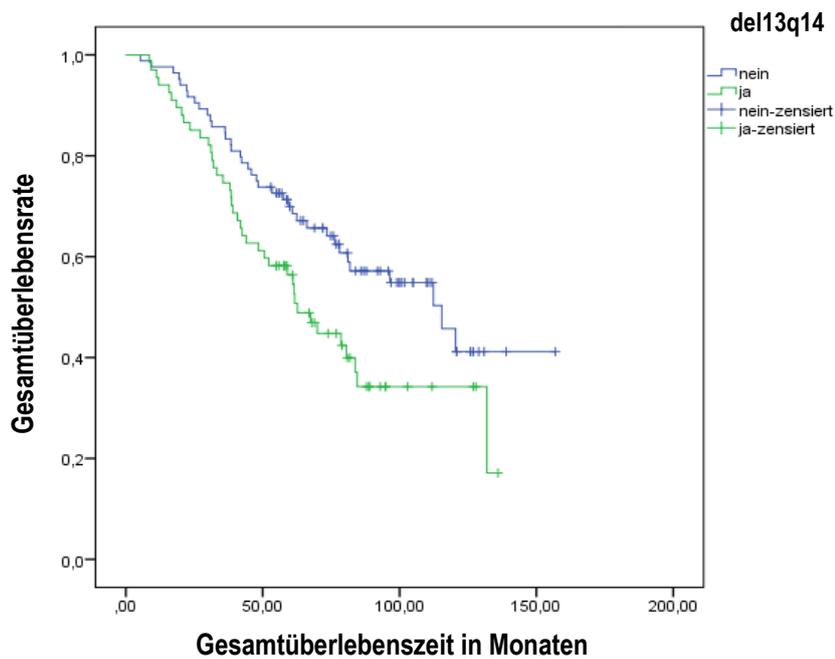


Abbildung 22: Kaplan-Meier-Kurve für das Gesamtüberleben von 151 Patienten mit einem Multiplen Myelom (Universitätsklinik Ulm, 1998 - 2010) in Abhängigkeit einer Deletion (del) 13q14. Auf der x-Achse ist die Gesamtüberlebenszeit in Monaten, auf der y-Achse die Gesamtüberlebensrate aufgetragen.

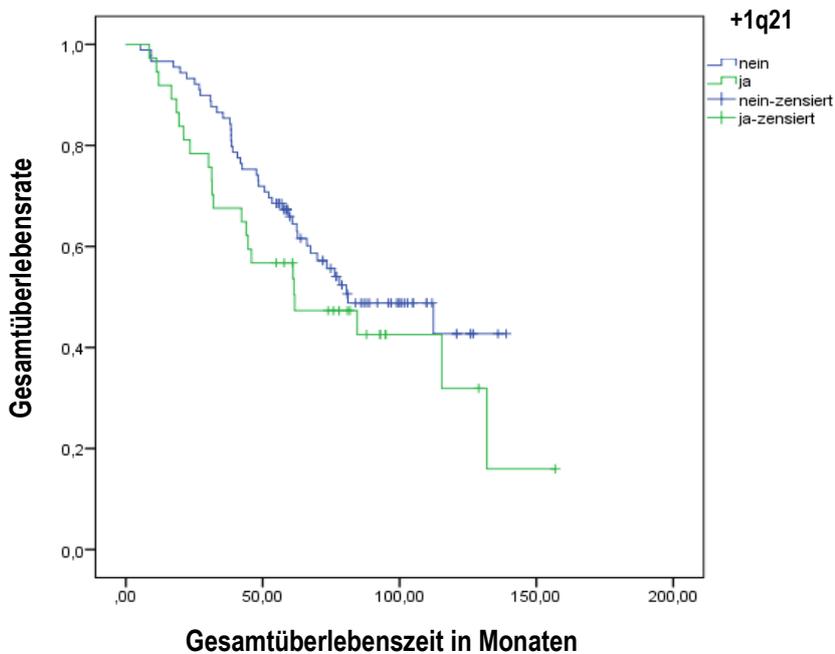


Abbildung 23: Kaplan-Meier-Kurve für das Gesamtüberleben von 126 Patienten mit einem Multiplen Myelom (Universitätsklinik Ulm, 1998 - 2010) in Abhängigkeit eines Zugewinns (+) auf 1q21. Auf der x-Achse ist die Gesamtüberlebenszeit in Monaten, auf der y-Achse die Gesamtüberlebensrate aufgetragen.

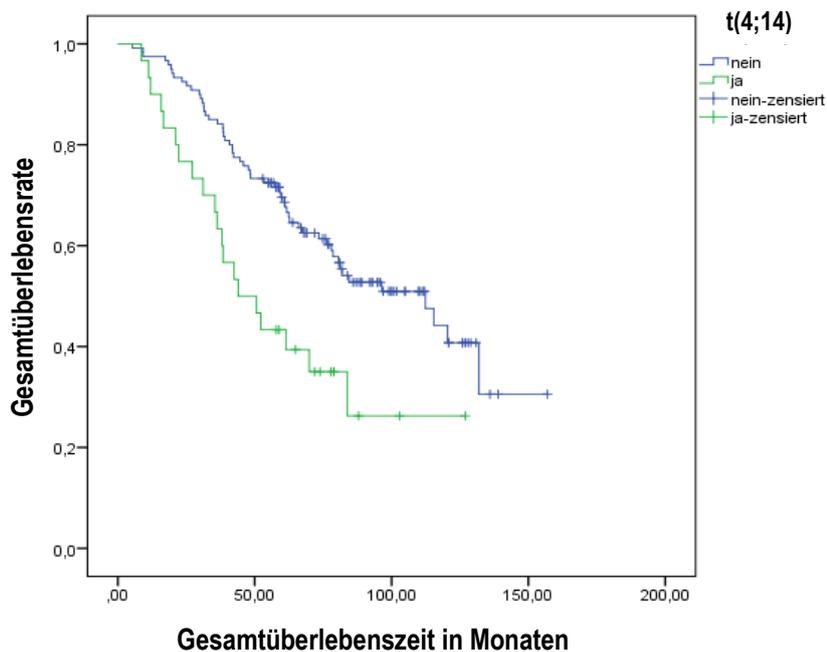


Abbildung 24: Kaplan-Meier-Kurve für das Gesamtüberleben von 150 Patienten mit einem Multiplen Myelom (Universitätsklinik Ulm, 1998 - 2010) in Abhängigkeit einer Translokation $t(4;14)$. Auf der x-Achse ist die Gesamtüberlebenszeit in Monaten, auf der y-Achse die Gesamtüberlebensrate aufgetragen.

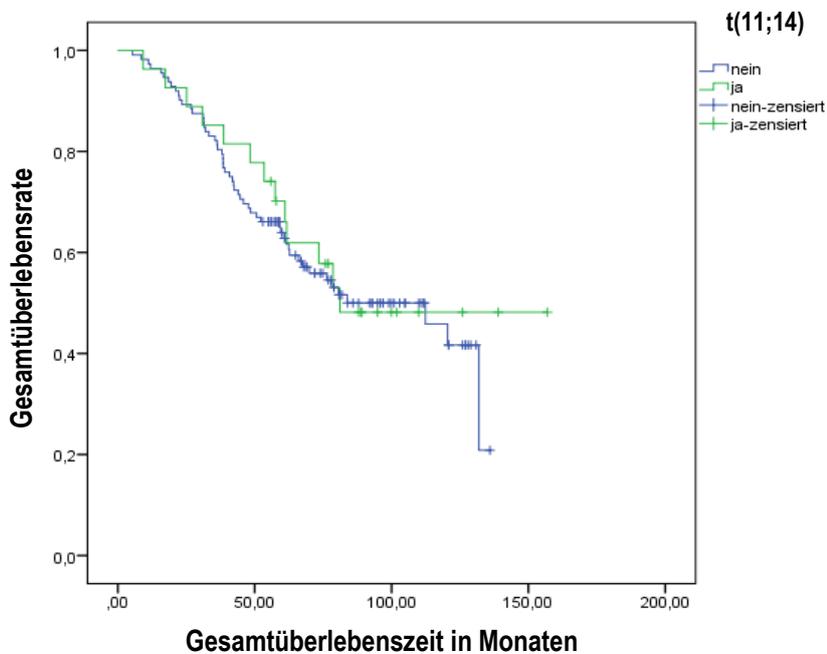


Abbildung 25: Kaplan-Meier-Kurve für das Gesamtüberleben von 139 Patienten mit einem Multiplen Myelom (Universitätsklinik Ulm, 1998 - 2010) in Abhängigkeit einer Translokation $t(11;14)$. Auf der x-Achse ist die Gesamtüberlebenszeit in Monaten, auf der y-Achse die Gesamtüberlebensrate aufgetragen.

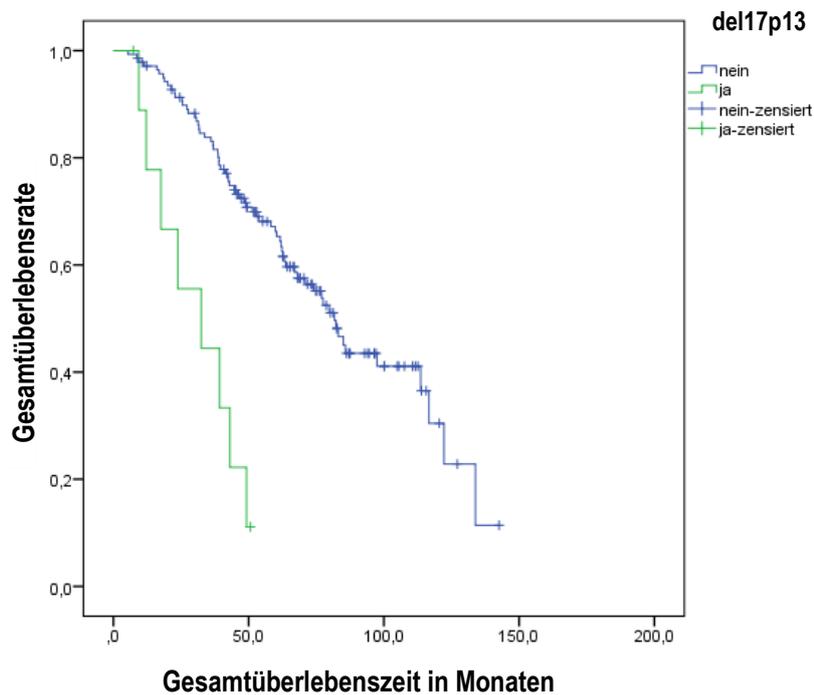


Abbildung 26: Kaplan-Meier-Kurve für das Gesamtüberleben von 150 Patienten mit einem Multiplen Myelom (Universitätsklinik Ulm, 1998 - 2010) in Abhängigkeit einer Deletion (del) 17p13. Auf der x-Achse ist die Gesamtüberlebenszeit in Monaten, auf der y-Achse die Gesamtüberlebensrate aufgetragen.

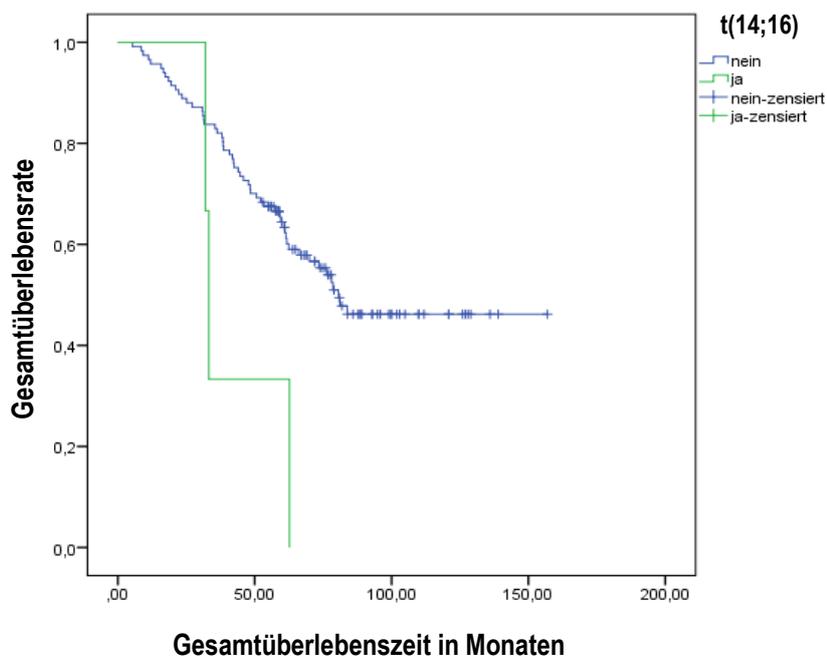


Abbildung 27: Kaplan-Meier-Kurve für das Gesamtüberleben von 120 Patienten mit einem Multiplen Myelom (Universitätsklinik Ulm, 1998 - 2010) in Abhängigkeit einer Translokation $t(14;16)$. Auf der x-Achse ist die Gesamtüberlebenszeit in Monaten, auf der y-Achse die Gesamtüberlebensrate aufgetragen.

4 Diskussion

4.1 Die Mutation p.L265P im *MYD88*-Gen beim Multiplen Myelom

In den vergangenen Jahren konnten rekurrente somatische Mutationen in Signalwegen lymphatischer Zellen als diagnostische, prognostische aber auch prädiktive Parameter für B-Zell Neoplasien identifiziert werden. In einer Studie von Ngo et al. 2011 wurde bei 29% der 174 Patienten mit einem DLBCL vom ABC Subtyp die Punktmutation p.L265P im *MYD88*-Gen gefunden. Da sowohl in der Pathogenese des ABC Typ des DLBCL als auch des MM die Deregulation des NF- κ B Signalwegs eine bedeutende Rolle spielt, sollte im Rahmen dieser Arbeit geprüft werden, inwieweit die somatische Mutation p.L265P im *MYD88*-Gen auch in der Pathogenese des MM eine Rolle zukommt [85]. Untersucht wurde die aus KM gewonnene DNA von 151 Patienten mit neu diagnostiziertem MM, die alle eine Standardinduktionstherapie und mindestens eine Hochdosistherapie erhalten hatten. Als Methode der molekulargenetischen Mutationsanalyse des *MYD88*-Gens wurde die Sanger Sequenzierung verwendet. Die ausgewerteten klinischen Daten zeigten eine typische Verteilung in der Zusammensetzung des Kollektivs hinsichtlich des Geschlechts, der Paraproteinverteilung, als auch der klinischen Charakteristika und der zytogenetischen Aberrationen, die sich als prognostisch bedeutsam erwiesen. Zusammengefasst hatten wir damit ein Kollektiv von 151 MM Patienten, die repräsentativ geeignet waren, bislang unbekannte Mutationen des MM zu untersuchen. Bei den 151 Patienten unseres Patientenkollektivs konnte bei keinem die Mutation p.L265P im *MYD88*-Gen mittels Sanger Sequenzierung gefunden werden. Unser Ergebnis wurde durch weitere Studienergebnisse bestätigt. In einigen anderen Studien, in denen zwischen 10 und 38 MM Patienten auf die Mutation p.L265P im *MYD88*-Gen untersucht wurden, zeigte keiner der Patienten diese Mutation [53, 54, 81, 115, 127]. Das *MYD88*-Gen kann den NF- κ B Signalweg zwar aktivieren [77] und in vielen hämatopoetischen Neoplasien, unter anderem auch im MM, ist die Aktivierung des NF- κ B Signalweg ein wichtiger Bestandteil der Pathogenese, jedoch legen die gefundenen Ergebnisse nahe, dass die Aktivierung des NF- κ B Signalweges in der Pathogenese des MM nicht auf die Mutation p.L265P im *MYD88*-Gen zurückzuführen ist [53, 99].

4.2 Verwendete Methoden

Die DNA Proben unseres Patientenkollektivs, die aus Plasmazellen des Knochenmarks extrahiert wurden, untersuchten wir mittels Sanger Sequenzierung. Die Sanger Sequenzierung weist eine recht niedrige Sensitivität auf und benötigt mindestens 20-30% an mutierten Zellen in der Probe, um eine Mutation zu detektieren [54, 81]. Die beschriebenen Nachteile der Sanger Sequenzierung bedeutet eine Einschränkung für die Detektion der Mutation p.L265P im *MYD88*-Gen und mögliche Unterschätzung der Mutationsfrequenz [54, 67]. Treon et al. führten, unter anderem an zehn MM Patienten (davon zwei IgM MM), eine next-generation-sequencing (NGS) basierte Sequenzierung des gesamten Genoms, der sogenannten whole exome Sequenzierung (WGS) durch und konnten bei keinem dieser Patienten die Mutation p.L265P im *MYD88*-Gen nachweisen [115]. Weitere Studien, die die DNA von bis zu 177 MM Patienten mittels whole exome- und whole genome Sequenzierung analysierten, konnten ebenso bei keinem Patienten die Mutation p.L265P im *MYD88*-Gen detektieren [15, 19, 72]. Die identischen Ergebnisse anderer Studien mit unterschiedlich angewendeten Untersuchungsmethoden und einer ausreichenden Patientenzahl, machen einen methodischen Fehler unserer Studie daher relativ unwahrscheinlich.

Mori et al. untersuchten Morbus Waldenström (WM) Patienten mittels direkter Sequenzierung, Allel-spezifischer PCR (AS-PCR) und BSiE1-Restriktionsverdau, und verglich die Ergebnisse auf ihre Spezifität hin. Bei der AS-PCR verwendet man Primer, die so verändert sind, dass das Nukleotid am 3'Ende zur gesuchten Mutation komplementär ist. Dadurch erhöht man die Spezifität und es reichen niedrigere Level an mutierten Zellen aus um eine Mutation zu detektieren [10, 54, 116]. Bei der BSiE1 handelt es sich um eine Restriktionsendonuklease, die die Sequenz 5'-CGRY-CG-3' erkennt und bei Anwesenheit der Mutation die amplifizierten Produkte in zwei Teile schneidet [39]. Beim Vergleich der Ergebnisse fiel auf, dass die Mutation häufiger durch das Restriktionsenzym BSiE1 als durch die direkte Sequenzierung gefunden wurde (76% versus 28%), während sich die Ergebnisse zwischen der BSiE1 Aufspaltung und der AS-PCR kaum unterschieden (76% versus 72%). Damit sind die AS-PCR und die Restriktionsendonuklease BSiE1 mit 0,1 - 0,5% die sensitiveren Methoden [81]. Auch Wang et al. konnten in einer Studie mit 120 DLBCL Patienten die geringere Sensitivität der Sanger Sequenzierung gegenüber anderen Methoden, in diesem Fall gegenüber der hochauflösenden high resolution melting analysis (HRM-Analyse) zeigen. Bei der Schmelzkurvenanalyse (HRM-Analyse) handelt es sich um eine Methode, bei der Fluoreszenzfarbstoffe das Aufschmelzen der doppelsträngigen DNA sichtbar macht. Da die Schmelztemperaturen von der Basenabfolge abhängig ist, können durch Unterschiede der Schmelzkurven Sequenzvariationen (SNPs und Methylierungen) detektiert werden [117]. Dabei war

die Sensitivität der HRMA um 5% höher als die der Sanger Sequenzierung [120]. Dieses Ergebnis wurde von Poon et al. an WM Patienten bestätigt. Die HRMA Analyse ist eine vergleichsweise einfache und kostengünstige Methode mit einer hohen Sensitivität und Spezifität [93]. Die HRMA und auch die Allel-spezifische PCR scheinen eine gute Alternative als Routinediagnostik im klinischen Alltag zu sein, um Proben auf eine *MYD88* Mutation zu untersuchen [86, 93]. Eine noch weniger invasive und kostengünstige Methode hat die Arbeitsgruppe von Treon untersucht. Sie führten erfolgreich bei WM und IgM MGUS Patienten AS-PCRs mit Patientenproben durch, die nicht aus KM, sondern aus peripherem Blut (PB) stammen. Hier sind jedoch weitere Studien erforderlich um diese Ergebnisse zu bestätigen und die Mutationsanalyse aus PB als eine Routineuntersuchungsmethode zu etablieren [126].

4.3 Mutationen im *MYD88*-Gen in anderen hämatologischen Erkrankungen

Bislang konnten Mutationen im *MYD88*-Gen bei B-Zell lymphoplasmozytischen Neoplasien gefunden werden, die aus Post Keimzentrumszellen hervorgehen (ABC DLBCL, primäres-Zentralnervensystem Lymphom) und bei B-Zell lymphoplasmozytischen Neoplasien, die keinen IgH Isotypenswitch durchlaufen (IgM-MGUS und WM). Nicht präsent sind Mutationen des *MYD88*-Gens hingegen in B-Zell lymphoplasmozytischen Neoplasien, die von Prä-Keimzentrumszellen ausgehen (Akute Leukämie (AL)) und auch nicht in den B- Zell lymphoplasmozytischen Neoplasien, bei denen die Plasmazellen die Fähigkeit verloren haben einen IgH Isotypenswitch durchzuführen (Haarzelleukämie, IgA- und IgG-MGUS und MM) [54]. B-Zell Erkrankungen mit klinischen oder pathologischen Ähnlichkeiten zum ABC DLBCL wurden nach der Studie von Ngo et al. auf das Vorliegen einer Mutation im *MYD88*-Gen untersucht.

Eun Je, untersuchte 220 AL Patienten (davon 127 Patienten mit einer akuten myeloischen Leukämie (AML) und 93 mit einer akuten lymphoiden Leukämie (ALL)) auf somatische Mutationen im *MYD88*-Gen. Bereits die Namengebung (Myeloid differentiation response gene) weist auf seine Funktion in der myeloischen Differenzierung hin und auch die Pathogenese der AL ist mit der Aktivierung des NF- κ B Signalweges assoziiert. Allerdings wurde bei keinem der untersuchten Patienten eine Mutation gefunden. Dies macht es, wie beim MM, unwahrscheinlich, dass die NF- κ B Aktivierung bei der AL auf eine Mutation im *MYD88*-Gen zurück zu führen ist [53]. Weitere Neoplasien in denen eine Mutation im *MYD88*-Gen bislang nicht nachgewiesen wurde, sind das nodale Marginalzonen Lymphom (MZL) [39], die Haarzelleukämie und das Mantelzelllymphom [94]. Hämatopoetische Neoplasien, in denen die Mutation p.L265P im *MYD88*-Gen sporadisch gefunden wurde, sind das splenische MZL (2% - 6%) [39, 116, 127], das Mukosa-assoziierte lymphatische Gewebe (MALT)

Lymphom (7% - 9%) [39, 85], das folliculäre Lymphom (4%) [94] und das Burkitt Lymphom (5%) [85]. Bei der chronisch lymphatischen Leukämie (CLL) wurde die Mutation p.L265P im *MYD88*-Gen in 3% - 10% der Patienten gefunden [95, 121, 127]. Großzellige B-Zell Lymphome mit Post Keimzentrums Phänotyp in denen die Mutation auftritt, sind das primäre-Zentralnervensystem Lymphom mit 36% [79] und das primär kutane diffuse großzellige B-Zell Lymphom vom Bein-Typ mit 59 - 69% [91, 92].

4.3.1 Die Mutation p.L265P im *MYD88*-Gen beim Morbus Waldenström und der Monoklonalen Gammopathie unklarer Signifikanz vom Typ IgM

Treon et al. zeigten in einer Studie mittels WGS und Bestätigung durch Sanger Sequenzierung, dass die Mutation p.L265P im *MYD88*-Gen die häufigste rekurrente somatische Mutation bei Patienten mit einem WM darstellt. Der WM ist ein indolentes B-Zell Non-Hodgkin Lymphom vom kleinzelligen Typ und wird zu den lymphoplasmozytischen Lymphomen (LPL) gezählt. Beim WM kommt es zur klonalen Vermehrung reifer plasmazellulär differenzierter B-Lymphozyten im KM mit Bildung eines IgM Paraproteins [88]. Klinisch manifestiert sich der WM typischerweise mit einer Zytopenie (Anämie, Infekt- und Blutungsneigung), einem Hyperviskositätssyndrom, einer peripheren Neuropathie, einer Lymphadenopathie und einer Splenomegalie [113]. Über die Pathogenese des WM war zuvor wenig bekannt. Dem NF- κ B Signalweg wurde eine entscheidende Rolle zugeschrieben [69], allerdings war der molekulare Pathogenesemechanismus dahinter noch nicht geklärt [16]. In der Studie der Arbeitsgruppe Treon et al. hatten 91% der Patienten (49/54 Patienten) die somatische Mutation p.L265P im *MYD88*-Gen und auch in allen drei non IgM secreting LPLs wurde die Mutation gefunden. Diese Entdeckung war ein wichtiger Durchbruch im Verständnis der Pathogenese des WM und macht diese Mutation zu einem genetischen Merkmal des WM [124]. Zwischenzeitlich konnten diese initialen Daten durch weitere Studien bestätigt werden. Zwischen 65% [39, 90] und 90% der MW Patienten hatten die Mutation p.L265P im *MYD88*-Gen [54, 94, 124, 127]. Varettoni konnte sogar in 100% der 58 MW Patienten die Mutation p.L265P im *MYD88*-Gen nachweisen [116].

Auch in der IgM MGUS konnte die Mutation p.L265P im *MYD88*-Gen gefunden werden. Die IgM MGUS ist charakterisiert durch erhöhte Serum IgM Level, einer KM Beteiligung der Plasmazellen < 10% und einer asymptomatisch verlaufenden Klinik [88]. Landgren et al. detektierten mittels Sanger Sequenzierung die Mutation in fünf von neun IgM MGUS Patienten (56%) [67]. Weitere Studien belegten diese Ergebnisse. Xu et al. konnten durch Sanger Sequenzierung in drei von 24 Patienten (13%) die Mutation nachweisen. Mithilfe der ASR-PCR konnten sogar bei 13 Patienten (54%) die Mutation nachgewiesen werden [127]. In weiteren Studien schwankte die Häufigkeit der

gefundenen Mutation p.L265P im *MYD88*-Gen bei IgM MGUS Patienten zwischen 47% [116] und 87% [54].

Diese differenten Inzidenzen können möglicherweise aufgrund von Definitionsunterschieden oder der unterschiedlich angewendeter Methoden (Sanger Sequenzierung und AS-PCR) erklärt werden (siehe 4.2 Verwendete Methoden). Insbesondere bei den IgM MGUS Patienten zeigt sich eine größere Bandbreite der Nachweisraten (10% versus 54% - 87%), was jedoch durch die definitionsgemäß geringe KMinfiltration und die geringere Sensitivität der Sanger Sequenzierung bedingt sein kann [54, 67].

4.4 Bedeutung der Mutation p.L265P im *MYD88*-Gen

4.4.1 Bedeutung der Mutation p.L265P im *MYD88*-Gen in der Pathogenese des Morbus Waldenström

Der hohe Prozentanteil der IgM MGUS Patienten mit einer Mutation p.L265P im *MYD88*-Gen, lässt darauf schließen, dass die Mutation ein frühes Event in der WM Pathogenese darstellt [67, 127]. Das Vorliegen der Mutation p.L265P im *MYD88*-Gen ist mit einem signifikant höheren Risiko assoziiert, einen Progress zum WM zu erleiden [116], kann alleine jedoch nicht die Transformierung von einer IgM MGUS in ein WM erklären. In der Studie von Treon et al. wurde mittels WGS weitere Mutationen bei den WM Patienten gefunden. Beispielsweise zeigten 17% der Patienten somatische Mutationen im *AT-rich interactive domain-containing protein 1A (ARID1A)*-Gen [115], die möglicherweise eine Rolle bei der Transformierung von einem IgM MGUS in ein WM spielen können. Dies kann als Indiz gewertet werden, dass die Mutation p.L265P im *MYD88*-Gen ein frühes initierendes Ereignis in einem möglichen Multihit Model der Pathogenese des WM darstellt. Unter einem Multihit Model versteht man die Annahme, dass Krebs als Resultat mehrerer aufeinander folgender Mutationen in der DNA der betroffenen Zelle entsteht [21, 74]. Allerdings sind noch weitere Studien erforderlich, um die genaue Pathogenese des WM und die Frage nach einem möglichen zugrunde liegenden Multihit Model genauer zu klären und zu bestätigen.

4.4.2 Klinische Charakteristika der Mutation p.L265P im *MYD88*-Gen

In einer Studie von Mori et al. zeigte sich ein Unterschied der Geschlechterverteilung der WM Patienten, die eine Mutation p.L265P im *MYD88*-Gen aufwiesen. 94% der 16 männlichen Patienten hatten eine Mutation, während es bei den Frauen nur 44% waren [81]. WM und IgM MGUS Patienten mit einer Mutation p.L265P im *MYD88*-Gen zeigten einige klinische und biologische Charakteristika. Es zeigte sich eine signifikant stärkere Expression von CD27 [54] und häufiger somatische Mutationen der Immunoglobulin Heavy Chain Variable Gene (*IGHV*), vor allem der

IGHV3-23- und *IGHV3-74-*Gene bei Patienten mit einer Mutation p.L265P im *MYD88*-Gen [54, 90]. Patienten, die die Mutation p.L265P im *MYD88*-Gen tragen, hatten höhere IgM Level und bei der Diagnosestellung wurden bei diesen Patienten signifikant häufiger Knochenläsionen und eine Bence Jones Proteinurie festgestellt [39, 45, 116, 127].

IgM MGUS Patienten mit einer Mutation p.L265P im *MYD88*-Gen haben ein erhöhtes Risiko einen Progress in eine symptomatische Verlaufsform zu bekommen. Dies macht das Vorliegen der Mutation p.L265P im *MYD88*-Gen bei Patienten mit einer IgM MGUS zu einem möglichen prognostischer Marker [116]. Die IgM MGUS macht nur 15% - 20% der MGUS Fälle aus, hat aber ein höheres Risiko als andere MGUS Formen, in unterschiedliche symptomatische Krankheiten (zum Beispiel in ein IgM MM, einen WM, eine Amyloidose) überzugehen [64]. Somit kommt einer frühen Identifikation einer IgM MGUS gegebenenfalls eine klinische Bedeutung zu. In einer Studie an über 14 000 Patienten konnten Sigurdardottir et al. die Bedeutung einer Früherkennung eines MGUS und der damit einhergehenden regelmäßigen Kontrolluntersuchungen der Patienten zeigen. Patienten mit einem vordiagnostizierten MGUS und regelmäßigen Kontrolluntersuchungen hatten ein insgesamt besseres Gesamtüberleben als MM Patienten, bei denen zuvor keine MGUS diagnostiziert wurde und damit auch keine Kontrolluntersuchungen stattfanden [107].

Auch bei DLBCL Patienten, die mit einer Immunochemotherapie behandelt wurden, konnte gezeigt werden, dass die Mutation p.L265P im *MYD88*-Gen mit einer schlechteren Prognose assoziiert ist. DLBCL Patienten mit der Mutation p.L265P im *MYD88*-Gen haben ein höheres Risiko einen Progress zu erleiden oder zu versterben. Die Mutation p.L265P im *MYD88*-Gen macht es somit möglich diese Hochrisiko Patienten zu identifizieren [34].

4.4.3 Die Mutation p.L265P im *MYD88*-Gen als diagnostischer Marker

Die Diagnosestellung eines LPL kann sich in einigen Fällen schwierig gestalten [45]. Die Mutation p.L265P im *MYD88*-Gen erweist sich hierbei als hilfreich um ein LPL/WM von anderen B-Zell Erkrankungen mit ähnlichen Eigenschaften, wie z.B. dem MM oder dem Marginalzonen Lymphom zu unterscheiden. Da die Mutation p.L265P im *MYD88*-Gen bei diesen Krankheiten nur in geringem Maße (3% - 9%) oder gar nicht vorkommt ist die diagnostische Aussagekraft für das Vorliegen eines WM bei nachgewiesener p.L265P Mutation im *MYD88*-Gen hoch. Allerdings muss differentialdiagnostisch das mögliche Vorhandensein dieser Mutation beim ABC DLBCL und der IgM MGUS bedacht werden [86, 115]. Ebenso beruht die Unterscheidung zwischen einer IgM MGUS und einem WM bei Nachweis einer Mutation p.L265P im *MYD88*-Gen auf klinischen Parametern wie Hyperviskosität, Lymphadenopathie und Splenomegalie, sowie den IgM Serumspiegeln und der

KMinfiltration [126]. Bei der Unterscheidung und Diagnose eines IgM MM und eines WM hat sich die Mutation p.L265P im *MYD88*-Gen als wichtig herausgestellt. Bislang wurde das IgM MM, das weniger als 0.5% aller Myelome ausmacht [27], gegenüber dem WM hauptsächlich klinisch und vor allem durch das Vorhandensein von Knochenläsionen unterschieden. Nun ist es möglich bei der Diagnosestellung dieser Krankheiten auch die genetischen Unterschiede zu Hilfe zu nehmen, da eine t(11;14) für das Vorliegen eines IgM MM spricht und die Mutation p.L265P im *MYD88*-Gen eine Diagnose eines WM sehr wahrscheinlich macht [78]. Dies konnten Willenbacher et al. in einer Studie bekräftigen, in der 6/7 WM Patienten die Mutation p.L265P im *MYD88*-Gen hatten, während diese bei allen vier IgM MM Patienten nicht gefunden wurde. Auch weitere Studien, deren Patientenkollektiv IgM MM Patienten beinhalteten, konnte in keinem dieser Patienten die Mutation nachweisen [54, 115, 127]. Somit wird es in Zukunft möglich sein, die Krankheiten hierüber früher und präziser zu unterscheiden [124].

4.4.4 Bedeutung der Mutation p.L265P im *MYD88*-Gen für neue Therapiemöglichkeiten

Der Signalweg über MYD88 und IRAK1 oder IRAK4 scheint für das Überleben der B-Zellen wichtig zu sein. Mithilfe von IRAK 1 und IRAK4 Inhibitoren konnten ABC Zelllinien zerstört werden. Dadurch scheint es, dass IRAK1/IRAK4 Inhibitoren ein verheißungsvoller Therapieansatz bei Lymphomen, die eine *MYD88* Mutation aufweisen, sein können [85]. Auch in WM Patienten wird das Zellwachstum und das Überleben der Zellen durch die Mutation p.L265P im *MYD88*-Gen verbessert und es kann durch Hemmung des MYD88 Signalweges das Wachstum der Zellen gestoppt und eine Zytotoxizität ausgelöst werden [94, 128]. Die Arbeitsgruppe um Yang konnte zeigen, dass die Mutation p.L265P im *MYD88*-Gen den NF- κ B Signalweg zusätzlich über die Bruton tyrosine kinase (BTK) aktiviert und dass Zellen, die eine Mutation p.L265P im *MYD88*-Gen haben, zusätzlich eine stärkere BTK Aktivität aufweisen. Durch die Einnahme von Ibrutinib, ein Inhibitor der BTK, welches oral verabreicht wurde, stieg die Zahl der zerstörten WM Zellen, die eine Mutation p.L265P im *MYD88*-Gen tragen, an, ohne den IRAK Signalweg zu hemmen [128]. In einer Studie von Treon et al. bekamen 63 vortherapierte WM Patienten täglich 420 mg Ibrutinib verabreicht. Die IgM Level im Serum sanken und die Aktivitätsparameter verbesserten sich (der mediane Hb-Wert stieg und die Knochenmarksbeteiligung nahm ab). Die besten und höchsten Ansprechraten wurden in der Patientengruppe mit Nachweis einer p.L265P Mutation im *MYD88*-Gen gefunden [114]. Somit sind inzwischen zwei Signalwege (IRAK und BTK) bekannt, die durch die Mutation p.L265P im *MYD88*-Gen den NF- κ B Signalweg unabhängig voneinander aktivieren und als Therapieziel dienen können. Da sowohl IRAK und BTK Inhibitoren die Apoptose der WM Zellen induzieren, scheint eine Kombinationstherapie aus IRAK und BTK Inhibitoren sinnvoll zu sein. Kombinationstherapien zeigten

eine verstärkte Inhibierung des NF- κ B Signalweges und wirkten bei der WM Zelltötung synergistisch [68]. Damit sind die ersten Ansätze der Therapiemöglichkeiten erfolgreich gesetzt und die Mutation p.L265P im *MYD88*-Gen ist somit als diagnostischer und auch als prädiktiver Parameter für entsprechende Therapiemöglichkeiten zu sehen.

5 Zusammenfassung

Das Multiple Myelom (MM) ist ein Non-Hodgkin Lymphom der B-Zell-Reihe (B-NHL), das durch die klonale Proliferation maligner Plasmazellen im Knochenmark (KM), durch monoklonale Proteine (Immunglobulin (Ig) G, IgA; IgM und IgD) im Blut und Urin und den damit assoziierten organischen Komplikationen (Hyperkalziämie, renale Dysfunktion, Anämie und Knochenläsionen) charakterisiert wird.

In einer Studie von Ngo et al. wurde die somatische Punktmutation p.L265P im *myeloid differentiation primary response (MYD88)*-Gen rekurrent bei Patienten mit einem diffus großzelligen B-NHL vom activated B-cell-like (ABC)-Subtyp gefunden. Das *MYD88*-Gen ist auf dem Chromosom 3p22 lokalisiert und kodiert ein Schlüsseladaptorprotein der meisten Toll-like-, Interleukin-1- und Interleukin-18 Rezeptoren und führt darüber zur Aktivierung des Nukleärer Faktor ‚kappa-Leichtketten-enhancer‘ aktivierter B Zellen (NF- κ B) Signalweges, der unter anderem sowohl in der Pathogenese des diffus großzelligen B-NHL vom ABC-Subtyp als auch in der Entstehung des MM eine Rolle spielt. Vor diesem Hintergrund war das Ziel dieser Arbeit die Bestimmung der Inzidenz der Mutation p.L265P im *MYD88*-Gen bei 151 Patienten mit einem symptomatischen MM, die Charakterisierung der Kohorte und Korrelation zu klinischen Symptomen, dem Erkrankungsverlauf, Laborwerten, und zur molekularen Zytogenetik (Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung Analyse). Untersucht wurde die aus KM gewonnene Desoxyribonukleinsäure (DNA) von 151 Patienten mit neu diagnostiziertem MM, die alle eine Standardinduktionstherapie und mindestens eine Hochdosistherapie erhalten hatten. Die molekulargenetische Mutationsanalyse des Exon 5 des *MYD88*-Gens wurde mittels Sanger Sequenzierung durchgeführt.

Die ausgewerteten klinischen Daten zeigten eine typische Verteilung in der Zusammensetzung des Kollektivs hinsichtlich des Geschlechts (46,4% Frauen und 53,6% Männer), der Paraproteinverteilung (64,2% IgG, 17,9% IgA, 16,6% Leichtkettentyp und 1,3% IgD), als auch der klinischen Charakteristika und der zytogenetischen Aberrationen, die sich als prognostisch bedeutsam erwiesen. Zugewinne (+) auf 9q34 konnten mit 50,8% am häufigsten bei den Patienten detektiert werden. In absteigender Reihenfolge wurde die Deletion (del) 13q14 mit 44,4%, die +1q21 mit 28,6%, die Translokation t(4;14) mit 20,0%, die t(11;14) mit 19,4%, die del17p13 mit 6,7% und die t(14;16) mit 2,5% nachgewiesen. Dabei hatten Patienten mit einer +9q34 ein signifikant längeres ereignisfreies Überleben. Bei allen anderen Mutationen konnte beim Vorhandensein einer Aberration oder Translokation mit einem früheren und zum Teil statistisch signifikanten Auftreten eines Events

(Progress, Rezidiv, Tod) gerechnet werden. Patienten mit einer +9q34 wiesen ein längeres medianes Gesamtüberleben auf, welches jedoch nicht das statistische Signifikanzniveau erreichte. Mit einem statistisch signifikant kürzeren Überleben verbunden waren das Vorhandensein einer t(4;14) und t(14;16) und die einer del17p13.

Bei der Auswertung der Sanger Sequenzierungs basierten molekulargenetischen Analyse des Exon 5 des *MYD88*-Gens konnte bei keinem unserer 151 untersuchten MM Patienten die Mutation p.L265P gefunden werden. Dieses Ergebnis wurde durch weitere Studien mit ausreichender Anzahl an Patienten und unterschiedlich angewendeten Methoden (Allel-spezifische PCR, whole genome Sequenzierung) bestätigt, womit ein methodischer Fehler unserer Studie als sehr unwahrscheinlich anzusehen ist. Nach einer Studie von Treon et al., in der bei 91% der Morbus Waldenström (WM) Patienten die somatische Mutation p.L265P im *MYD88*-Gen gefunden wurde, gilt die Mutation p.L265P im *MYD88*-Gen als ein genetisches Merkmal des WM. Auch in der Monoklalen Gammopathie unklarer Signifikanz (MGUS) vom Typ IgM konnte die Mutation p.L265P im *MYD88*-Gen in bis zu 87% der untersuchten Patienten gefunden werden. Der hohe Prozentanteil der IgM MGUS Patienten mit einer Mutation p.L265P im *MYD88*-Gen lässt darauf schließen, dass die Mutation ein frühes Event in der WM Pathogenese darstellt. IgM MGUS Patienten mit einer Mutation p.L265P im *MYD88*-Gen hatten ein erhöhtes Risiko einen Progress in eine symptomatische Verlaufsform zu bekommen, und WM Patienten mit der Mutation p.L265P im *MYD88*-Gen hatten höhere IgM Level und bei der Diagnosestellung signifikant häufiger Knochenläsionen und eine Bence Jones Proteinurie. Dies macht das Vorliegen der Mutation p.L265P im *MYD88*-Gen zu einem möglichen prognostischen Marker der Erkrankung. Die Mutation p.L265P im *MYD88*-Gen erweist sich als hilfreich um das Vorliegen eines Lymphoplasmozytischen Lymphoms oder eines WM von anderen B-Zell Erkrankungen mit ähnlichen Eigenschaften, wie zum Beispiel der eines MM vom Typ IgM, in Zusammenschau mit der Klinik des Patienten, sowie den IgM Serumspiegeln und der KM Infiltration, diagnostisch zu unterscheiden und abzugrenzen. Des Weiteren ergeben sich neue Therapiemöglichkeiten (IRAK1/IRAK4 und BTK Inhibitoren, wie Ibrutinib) für den WM. Dabei kann die Mutation p.L265P im *MYD88*-Gen als diagnostischer und auch als prädiktiver Parameter für entsprechende Therapiemöglichkeiten genutzt werden.

6 Literaturverzeichnis

1. **Al-Farsi K**: Multiple myeloma: an update. *Oman medical journal*, 28: 3-11 (2013)
2. **Annunziata C M**, Davis RE, Demchenko Y, Bellamy W, Gabrea A, Zhan F, Lenz G, Hanamura I, Wright G, Xiao W, Dave S, Hurt EM, Tan B, Zhao H, Stephens O, Santra M, Williams DR, Dang L, Barlogie B, Shaughnessy JD Jr, Kuehl WM, Staudt LM: Frequent engagement of the classical and alternative NF-kappaB pathways by diverse genetic abnormalities in multiple myeloma. *Cancer cell*, 12: 115-130 (2007)
3. **Avet-Loiseau H**, Attal M, Moreau P, Charbonnel C, Garban F, Hulin C, Leyvraz S, Michallet M, Yakoub-Agha I, Garderet L, Marit G, Michaux L, Voillat L, Renaud M, Grosbois B, Guillermin G, Benboubker L, Monconduit M, Thieblemont C, Casassus P, Caillot D, Stoppa AM, Sotto JJ, Wetterwald M, Dumontet C, Fuzibet JG, Azais I, Dorvaux V, Zandecki M, Bataille R, Minvielle S, Harousseau JL, Facon T, Mathiot C: Genetic abnormalities and survival in multiple myeloma: the experience of the Intergroupe Francophone du Myélome. *Blood*, 109: 3489-3495 (2007)
4. **Bakkus MH**, Van Riet I, De Greef C, Van Camp B, Thielemans K: The clonogenic precursor cell in multiple myeloma. *Leukemia & lymphoma*, 18: 221-229 (1995)
5. **Bergsagel PL**, Chesi M, Nardini E, Brents LA, Kirby SL, Kuehl WM: Promiscuous translocations into immunoglobulin heavy chain switch regions in multiple myeloma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93: 13931-13936 (1996)
6. **Bergsagel PL**, Kuehl WM: Molecular pathogenesis and a consequent classification of multiple myeloma. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 23: 6333-6338 (2005)
7. **Bergsagel PL**, Kuehl WM: Chromosome translocations in multiple myeloma. *Oncogene*, 20: 5611-5622 (2001)
8. **Bergsagel PL**, Kuehl WM, Zhan F, Sawyer J, Barlogie B, Shaughnessy J Jr: Cyclin D dysregulation: an early and unifying pathogenic event in multiple myeloma. *Blood*, 106: 296-303 (2005)
9. **Bezieau S**, Devilder MC, Avet-Loiseau H, Mellerin MP, Puthier D, Pennarun E, Rapp MJ, Harousseau JL, Moisan JP, Bataille R: High incidence of N and K-Ras activating mutations in multiple myeloma and primary plasma cell leukemia at diagnosis. *Human mutation*, 18: 212-224 (2001)
10. **Billadeau D**, Quam L, Thomas W, Kay N, Greipp P, Kyle R, Oken MM, Van Ness B: Detection and quantitation of malignant cells in the peripheral blood of multiple myeloma patients. *Blood*, 80: 1818-1824 (1992)
11. **Birgegård G**, Gascón P, Ludwig H: Evaluation of anaemia in patients with multiple myeloma and lymphoma: findings of the European CANCER ANAEMIA SURVEY. *European journal of haematology*, 77: 378-386 (2006)

12. **Bladé J**, Fernández-Llama P, Bosch F, Montolíu J, Lens X M, Montoto S, Cases A, Darnell A, Rozman C, Montserrat E: Renal Failure in Multiple Myeloma: Presenting Features and Predictors of Outcome in 94 Patients From a Single Institution. *Arch Intern Med.*, 158(17): 1889-1893 (1998)
13. **Bladé J**, Kyle RA: Nonsecretory myeloma, immunoglobulin D myeloma, and plasma cell leukemia. *Hematology/oncology clinics of North America*, 13: 1259-1272 (1999)
14. **Blair CK**, Cerhan JR, Folsom AR, Ross JA: Anthropometric characteristics and risk of multiple myeloma. *Epidemiology (Cambridge, Mass.)*, 16: 691-694 (2005)
15. **Bolli N**, Avet-Loiseau H, Wedge DC, Van Loo P, Alexandrov LB, Martincorena I, Dawson KJ, Iorio F, Nik-Zainal S, Bignell GR, Hinton JW, Li Y, Tubio JM, McLaren S, O'Meara S, Butler AP, Teague JW, Mudie L, Anderson E, Rashid N, Tai YT, Shamma MA, Sperling AS, Fulciniti M, Richardson PG, Parmigiani G, Magrangeas F, Minvielle S, Moreau P, Attal M, Facon T, Futreal PA, Anderson KC, Campbell PJ, Munshi NC: Heterogeneity of genomic evolution and mutational profiles in multiple myeloma. *Nature communications*, 5: 2997 (2014)
16. **Braggio E**, Philipsborn C, Novak A, Hodge L, Ansell S, Fonseca R: Molecular pathogenesis of Waldenström's macroglobulinemia. *Haematologica*, 97: 1281-1290 (2012)
17. **Broderick P**, Chubb D, Johnson DC, Weinhold N, Försti A, Lloyd A, Olver B, Ma YP, Dobbins SE, Walker BA, Davies FE, Gregory WA, Child JA, Ross FM, Jackson GH, Neben K, Jauch A, Hoffmann P, Mühleisen TW, Nöthen MM, Moebus S, Tomlinson I P, Goldschmidt H, Hemminki K, Morgan GJ, Houlston RS: Common variation at 3p22.1 and 7p15.3 influences multiple myeloma risk. *Nature genetics*, 44: 58-61 (2011)
18. **Brown L M**, Gridley G, Check D, Landgren O: Risk of multiple myeloma and monoclonal gammopathy of undetermined significance among white and black male United States veterans with prior autoimmune, infectious, inflammatory, and allergic disorders. *Blood*, 111: 3388-3394 (2008)
19. **Chapman MA**, Lawrence MS, Keats JJ, Cibulskis K, Sougnez C, Schinzel AC, Harview CL, Brunet JP, Ahmann GJ, Adli M, Anderson KC, Ardlie KG, Auclair D, Baker A, Bergsagel PL, Bernstein BE, Drier Y, Fonseca R, Gabriel SB, Hofmeister CC, Jagannath S, Jakubowiak AJ, Krishnan A, Levy J, Liefeld T, Lonial S, Mahan S, Mfuko B, Monti S, Perkins LM, Onofrio R, Pugh TJ, Rajkumar SV, Ramos AH, Siegel DS, Sivachenko A, Stewart AK, Trudel S, Vij R, Voet D, Winckler W, Zimmerman T, Carpten J, Trent J, Hahn WC, Garraway LA, Meyerson M, Lander ES, Getz G, Golub TR: Initial genome sequencing and analysis of multiple myeloma. *Nature*, 471: 467-472 (2011)
20. **Chen ZJ**: Ubiquitin signalling in the NF-kappaB pathway. *Nature cell biology*, 7: 758-765 (2005)
21. **Chesi M**, Bergsagel PL, Brents LA, Smith CM, Gerhard DS, Kuehl WM: Dysregulation of cyclin D1 by translocation into an IgH gamma switch region in two multiple myeloma cell lines. *Blood*, 88: 674-681 (1996)
22. **Chesi M**, Nardini E, Brents LA, Schröck E, Ried T, Kuehl WM, Bergsagel PL: Frequent translocation t(4;14)(p16.3;q32.3) in multiple myeloma is associated with increased expression

- and activating mutations of fibroblast growth factor receptor 3. *Nature genetics*, 16: 260-264 (1997)
23. **Chesi M**, Nardini E, Lim RS, Smith KD, Kuehl WM, Bergsagel PL: The t(4;14) translocation in myeloma dysregulates both FGFR3 and a novel gene, MMSET, resulting in IgH/MMSET hybrid transcripts. *Blood*, 92: 3025-3034 (1998)
 24. **Chubb D**, Weinhold N, Broderick P, Chen B, Johnson DC, Försti A, Vijaykrishnan J, Migliorini G, Dobbins SE, Holroyd A, Hose D, Walker BA, Davies FE, Gregory WA, Jackson GH, Irving JA, Pratt G, Fegan C, Fenton JA, Neben K, Hoffmann P, Nöthen MM, Mühleisen TW, Eisele L, Ross FM, Straka C, Einsele H, Langer C, Dörner E, Allan JM, Jauch A, Morgan GJ, Hemminki K, Houlston RS, Goldschmidt H: Common variation at 3q26.2, 6p21.33, 17p11.2 and 22q13.1 influences multiple myeloma risk. *Nature genetics*, 45: 1221-1225 (2013)
 25. **Collins CD**: Multiple myeloma. *Cancer Imaging*, 10: 20-31 (2010)
 26. **Corradini P**, Ladetto M, Voena C, Palumbo A, Inghirami G, Knowles DM, Boccadoro M, Pileri A: Mutational activation of N- and K-ras oncogenes in plasma cell dyscrasias. *Blood*, 81: 2708-2713 (1993)
 27. **De Gramont A**, Grosbois B, Michaux JL, Peny AM, Pollet JP, Smadja N, Krulik M, Debray J, Bernard JF, Monconduit M: IgM myeloma: 6 cases and a review of the literature. *La Revue de medecine interne / fondee par la Societe nationale francaise de medecine interne*, 11: 13-18 (1990)
 28. **Demchenko YN**, Glebov OK, Zingone A, Keats JJ, Bergsagel PL, Kuehl WM: Classical and/or alternative NF-kappaB pathway activation in multiple myeloma. *Blood*, 115: 3541-3552 (2010)
 29. **Dimopoulos MA**, Kastiris E, Rosinol L, Blade J, Ludwig H: Pathogenesis and treatment of renal failure in multiple myeloma. *Leukemia*, 22: 1485-1493 (2008)
 30. **Drach J**, Schuster J, Nowotny H, Angerler J, Rosenthal F, Fiegl M, Rothermundt C, Gsur A, Jäger U, Heinz R: Multiple myeloma: high incidence of chromosomal aneuploidy as detected by interphase fluorescence in situ hybridization. *Cancer research*, 55: 3854-3859 (1995)
 31. **Durie BG**, Salmon SE: A clinical staging system for multiple myeloma. Correlation of measured myeloma cell mass with presenting clinical features, response to treatment, and survival. *Cancer*, 36: 842-854 (1975)
 32. **Eisenhauer EA**, Therasse P, Bogaerts J, Schwartz LH, Sargent D, Ford R, Dancey J, Arbuck S, Gwyther S, Mooney M, Rubinstein L, Shankar L, Dodd L, Kaplan R, Lacombe D, Verweij J: New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1). *European journal of cancer*, 45: 228-247 (2009)
 33. **Eleutherakis-Papaiakovou V**, Bamias A, Gika D, Simeonidis A, Pouli A, Anagnostopoulos A, Michali E, Economopoulos T, Zervas K, Dimopoulos MA, Greek Myeloma Study Group: Renal failure in multiple myeloma: incidence, correlations, and prognostic significance. *Leukemia & lymphoma*, 48: 337-341 (2007)

34. **Fernández-Rodríguez C**, Bellosillo B, García-García M, Sánchez-González B, Gimeno E, Vela MC, Serrano S, Besses C, Salar A: MYD88 (L265P) mutation is an independent prognostic factor for outcome in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Leukemia*, 28: 2104-2106 (2014)
35. **Fonseca R**, Bailey RJ, Ahmann GJ, Rajkumar SV, Hoyer JD, Lust JA, Kyle RA, Gertz MA, Greipp PR, Dewald GW: Genomic abnormalities in monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Blood*, 100: 1417-1424 (2002)
36. **Fonseca R**, Barlogie B, Bataille R, Bastard C, Bergsagel PL, Chesi M, Davies FE, Drach J, Greipp PR, Kirsch IR, Kuehl WM, Hernandez JM, Minvielle S, Pilarski LM, Shaughnessy JD Jr, Stewart AK, Avet-Loiseau H: Genetics and cytogenetics of multiple myeloma: a workshop report. *Cancer research*, 64: 1546-1558 (2004)
37. **Fonseca R**, Bergsagel PL, Drach J, Shaughnessy J, Gutierrez N, Stewart AK, Morgan G, Van Ness B, Chesi M, Minvielle S, Neri A, Barlogie B, Kuehl WM, Liebisch P, Davies F, Chen-Kiang S, Durie BG, Carrasco R, Sezer O, Reiman T, Pilarski L, Avet-Loiseau H, International Myeloma Working Group: International Myeloma Working Group molecular classification of multiple myeloma: spotlight review. *Leukemia*, 23: 2210-2221 (2009)
38. **Fonseca R**, Blood E, Rue M, Harrington D, Oken MM, Kyle RA, Dewald GW, Van Ness B, Van Wier SA, Henderson KJ, Bailey RJ, Greipp PR: Clinical and biologic implications of recurrent genomic aberrations in myeloma. *Blood*, 101: 4569-4575 (2003)
39. **Gachard N**, Parrens M, Soubeyran I, Petit B, Marfak A, Rizzo D, Devesa M, Delage-Corre M, Coste V, Laforet MP, de Mascarel A, Merlio JP, Bouabdalla K, Milpied N, Soubeyran P, Schmitt A, Bordessoule D, Cogné M, Feuillard J: IGHV gene features and MYD88 L265P mutation separate the three marginal zone lymphoma entities and Waldenstrom macroglobulinemia/lymphoplasmacytic lymphomas. *Leukemia*, 27: 183-189 (2013)
40. **GEKID-Atlas**; Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. Atlas der Krebsinzidenz und – mortalität in Deutschland
http://www.gekid.de/Atlas/Tabellen/Tabellen_D.php?Method=INCIDENCE_EU&ICD10=C88-C90&Year_from=2009&Year_to=2012&Men=on&Women=on&Rates=on&Cases=on,
Downloaddatum: Dezember 2014
41. **Goldschmidt H**, Lannert H, Bommer J, Ho AD: Multiple myeloma and renal failure. *Nephrol Dial Transplant*, 15: 301-304 (2000)
42. **González D**, van der Burg M, García-Sanz R, Fenton JA, Langerak AW, González M, van Dongen JJ, San Miguel JF, Morgan GJ: Immunoglobulin gene rearrangements and the pathogenesis of multiple myeloma. *Blood*, 110: 3112-3121 (2007)
43. **Greenberg AJ**, Rajkumar SV, Vachon CM: Familial monoclonal gammopathy of undetermined significance and multiple myeloma: epidemiology, risk factors, and biological characteristics. *Blood*, 119: 5359-5366 (2012)
44. **Greipp PR**, San Miguel J, Durie BG, Crowley JJ, Barlogie B, Blade J, Boccadoro M, Child JA, Avet-Loiseau H, Kyle RA, Lahuerta JJ, Ludwig H, Morgan G, Powles R, Shimizu K, Shustik C,

- Sonneveld P, Tosi P, Turesson I, Westin J: International staging system for multiple myeloma. *Journal of clinical oncology*, 23: 3412-3420 (2005)
45. **Hamadeh F**, MacNamara SP, Aguilera NS, Swerdlow SH, Cook JR: MYD88 L265P mutation analysis helps define nodal lymphoplasmacytic lymphoma. *Modern pathology*, 28: 564-574 (2015)
46. **Hemminki K**: Re: familial multiple myeloma: a family study and review of the literature. *Journal of the National Cancer Institute*, 94: 462-3 (2002)
47. **Hideshima T**, Bergsagel PL, Kuehl WM, Anderson KC: Advances in biology of multiple myeloma: clinical applications. *Blood*, 104: 607-618 (2004)
48. **Ho F**, Lortan JE, MacLennan IC, Khan M: Distinct short-lived and long-lived antibody-producing cell populations. *European journal of immunology*, 16: 1297-1301 (1986)
49. **Howlader N**, Noone AM, Krapcho M, Garshell J, Miller D, Altekruse SF, Kosary CL, Yu M, Ruhl J, Tatalovich Z, Mariotto A, Lewis DR, Chen HS, Feuer EJ, Cronin KA (eds). SEER Cancer Statistics Review, 1975-2012, National Cancer Institute. Bethesda, MD, http://seer.cancer.gov/csr/1975_2012/results_merged/sect_19_nhl.pdf, Downloaddatum: Dezember 2014.
50. **Hurt EM**, Wiestner A, Rosenwald A, Shaffer AL, Campo E, Grogan T, Bergsagel PL, Kuehl WM, Staudt LM: Overexpression of c-maf is a frequent oncogenic event in multiple myeloma that promotes proliferation and pathological interactions with bone marrow stroma. *Cancer cell*, 5: 191-199 (2004)
51. **International Myeloma Working Group**: Criteria for the classification of monoclonal gammopathies, multiple myeloma and related disorders: a report of the International Myeloma Working Group. *British journal of haematology*, 121: 749-757 (2003)
52. **Jacobson DR**, Zolla-Pazner S: Immunosuppression and infection in multiple myeloma. *Seminars in oncology*, 13: 282-290 (1986)
53. **Je EM**, Yoo NJ, Lee SH: Absence of MYD88 gene mutation in acute leukemias and multiple myelomas. *European journal of haematology*, 88: 273-274 (2012)
54. **Jiménez C**, Sebastián E, Chillón MC, Giraldo P, Mariano Hernández J, Escalante F, González-López TJ, Aguilera C, de Coca AG, Murillo I, Alcoceba M, Balanzategui A, Sarasquete ME, Corral R, Marín LA, Paiva B, Ocio EM, Gutiérrez NC, González M, San Miguel JF, García-Sanz R: MYD88 L265P is a marker highly characteristic of, but not restricted to, Waldenström's macroglobulinemia. *Leukemia*, 27: 1722-1728 (2013)
55. **Keats JJ**, Fonseca R, Chesi M, Schop R, Baker A, Chng WJ, Van Wier S, Tiedemann R, Shi CX, Sebag M, Braggio E, Henry T, Zhu YX, Fogle H, Price-Troska T, Ahmann G, Mancini C, Brents LA, Kumar S, Greipp P, Dispenzieri A, Bryant B, Mulligan G, Bruhn L, Barrett M, Valdez R, Trent J, Stewart AK, Carpten J, Bergsagel PL: Promiscuous mutations activate the noncanonical NF-kappaB pathway in multiple myeloma. *Cancer cell*, 12: 131-144 (2007)

56. **Kuehl WM**, Bergsagel PL: Multiple myeloma: evolving genetic events and host interactions. *Nature reviews.Cancer*, 2: 175-187 (2002)
57. **Kuppers R**, Dalla-Favera R: Mechanisms of chromosomal translocations in B cell lymphomas. *Oncogene*, 20: 5580-5594 (2001)
58. **Kuppers R**, Klein U, Hansmann ML, Rajewsky K: Cellular origin of human B-cell lymphomas. *The New England journal of medicine*, 341: 1520-1529 (1999)
59. **Kyle RA**, Gertz MA, Witzig TE, Lust JA, Lacy MQ, Dispenzieri A, Fonseca R, Rajkumar SV, Offord JR, Larson DR, Plevak ME, Therneau TM, Greipp PR: Review of 1027 patients with newly diagnosed multiple myeloma. *Mayo Clinic proceedings*, 78: 21-33 (2003)
60. **Kyle RA**, Rajkumar SV: Criteria for diagnosis, staging, risk stratification and response assessment of multiple myeloma. *Leukemia*, 23: 3-9 (2009)
61. **Kyle RA**, Rajkumar SV: Monoclonal gammopathy of undetermined significance. *British journal of haematology*, 134: 573-589 (2006)
62. **Kyle RA**, Rajkumar SV: Monoclonal gammopathies of undetermined significance: a review. *Immunological reviews*, 194: 112-139 (2003)
63. **Kyle RA**, Therneau TM, Rajkumar SV, Offord JR, Larson DR, Plevak MF, Melton LJ 3rd: A long-term study of prognosis in monoclonal gammopathy of undetermined significance. *The New England journal of medicine*, 346: 564-569 (2002)
64. **Kyle RA**, Therneau TM, Rajkumar SV, Remstein ED, Offord JR, Larson DR, Plevak MF, Melton LJ 3rd: Long-term follow-up of IgM monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Blood*, 102: 3759-3764 (2003)
65. **Landgren O**, Kyle RA, Pfeiffer RM, Katzmann JA, Caporaso NE, Hayes RB, Dispenzieri A, Kumar S, Clark RJ, Baris D, Hoover R, Rajkumar SV: Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) consistently precedes multiple myeloma: a prospective study. *Blood*, 113: 5412-5417 (2009)
66. **Landgren O**, Linet MS, McMaster ML, Gridley G, Hemminki K, Goldin LR: Familial characteristics of autoimmune and hematologic disorders in 8,406 multiple myeloma patients: a population-based case-control study. *International journal of cancer.Journal international du cancer*, 118: 3095-3098 (2006)
67. **Landgren O**, Staudt L: MYD88 L265P somatic mutation in IgM MGUS. *The New England journal of medicine*, 367: 2255-6; author reply 2256-7 (2012)
68. **Landgren O**, Tajeja N: MYD88 and beyond: novel opportunities for diagnosis, prognosis and treatment in Waldenstrom's Macroglobulinemia. *Leukemia*, 28: 1799-1803 (2014)
69. **Leleu X**, Eeckhoutte J, Jia X, Roccaro AM, Moreau AS, Farag M, Sacco A, Ngo HT, Runnels J, Melhem MR, Burwick N, Azab A, Azab F, Hunter Z, Hatjiharissi E, Carrasco DR, Treon SP, Witzig TE, Hideshima T, Brown M, Anderson KC, Ghobrial IM: Targeting NF-kappaB in Waldenstrom macroglobulinemia. *Blood*, 111: 5068-5077 (2008)

70. **Liebisch P**, Döhner H: Cytogenetics and molecular cytogenetics in multiple myeloma. *European journal of cancer* (Oxford, England : 1990), 42: 1520-1529 (2006)
71. **Lodé L**, Eveillard M, Trichet V, Soussi T, Wuillème S, Richebourg S, Magrangeas F, Ifrah N, Champion L, Traullé C, Guilhot F, Caillot D, Marit G, Mathiot C, Facon T, Attal M, Harousseau JL, Moreau P, Minvielle S, Avet-Loiseau H: Mutations in TP53 are exclusively associated with del(17p) in multiple myeloma. *Haematologica*, 95: 1973-1976 (2010)
72. **Lohr JG**, Stojanov P, Carter SL, Cruz-Gordillo P, Lawrence MS, Auclair D, Sougnez C, Knoechel B, Gould J, Saksena G, Cibulskis K, McKenna A, Chapman MA, Straussman R, Levy J, Perkins LM, Keats JJ, Schumacher SE, Rosenberg M, Multiple Myeloma Research Consortium, Getz G, Golub TR: Widespread genetic heterogeneity in multiple myeloma: implications for targeted therapy. *Cancer cell*, 25: 91-101 (2014)
73. **López-Corral L**, Gutiérrez NC, Vidriales MB, Mateos MV, Rasillo A, García-Sanz R, Paiva B, San Miguel JF: The progression from MGUS to smoldering myeloma and eventually to multiple myeloma involves a clonal expansion of genetically abnormal plasma cells. *Clinical cancer research*, 17: 1692-1700 (2011)
74. **Lord KA**, Hoffman-Liebermann B, Liebermann DA: Nucleotide sequence and expression of a cDNA encoding MyD88, a novel myeloid differentiation primary response gene induced by IL6. *Oncogene*, 5: 1095-1097 (1990)
75. **Ludwig H**: The clinical picture of multiple myeloma. *Onkologie*, 9: 202-4, 206-8 (1986)
76. **Lynch HT**, Ferrara K, Barlogie B, Coleman EA, Lynch JF, Weisenburger D, Sanger W, Watson P, Nipper H, Witt V, Thomé S: Familial myeloma. *The New England journal of medicine*, 359: 152-157 (2008)
77. **Medzhitov R**, Preston-Hurlburt P, Kopp E, Stadlen A, Chen C, Ghosh S, Janeway CA Jr: MyD88 is an adaptor protein in the hToll/IL-1 receptor family signaling pathways. *Molecular cell*, 2: 253-258 (1998)
78. **Mikhael J**: Ask the Hematologist: A Diagnostic Approach to Patients with an IgM monoclonal protein. *The Hematologist*, 11: 4-5 (2014)
79. **Montesinos-Rongen M**, Godlewska E, Brunn A, Wiestler OD, Siebert R, Deckert M: Activating L265P mutations of the MYD88 gene are common in primary central nervous system lymphoma. *Acta Neuropathologica*, 122: 791-792 (2011)
80. **Morgan G J**, Walker BA, Davies FE: The genetic architecture of multiple myeloma. *Nature reviews.Cancer*, 12: 335-348 (2012)
81. **Mori N**, Ohwashi M, Yoshinaga K, Mitsuhashi K, Tanaka N, Teramura M, Okada M, Shiseki M, Tanaka J, Motoji T: L265P mutation of the MYD88 gene is frequent in Waldenstrom's macroglobulinemia and its absence in myeloma. *PloS one*, 8: e80088 (2013)
82. **Munshi N C**, Anderson KC, Bergsagel PL, Shaughnessy J, Palumbo A, Durie B, Fonseca R, Stewart AK, Harousseau JL, Dimopoulos M, Jagannath S, Hajek R, Sezer O, Kyle R, Sonneveld P, Cavo M, Rajkumar SV, San Miguel J, Crowley J, Avet-Loiseau H, International

- Myeloma Workshop Consensus Panel 2: Consensus recommendations for risk stratification in multiple myeloma: report of the International Myeloma Workshop Consensus Panel 2. *Blood*, 117: 4696-4700 (2011)
83. **Muzio M**, Ni J, Feng P, Dixit VM: IRAK (Pelle) family member IRAK-2 and MyD88 as proximal mediators of IL-1 signaling. *Science (New York, N.Y.)*, 278: 1612-1615 (1997)
 84. **Neri A**, Murphy JP, Cro L, Ferrero D, Tarella C, Baldini L, Dalla-Favera R: Ras oncogene mutation in multiple myeloma. *The Journal of experimental medicine*, 170: 1715-1725 (1989)
 85. **Ngo VN**, Young RM, Schmitz R, Jhavar S, Xiao W, Lim KH, Kohlhammer H, Xu W, Yang Y, Zhao H, Shaffer AL, Romesser P, Wright G, Powell J, Rosenwald A, Muller-Hermelink HK, Ott G, Gascoyne RD, Connors JM, Rimsza LM, Campo E, Jaffe ES, Delabie J, Smeland EB, Fisher RI, Braziel RM, Tubbs RR, Cook JR, Weisenburger DD, Chan WC, Staudt LM: Oncogenically active MYD88 mutations in human lymphoma. *Nature*, 470: 115-119 (2011)
 86. **Ondrejka SL**, Lin JJ, Warden DW, Durkin L, Cook JR, Hsi ED: MYD88 L265P somatic mutation: its usefulness in the differential diagnosis of bone marrow involvement by B-cell lymphoproliferative disorders. *American Journal of Clinical Pathology*, 140: 387-394 (2013)
 87. **O'Neill LA**, Bowie AG: The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. *Nature reviews.Immunology*, 7: 353-364 (2007)
 88. **Owen RG**, Treon SP, Al-Katib A, Fonseca R, Greipp PR, McMaster ML, Morra E, Pangalis GA, San Miguel JF, Branagan AR, Dimopoulos MA: Clinicopathological definition of Waldenstrom's macroglobulinemia: consensus panel recommendations from the Second International Workshop on Waldenstrom's Macroglobulinemia. *Seminars in oncology*, 30: 110-115 (2003)
 89. **Palumbo A**, Anderson K: Multiple myeloma. *The New England journal of medicine*, 364: 1046-1060 (2011)
 90. **Petrikkos L**, Kyrtsolis MC, Roumelioti M, Georgiou G, Efthymiou A, Tzenou T, Panayiotidis P: Clonotypic analysis of immunoglobulin heavy chain sequences in patients with Waldenstrom's macroglobulinemia: correlation with MYD88 L265P somatic mutation status, clinical features, and outcome. *BioMed research international*, 2014: 809103 (2014)
 91. **Pham-Ledard A**, Beylot-Barry M, Barbe C, Leduc M, Petrella T, Vergier B, Martinez F, Cappellen D, Merlio JP, Grange F: High frequency and clinical prognostic value of MYD88 L265P mutation in primary cutaneous diffuse large B-cell lymphoma, leg-type. *JAMA dermatology*, 150: 1173-1179 (2014)
 92. **Pham-Ledard A**, Cappellen D, Martinez F, Vergier B, Beylot-Barry M, Merlio JP: MYD88 somatic mutation is a genetic feature of primary cutaneous diffuse large B-cell lymphoma, leg type. *The Journal of investigative dermatology*, 132: 2118-2120 (2012)
 93. **Poon KS**, Liu TC, Tan KM, Koay ES: One-step molecular detection of the MYD88 L265P mutation by unlabeled probe genotyping analysis. *Molecular and cellular probes*, 29: 74-77 (2015)

94. **Poulain S**, Roumier C, Decambon A, Renneville A, Herbaux C, Bertrand E, Tricot S, Daudignon A, Galiègue-Zouitina S, Soenen V, Theisen O, Grardel N, Nibourel O, Roche-Lestienne C, Quesnel B, Duthilleul P, Preudhomme C, Leleu X: MYD88 L265P mutation in Waldenstrom macroglobulinemia. *Blood*, 121: 4504-4511 (2013)
95. **Puente XS**, Pinyol M, Quesada V, Conde L, Ordóñez GR, Villamor N, Escaramis G, Jares P, Beà S, González-Díaz M, Bassaganyas L, Baumann T, Juan M, López-Guerra M, Colomer D, Tubío J M, López C, Navarro A, Tornador C, Aymerich M, Rozman M, Hernández JM, Puente DA, Freije JM, Velasco G, Gutiérrez-Fernández A, Costa D, Carrió A, Guijarro S, Enjuanes A, Hernández L, Yagüe J, Nicolás P, Romeo-Casabona CM, Himmelbauer H, Castillo E, Dohm JC, de Sanjosé S, Piris MA, de Alava E, San Miguel J, Royo R, Gelpí JL, Torrents D, Orozco M, Pisano D G, Valencia A, Guigó R, Bayés M, Heath S, Gut M, Klatt P, Marshall J, Raine K, Stebbings LA, Futreal PA, Stratton MR, Campbell PJ, Gut I, López-Guillermo A, Estivill X, Montserrat E, López-Otín C, Campo E: Whole-genome sequencing identifies recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia. *Nature*, 475: 101-105 (2011)
96. **Radbruch A**, Muehlinghaus G, Luger EO, Inamine A, Smith KG, Dörner T, Hiepe F: Competence and competition: the challenge of becoming a long-lived plasma cell. *Nature reviews.Immunology*, 6: 741-750 (2006)
97. **Rajkumar SV**, Dimopoulos MA, Palumbo A, Blade J, Merlini G, Mateos MV, Kumar S, Hillengass 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 SY, Caers J, Usmani SZ, Lahuerta JJ, Johnsen HE, Beksac M, Cavo M, Goldschmidt H, Terpos E, Kyle RA, Anderson K C, Durie BG, Miguel JF: International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma. *The Lancet.Oncology*, 15: e538-48 (2014)
98. **Rasmussen T**, Haaber J, Dahl IM, Knudsen LM, Kerndrup GB, Lodahl M, Johnsen HE, Kuehl M: Identification of translocation products but not K-RAS mutations in memory B cells from patients with multiple myeloma. *Haematologica*, 95: 1730-1737 (2010)
99. **Rayet B**, Gélinas C: Aberrant rel/nfkb genes and activity in human cancer. *Oncogene*, 18: 6938-6947 (1999)
100. **Roccaro AM**, Sacco A, Thompson B, Leleu X, Azab AK, Azab F, Runnels J, Jia X, Ngo H T, Melhem MR, Lin CP, Ribatti D, Rollins BJ, Witzig TE, Anderson KC, Ghobrial IM: MicroRNAs 15a and 16 regulate tumor proliferation in multiple myeloma. *Blood*, 113: 6669-6680 (2009)
101. **Roodman GD**: Pathogenesis of myeloma bone disease. *Blood cells, molecules & diseases*, 32: 290-292 (2004)
102. **Savage DG**, Lindenbaum J, Garrett T J: Biphasic pattern of bacterial infection in multiple myeloma. *Annals of Internal Medicine*, 96: 47-50 (1982)
103. **Seidl S**, Kaufmann H, Drach J: New insights into the pathophysiology of multiple myeloma. *The Lancet.Oncology*, 4: 557-564 (2003)
104. **Shaughnessy J Jr**, Gabrea A, Qi Y, Brents L, Zhan F, Tian E, Sawyer J, Barlogie B, Bergsagel PL, Kuehl M: Cyclin D3 at 6p21 is dysregulated by recurrent chromosomal translocations to immunoglobulin loci in multiple myeloma. *Blood*, 98: 217-223 (2001)

105. **Shimizu Y**, Kato H, Schull W J: Studies of the mortality of A-bomb survivors. 9. Mortality, 1950-1985: Part 2. Cancer mortality based on the recently revised doses (DS86). Radiation research, 121: 120-141 (1990)
106. **Shou Y**, Martelli ML, Gabrea A, Qi Y, Brents LA, Roschke A, Dewald G, Kirsch IR, Bergsagel PL, Kuehl WM: Diverse karyotypic abnormalities of the c-myc locus associated with c-myc dysregulation and tumor progression in multiple myeloma. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 97: 228-233 (2000)
107. **Sigurdardottir EE**, Turesson I, Lund SH, Lindqvist EK, Mailankody S, Korde N, Björkholm M, Landgren O, Kristinsson SY: The Role of Diagnosis and Clinical Follow-up of Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance on Survival in Multiple Myeloma. JAMA oncology, 1: 168-174 (2015)
108. **Smadja NV**, Bastard C, Brigaudeau C, Leroux D, Fruchart C, Groupe Francais de Cytogénétique Hématologique: Hypodiploidy is a major prognostic factor in multiple myeloma. Blood, 98: 2229-2238 (2001)
109. **Smadja NV**, Fruchart C, Isnard F, Louvet C, Dutel JL, Cheron N, Grange MJ, Monconduit M, Bastard C: Chromosomal analysis in multiple myeloma: cytogenetic evidence of two different diseases. Leukemia, 12: 960-969 (1998)
110. **Staudt LM**: Oncogenic activation of NF-kappaB. Cold Spring Harbor perspectives in biology, 2: a000109 (2010)
111. **Stewart AK**, Bergsagel PL, Greipp PR, Dispenzieri A, Gertz MA, Hayman SR, Kumar S, Lacy MQ, Lust JA, Russell SJ, Witzig TE, Zeldenrust SR, Dingli D, Reeder CB, Roy V, Kyle RA, Rajkumar SV, Fonseca R: A practical guide to defining high-risk myeloma for clinical trials, patient counseling and choice of therapy. Leukemia, 21: 529-534 (2007)
112. **Swerdlow SH**, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman JW: WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. IARC Press: Lyon, France (2008)
113. **Treon SP**: How I treat Waldenstrom macroglobulinemia. Blood, 114: 2375-2385 (2009)
114. **Treon SP**, Tripsas CK, Meid K, Warren D, Varma G, Green R, Argyropoulos KV, Yang G, Cao Y, Xu L, Patterson CJ, Rodig S, Zehnder JL, Aster JC, Harris NL, Kanan S, Ghobrial I, Castillo J J, Laubach JP, Hunter ZR, Salman Z, Li J, Cheng M, Clow F, Graef T, Palomba ML, Advani RH: Ibrutinib in previously treated Waldenstrom's macroglobulinemia. The New England journal of medicine, 372: 1430-1440 (2015)
115. **Treon SP**, Xu L, Yang G, Zhou Y, Liu X, Cao Y, Sheehy P, Manning RJ, Patterson CJ, Tripsas C, Arcaini L, Pinkus GS, Rodig SJ, Sohani AR, Harris NL, Laramie JM, Skifter DA, Lincoln SE, Hunter ZR: MYD88 L265P somatic mutation in Waldenstrom's macroglobulinemia. The New England journal of medicine, 367: 826-833 (2012)
116. **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 ML, Paulli M, Cazzola M: Prevalence and clinical significance of the MYD88 (L265P) somatic mutation

- in Waldenstrom's macroglobulinemia and related lymphoid neoplasms. *Blood*, 121: 2522-2528 (2013)
117. **Vossen RH**, Aten E, Roos A, den Dunnen JT: High-resolution melting analysis (HRMA): more than just sequence variant screening. *Human mutation*, 30: 860-866 (2009)
118. **Walker BA**, Leone PE, Chiecchio L, Dickens NJ, Jenner MW, Boyd KD, Johnson DC, Gonzalez D, Dagrada GP, Protheroe RK, Konn ZJ, Stockley DM, Gregory WM, Davies FE, Ross FM, Morgan GJ: A compendium of myeloma-associated chromosomal copy number abnormalities and their prognostic value. *Blood*, 116: e56-65 (2010)
119. **Walker BA**, Wardell CP, Chiecchio L, Smith EM, Boyd KD, Neri A, Davies FE, Ross FM, Morgan GJ: Aberrant global methylation patterns affect the molecular pathogenesis and prognosis of multiple myeloma. *Blood*, 117: 553-562 (2011)
120. **Wang CZ**, Lin J, Qian J, Shao R, Xue D, Qian W, Xiao GF, Deng ZQ, Yang J, Li Y, Chen XX: Development of high-resolution melting analysis for the detection of the MYD88 L265P mutation. *Clinical biochemistry*, 46: 385-387 (2013)
121. **Wang L**, Lawrence MS, Wan Y, Stojanov P, Sougnez C, Stevenson K, Werner L, Sivachenko A, DeLuca DS, Zhang L, Zhang W, Vartanov AR, Fernandes SM, Goldstein NR, Folco E G, Cibulskis K, Tesar B, Sievers QL, Shefler E, Gabriel S, Hacohen N, Reed R, Meyerson M, Golub TR, Lander ES, Neuberger D, Brown JR, Getz G, Wu CJ: SF3B1 and other novel cancer genes in chronic lymphocytic leukemia. *The New England journal of medicine*, 365: 2497-2506 (2011)
122. **Weinhold N**, Johnson DC, Chubb D, Chen B, Försti A, Hosking FJ, Broderick P, Ma YP, Dobbins SE, Hose D, Walker BA, Davies FE, Kaiser MF, Li NL, Gregory WA, Jackson GH, Witzens-Harig M, Neben K, Hoffmann P, Nöthen MM, Mühleisen TW, Eisele L, Ross FM, Jauch A, Goldschmidt H, Houlston RS, Morgan GJ, Hemminki K: The CCND1 c.870G>A polymorphism is a risk factor for t(11;14)(q13;q32) multiple myeloma. *Nature genetics*, 45: 522-525 (2013)
123. **Wesche H**, Henzel WJ, Shillinglaw W, Li S, Cao Z: MyD88: an adapter that recruits IRAK to the IL-1 receptor complex. *Immunity*, 7: 837-847 (1997)
124. **Willenbacher W**, Willenbacher E, Brunner A, Manzl C: Improved accuracy of discrimination between IgM multiple myeloma and Waldenstrom macroglobulinaemia by testing for MYD88 L265P mutations. *British journal of haematology*, 161: 902-904 (2013)
125. **Winearls CG**: Acute myeloma kidney. *Kidney international*, 48: 1347-1361 (1995)
126. **Xu L**, Hunter ZR, Yang G, Cao Y, Liu X, Manning R, Tripsas C, Chen J, Patterson CJ, Kluk M, Kanan S, Castillo J, Lindeman N, Treon SP: Detection of MYD88 L265P in peripheral blood of patients with Waldenstrom's Macroglobulinemia and IgM monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Leukemia*, 28: 1698-1704 (2014)
127. **Xu L**, Hunter ZR, Yang G, Zhou Y, Cao Y, Liu X, Morra E, Trojani A, Greco A, Arcaini L, Varettoni M, Brown JR, Tai Y T, Anderson KC, Munshi NC, Patterson CJ, Manning RJ, Tripsas CK, Lindeman NI, Treon SP: 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: 2051-2058 (2013)

128. **Yang G**, Zhou Y, Liu X, Xu L, Cao Y, Manning RJ, Patterson CJ, Buhlage SJ, Gray N, Tai YT, Anderson KC, Hunter ZR, Treon SP: A mutation in MYD88 (L265P) supports the survival of lymphoplasmacytic cells by activation of Bruton tyrosine kinase in Waldenstrom macroglobulinemia. *Blood*, 122: 1222-1232 (2013)
129. **Ziegler A**, Lange S, Bender R: Survival analysis: Cox regression. *Deutsche medizinische Wochenschrift*, 132 Suppl 1: e42-4 (2007)
130. **Ziegler A**, Lange S, Bender R: Survival analysis: log rank test. *Deutsche medizinische Wochenschrift*, 132 Suppl 1: e39-41 (2007)

7 Danksagung

Die Danksagung wurde aus Datenschutzgründen entfernt

8 Lebenslauf

Der Lebenslauf wurde aus Datenschutzgründen entfernt

Der Lebenslauf wurde aus Datenschutzgründen entfernt