

Waarde van MYD88 L265P mutatie onderzoek bij Waldenström Macroglobulinemie



15-05-2014
Stefanie Desmet
Promotor: Dr. Elisabeth Moreau

- Inleiding
 - Waldenström macroglobulinemie (WM)
 - MYD88
- CAT-vragen
 - Wat is de waarde van MYD88 L265P onderzoek bij Waldenström macroglobulinemie?
 - Welke methode leent zich momenteel het best om MYD88 L265P mutatie op te sporen?
 - Moet MYD88 L265P onderzoek aangeboden worden in AZ Delta Roeselare?
- To-do's
- Besluit

Waldenström macroglobulinemie (WM)



Algemeen

- Zeldzaam B-cel non-Hodgkin lymfoom (1-2% van B-cel lymfomen)
- Incidentiegraad in Europese populatie (Phekoo et al. 2008)
 - Mannen: 7,3 per miljoen
 - Vrouwen: 4,2 per miljoen
- Mediane leeftijd op diagnose 63-68 jaar
- Klinisch verloop meestal indolent met mediane overleving van 5-10 jaar

Waldenström macroglobulinemia (WM)



Diagnose – WHO 2008



Mature B-cell Neoplasms

Chronic lymphocytic leukaemia /small lymphocytic lymphoma

B-cell prolymphocytic leukaemia

Splenic marginal zone lymphoma

Hairy cell leukaemia

Splenic lymphoma/leukaemia, unclassifiable

Lymphoplasmacytic lymphoma

Heavy chain diseases

Plasma cell neoplasms

Extranodal marginal zone lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue (MALT lymphoma)

Nodal marginal zone lymphoma

Follicular lymphoma

Primary cutaneous follicle centre lymphoma

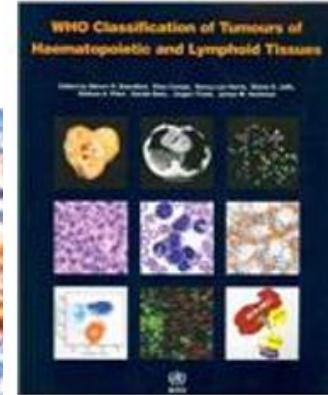
Mantle cell lymphoma

Diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL), NOS

T-cell/histiocyte-rich large B-cell lymphoma

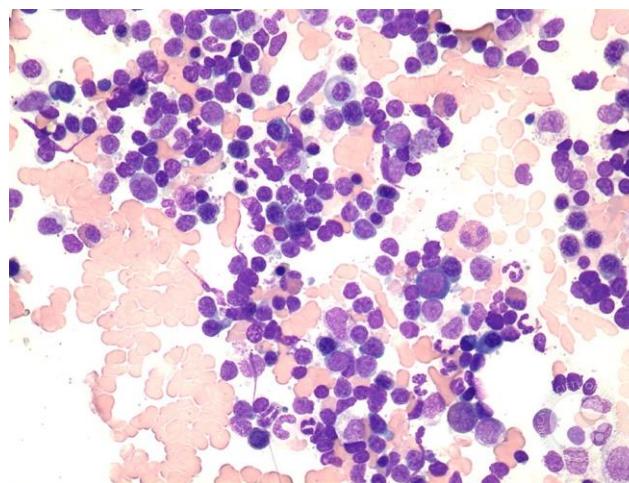
Primary DLBCL of the CNS

Primary cutaneous DLBCL, leg type



Lymfoplasmocytair lymfoom WHO definitie

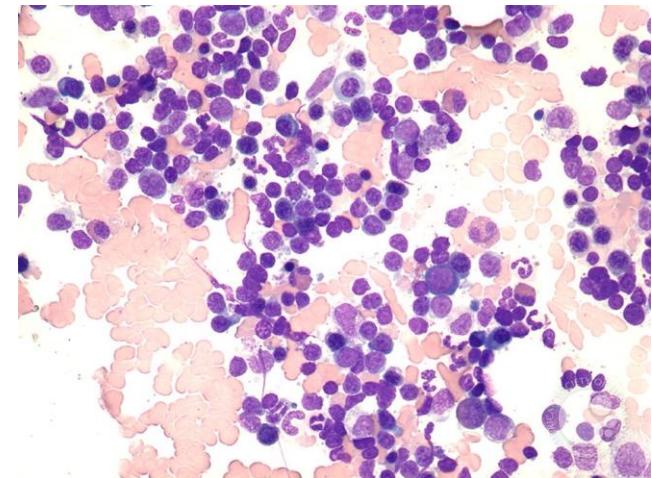
- *Neoplasm of small B lymphocytes, plasmacytoid lymphocytes and plasma cells*
- *Usually involving bone marrow (BM), sometimes lymph nodes and spleen*



Waldenström macroglobulinemie (WM)

Lymfoplasmocytair lymfoom WHO definitie

- *Neoplasm of small B lymphocytes, plasmacytoid lymphocytes and plasma cells*
 - *Usually involving bone marrow (BM)*
 - *Sometimes lymph nodes and spleen*
-
- ***not fulfill the criteria for any other small B-cell lymphoid neoplasms that may also have plasmacytic differentiation.***
 - ***Because the distinction between LPL and one of these other lymphomas, especially some marginal zone lymphomas (MZL), is not always clear-cut, some cases need to be diagnosed as a small B-cell lymphoma with plasmacytic differentiation and a differential diagnosis provided.***
 - ***Although often associated with a paraprotein usually of IgM type, it is not required for the diagnosis.***



Waldenström macroglobulinemie (WM)



Waldenström macroglobulinemie WHO definitie

Beenmerginvasie door
lymfoplasmocytair lymfoom (LPL)

+

IgM paraproteïne
(concentratie niet van belang)

Waldenström macroglobulinemie (WM)



Lymfoplasmocytair lymfoom

95%

IgM secreterend

||

Waldenström
macroglobulinemie

5%

IgA

IgG

Niet-
secreterend

Waldenström macroglobulinemie (WM)



Diagnose

WHO definitie gebaseerd op

clinicopathologische definitie van WM door

consensus panel aanbevelingen van de

Second International Workshop on Waldenstrom's Macroglobulinemia 2003

Diagnostische criteria voor WM volgens de consensus panel aanbevelingen van de tweede internationale workshop rond Waldenström macroglobulinemie 2003.

- IgM monoclonal gammopathy of any concentration
- Bone marrow infiltration by small lymphocytes showing plasmacytoid/plasma cell differentiation
- Intertrabecular pattern of bone marrow infiltration
- Surface IgM⁺, CD5[±], CD10⁻, CD19⁺, CD20⁺, CD22⁺, CD23⁻, CD25⁺, CD27⁺, FMC7⁺, CD103⁻, CD138⁻ immunophenotype*

WHO

* Variations from this immunophenotypic profile can occur. However, care should be taken to satisfactorily exclude other lymphoproliferative disorders. This is most relevant in CD5⁺ cases, for which chronic lymphocytic leukemia and mantle cell lymphoma require specific exclusion before a diagnosis of WM can be made.

Diagnose - flowcytometrie

- IgM monoclonal gammopathy of any concentration
- Bone marrow infiltration by small lymphocytes showing plasmacytoid/plasma cell differentiation
- Intertrabecular pattern of bone marrow infiltration
- Surface IgM⁺ CD5[±], CD10⁻, CD19⁺, CD20⁺, CD22⁺, CD23⁻, CD25⁺, CD27⁺, FMC7⁺, CD103⁻, CD138⁻ immunophenotype*

* Variations from this immunophenotypic profile can occur. However, care should be taken to satisfactorily exclude other lymphoproliferative disorders. This is most relevant in CD5⁺ cases, for which chronic lymphocytic leukemia and mantle cell lymphoma require specific exclusion before a diagnosis of WM can be made.

10-20% CD5+	enkele % CD10+	16-40% WM CD23+	DD hairy cel leukemie
DD mantelcel lymfoom	DD folliculair lymfoom		
DD chronische lymfatische leukemie			

Overlap met CD5+ lymfomen (MCL/CLL) en marginale zone lymfoom

Waldenström macroglobulinemie (WM)



Classificatie Waldenström macroglobulinemie en gerelateerde aandoeningen

	IgM Monoclonal Protein*	Bone Marrow Infiltration†	Symptoms Attributable to IgM	Symptoms Attributable to Tumor Infiltration§
WM				
Symptomatic	+	+	+	+
Asymptomatic	+	+	-	-
IgM-related disorders‡	+	-(b)	+	-
MGUS	+	-(b)	-	-

* The panel considered it to be inappropriate to define an IgM concentration to distinguish MGUS from WM. However, it is important to note that the IgM concentration rarely if ever exceeds 3 g/dL in MGUS.

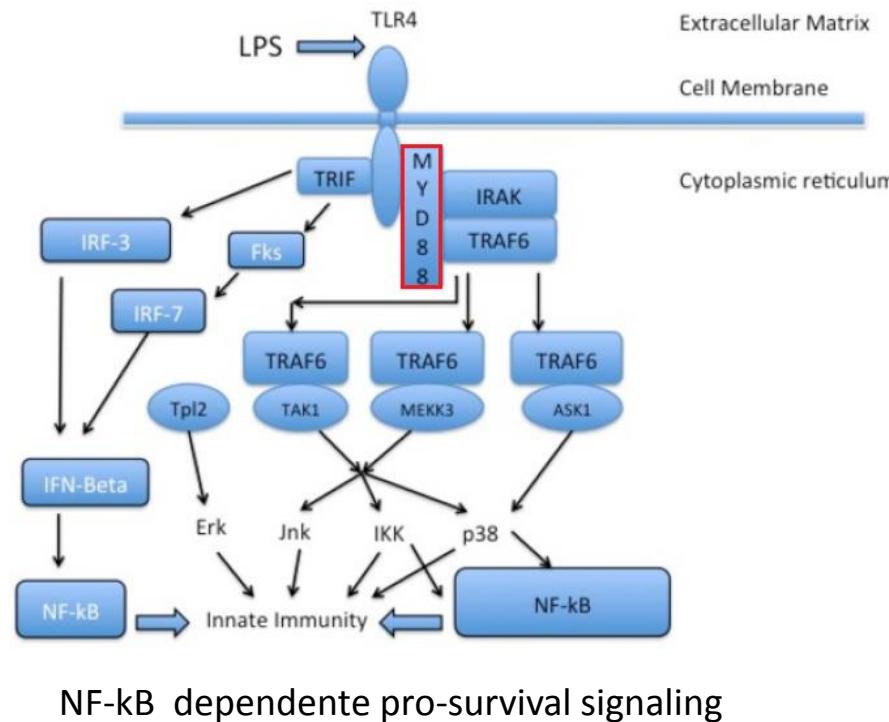
MGUS WHO 2008 definitie

- M-protein <30g/L
- BM clonale plasma cellen <10% en weinig plasmacelinfiltiatie op botboor
- Geen lytische botlesies
- Geen myeloom gerelateerde symptomen (CRAB)
- Geen andere B-cel proliferatieve aandoening

- Inleiding
 - Waldenström macroglobulinemie (WM)
 - MYD88
- CAT-vragen
 - Wat is de waarde van MYD88 L265P onderzoek bij Waldenström macroglobulinemie?
 - Welke methode leent zich momenteel het best om MYD L265P mutatie op te sporen?
 - Moet MYD88 L265P onderzoek aangeboden worden in AZ Delta Roeselare?
- To-do's
- Besluit

myeloid differentiation factor 88

- Cruciale adaptor in de interleukine(IL)-1, IL-18 en toll-like receptors (TLR) signaal pathway



MYD88 mutatie bij lymfomen

- Ngo et al. 2011

MYD88 mutaties in DLBCL type ABC (activated B-cell-like)

29% ABC DLBCL zelfde AZ substitutie nl. **MYD88 L265P** ((T->C) op positie 3818541 in chromosoom 3p22.2)

Celoverleving ↑ door L265P mutatie → gain-of-function mutation

- Treon et al. 2012

MYD88 L265P mutatie in 91% patiënten met LPL

Afwezig bij multiple myeloom (incl IgM secreterend MM)

Slechts in beperkt aantal patiënten met MZL (7%) en IgM MGUS (10%)



Rol MYD88 L265P in WM?

- Inleiding
 - Waldenström macroglobulinemie (WM)
 - MYD88
- CAT-vragen
 - Wat is de waarde van MYD88 L265P onderzoek bij Waldenström macroglobulinemie?
 - Welke methode leent zich momenteel het best om MYD88 L265P mutatie op te sporen?
 - Moet MYD88 L265P onderzoek aangeboden worden in AZ Delta Roeselare?
- To-do's
- Besluit

Vraag1: Waarde MYD88 L265P



Wat is de waarde van MYD88 L265P

- Diagnostisch
 - Waldenström Macroglobulinemie en IgM MGUS
- Prognostisch
 - Waldenström macroglobulinemie
 - IgM MGUS
- Opvolging therapie
- Toekomst

Vraag1: Waarde MYD88 L265P



Diagnostisch

Sinds publicatie van Treon et al. 2012

→ 14 artikels (tem 1 mei 2014)

betreffende MYD88 L265P in patiënten met WM en gerelateerde lymfoproliferatieve aandoeningen

Comment on Varettoni et al, page 2522

The MYDas touch of next-gen sequencing

Rafael Fonseca¹ and Esteban Braggio¹ ¹MAYO CLINIC

Oncogenically active MYD88 mutations in human lymphoma

Vu N. Ngo^{1,2*}, Ryan M. Young^{1*}, Roland Schmitz^{1*}, Sameer Jhavar^{1*}, Wenming Xiao^{2*}, Kian-Huat Lim^{1*}, Holger Kohlhammer¹, Weihong Xu¹, Yandan Yang¹, Hong Zhao¹, Arthur L. Shaffer¹, Paul Romesser^{1,3}, George Wright⁴, John Powell⁵, Andreas Rosenwald², Hans Konrad Müller-Hermelinck⁵, German Ott⁶, Randy D. Gascoyne⁷, Joseph M. Connors⁷, Lisa M. Rimma^{8,9}, Elias Campo¹⁰, Elaine S. Jaffe¹¹, Jan Delabie¹², Erlend B. Smeland¹³, Richard I. Fisher^{8,14}, Rita M. Brazile^{9,15}, Raymond R. Tubbs^{9,16}, J. R. Cook^{9,16}, Denny D. Welsenburger¹⁷, Wing C. Chan¹⁷ & Louis M. Staudt¹

blood

2013 122: 1222-1232
Prepublished online July 8, 2013;
doi:10.1182/blood-2012-12-47511

A mutation in MYD88 (L265P) supports the survival of lymphoplasmacytic cells by activation of Bruton tyrosine kinase in Waldenström macroglobulinemia

Guang Yang, Yangsheng Zhou, Xia Liu, Lian Xu, Yang Cao, Robert J. Manning, Christopher J. Patterson, Sara J. Buhlage, Nathaniel Gray, Tu-Tzu Tai, Kenneth C. Anderson, Zachary R. Hunter

blood

2013 121: 2051-2058
Prepublished online January 15, 2013;
doi:10.1182/blood-2012-09-454355

MYD88 L265P in Waldenström macroglobulinemia, immunoglobulin M monoclonal gammopathy, and other B-cell lymphoproliferative disorders using conventional and quantitative allele-specific polymerase chain reaction

Leukemia (2014) 1–7
© 2014 Macmillan Publishers Limited. All rights reserved 0887-6924/14
www.nature.com/leu

ORIGINAL ARTICLE

Detection of MYD88 L265P in peripheral blood of patients with Waldenström's Macroglobulinemia and IgM monoclonal gammopathy of undetermined significance

L Xu^{1,2}, ZH Hunter^{1,2}, G Yang^{1,2}, Y Cao^{1,2}, X Liu^{1,2}, R Manning¹, C Tripsas¹, J Chen¹, CJ Patterson¹, M Kluk^{2,3}, S Kanan¹, J Castillo^{1,2}, N Linderman^{2,3} and SP Treon^{1,2}

Prevalence and clinical significance of the MYD88 (L265P) somatic mutation in Waldenström's macroglobulinemia and related lymphoid neoplasms

Marzia Varettoni, Luca Arcaini, Silvia Zibellini, Emanuela Boveri, Sara Rattotti, Roberta Riboni, Alessandro Corso, Ester Orlandi, Maurizio Bonilichi, Manuel Gotti, Cristiana Pascutto, Silvia Mangiacavalli, Giorgio Croci, Valeria Facciadori, Lucia Morello, Maria Luisa Guerrera, Marco Paulli and Mario Cazzola

MYD88 L265P

WM versus non-IgM LPL en IgM MGUS



Author	Method	Sample	MYD88 mutation positive patients/ total number of patients (percentage)		
			WM	non-IgM LPL	IgM MGUS
Treon et al. 2012	Sanger sequencing	CD19+ cells BM	49/54 (91%)	3/3 (100%)	2/21 (10%)
Poulain et al. 2013	Sanger sequencing	CD19+ cells BM	53/67 (79%)	-	1/2 (50%)
Jiménez et al. 2013	RT AS-PCR	BM	101 /117 (86%)	0/9 (0%)	27 /31 (87%)
Gachard et al. 2013	Sanger sequencing	BM	18/27 (67%)	-	-
Varettoni et al. 2013	AS-PCR	BM	58/58 (100%)	-	36/77 (47%)
Xu et al. 2013	AS-PCR + RT AS-PCR	CD19+ cells BM	97/104 (93%)	-	13/24 (54%)
Willenbacher et al. 2013	Sanger sequencing	BM	6/7 (86%)	-	-
Odrejka et al. 2013	AS-PCR	BM	13/13 (100%)	-	-
Varettoni et al. 2014	AS-PCR	BM	8/9 (89%)	-	71/136 (52%)
Xu et al. 2014	(RT) AS-PCR	PB CD19+ cells	291/337 (86%)	1/1 (100%)	6/12 (50%)
	(RT) AS-PCR	BM CD19+ cells	177/188 (94%)	-	6/12 (50%)
La-gren et al. 2012	Sanger sequencing	BM	-	-	5/9 (56%)
Mori et al. 2013	AS-PCR	BM	18/25 (72%)	-	-
Ansell et al. 2014	RT-AS-PCR	BM (NS)	34/35 (97%)	0/5 (0%)	-
TOTAL MYD88 L265P positive/total number of patients *			923/1041 (90%)	4/18 (22%)	161/312 (52%)
TOTAL % MYD88 L265P positive *			67-100%	0-100%	10-87%

* only studies on bone marrow samples included

MYD88 L265P

WM versus non-IgM LPL en IgM MGUS



Author	Method	Sample	MYD88 mutation positive patients/ total number of patients (percentage)		
			WM	non-IgM LPL	IgM MGUS
Treon et al. 2012	Sanger sequencing	CD19+ cells BM	49/54 (91%)	3/3 (100%)	2/21 (10%)
Poulain et al. 2013	Sanger sequencing	CD19+ cells BM	53/67 (79%)	-	1/2 (50%)
Jiménez et al. 2013	RT AS-PCR	BM	101 /117 (86%)	0/9 (0%)	27 /31 (87%)
Gachard et al. 2013	Sanger sequencing	BM	18/27 (67%)	-	-
Varettoni et al. 2013	AS-PCR	BM	58/58 (100%)	-	36/77 (47%)
Xu et al. 2013	AS-PCR + RT AS-PCR	CD19+ cells BM	97/104 (93%)	-	13/24 (54%)
Willenbacher et al. 2013	Sanger sequencing	BM	6/7 (86%)	-	-
Odrejka et al. 2013	AS-PCR	BM	13/13 (100%)	-	-
Varettoni et al. 2014	AS-PCR	BM	8/9 (89%)	-	71/136 (52%)
Xu et al. 2014	(RT) AS-PCR	PB CD19+ cells	291/337 (86%)	1/1 (100%)	6/12 (50%)
	(RT) AS-PCR	BM CD19+ cells	177/188 (94%)	-	6/12 (50%)
La-gren et al. 2012	Sanger sequencing	BM	-	-	5/9 (56%)
Mori et al. 2013	AS-PCR	BM	18/25 (72%)	-	-
Ansell et al. 2014	RT-AS-PCR	BM (NS)	34/35 (97%)	0/5 (0%)	-
TOTAL MYD88 L265P positive/total number of patients *			923/1041 (90%)	4/18 (22%)	161/312 (52%)
TOTAL % MYD88 L265P positive *			67-100%	0-100%	10-87%

* only studies on bone marrow samples included

MYD88 L265P

WM versus non-IgM LPL en IgM MGUS



Author	Method	Sample	MYD88 mutation positive patients/ total number of patients (percentage)		
			WM	non-IgM LPL	IgM MGUS
Treon et al. 2012	Sanger sequencing	CD19+ cells BM	49/54 (91%)	3/3 (100%)	2/21 (10%)
Poulain et al. 2013	Sanger sequencing	CD19+ cells BM	53/67 (79%)	-	1/2 (50%)
Jiménez et al. 2013	RT AS-PCR	BM	101 /117 (86%)	0/9 (0%)	27 /31 (87%)
Gachard et al. 2013	Sanger sequencing	BM	18/27 (67%)	-	-
Varettoni et al. 2013	AS-PCR	BM	58/58 (100%)	-	36/77 (47%)
Xu et al. 2013	AS-PCR + RT AS-PCR	CD19+ cells BM	97/104 (93%)	-	13/24 (54%)
Willenbacher et al. 2013	Sanger sequencing	BM	6/7 (86%)	-	-
Odrejka et al. 2013	AS-PCR	BM	13/13 (100%)	-	-
Varettoni et al. 2013	AS-PCR	BM	8/9 (89%)	-	71/136 (52%)
Xu et al. 2014	(RT) AS-PCR	PB CD19+ cells	291/337 (86%)	1/1 (100%)	6/12 (50%)
	(RT) AS-PCR	BM CD19+ cells	177/188 (94%)	-	6/12 (50%)
La-gren et al. 2012	Sanger sequencing	BM	-	-	5/9 (56%)
Mori et al. 2013	AS-PCR	BM	18/25 (72%)	-	-
Ansell et al. 2014	RT-AS-PCR	BM (NS)	34/35 (97%)	0/5 (0%)	-
TOTAL MYD88 L265P positive/total number of patients *			923/1041 (90%)	4/18 (22%)	161/312 (52%)
TOTAL % MYD88 L265P positive *			67-100%	0-100%	10-87%

* only studies on bone marrow samples included

MYD88 L265P

WM versus andere lymfproliferatieve aandoeningen



MYD88 mutation positive patients/ total number of patients (percentage)

Author	Method	Sample	WM	sMZL	nMZL	MZL NS	MALT	MM	CLL	healthy donors	HCL	MCL	FL
Treon et al. 2012	Sanger sequencing	CD19+ cells BM	49/54 (91%)	1/21 (5%)	1/5 (20%)	-	-	0/10 (0%)	-	0/15 (0%)	-	-	-
Poulain et al. 2013	Sanger sequencing	CD19+ cells BM	53/67 (79%)	-	-	1/16 (6%)	-	0/5 (0%)	0/9 (0%)	-	0/10 (0%)	1/23 (4%)	
Jiménez et al. 2013	RT AS-PCR	BM	101 /117 (86%)	3/14 (21%)	-	-	-	0/24 (0%)	0/39 (0%)	0/38 (0%)	0/35 (0%)	-	-
Gachard et al. 2013	Sanger sequencing	BM	18/27 (67%)	2/53 (4%)	0/11 (0%)	-	2/28 (7%)	-	-	-	-	-	-
Varettoni et al. 2013	AS-PCR	BM	58/58 (100%)	5/84 (6%)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Xu et al. 2013	AS-PCR + RT AS-PCR	CD19+ cells BM	97/104 (93%)	2/20 (10%)	-	-	-	0/14 (0%)	1/26 (4%)	0/40 (0%)	-	-	-
Willenbacher et al. 2013	Sanger sequencing	BM	6/7 (86%)	-	-	-	-	0/4 (0%)	-	-	-	-	-
Odrejka et al. 2013	AS-PCR	BM	13/13 (100%)	0/6 (0%)	-	-	-	0/8 (0%)	0/9 (0%)	-	1/13 (8%)	0/7 (0%)	0/6 (0%)
Varettoni et al. 2013	AS-PCR	BM	8/9 (89%)	-	-	1/2 (50%)	-	-	-	-	-	-	-
Xu et al. 2014	(RT) AS-PCR	PB CD19+ cells	291/337 (86%)	-	-	-	-	-	-	0/40 (0%)	-	-	-
	(RT) AS-PCR	BM CD19+ cells	177/188 (94%)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
La-gren et al. 2012	Sanger sequencing	BM	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mori et al. 2013	AS-PCR	BM	18/25 (72%)	-	-	-	-	0/38 (0%)	-	-	-	-	-
Ansell et al. 2014	RT-AS-PCR	BM (NS)	34/35 (97%)	3/35 (8%)	1/21 (5%)	-	1/23 (4%)	-	-	0/5 (0%)	-	-	-
Wang et al. 2011	Whole-genome sequencing	BM CD19+ cells	-	-	-	-	-	6/91 (7%)	-	-	-	-	-
TOTAL MYD88 L265P positive/total number of patients *			923/1041 (90%)	16/233 (7%)	2/37 (5%)	2/18 (11%)	3/51 (6%)	0/103 (0%)	7/174 (4%)	0/138 (0%)	1/48 (2%)	0/17 (0%)	1/29 (3%)
TOTAL % MYD88 L265P positive *			67-100%	0-21%	0-20%	6-50%	4-7%	0%	0-7%	0%	0-8%	0%	0-4%

MYD88 L265P

WM versus andere lymfproliferatieve aandoeningen



MYD88 mutation positive patients/ total number of patients (percentage)

Author	Method	Sample	WM	sMZL	nMZL	MZL NS	MALT	MM	CLL	healthy donors	HCL	MCL	FL
Treon et al. 2012	Sanger sequencing	CD19+ cells BM	49/54 (91%)	1/21 (5%)	1/5 (20%)	-	-	0/10 (0%)	-	0/15 (0%)	-	-	-
Poulain et al. 2013	Sanger sequencing	CD19+ cells BM	53/67 (79%)	-	-	1/16 (6%)	-	0/5 (0%)	0/9 (0%)	-	0/10 (0%)	1/23 (4%)	
Jiménez et al. 2013	RT AS-PCR	BM	101 /117 (86%)	3/14 (21%)	-	-	-	0/24 (0%)	0/39 (0%)	0/38 (0%)	0/35 (0%)	-	-
Gachard et al. 2013	Sanger sequencing	BM	18/27 (67%)	2/53 (4%)	0/11 (0%)	-	2/28 (7%)	-	-	-	-	-	-
Varettoni et al. 2013	AS-PCR	BM	58/58 (100%)	5/84 (6%)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Xu et al. 2013	AS-PCR + RT AS-PCR	CD19+ cells BM	97/104 (93%)	2/20 (10%)	-	-	-	0/14 (0%)	1/26 (4%)	0/40 (0%)	-	-	-
Willenbacher et al. 2013	Sanger sequencing	BM	6/7 (86%)	-	-	-	-	0/4 (0%)	-	-	-	-	-
Odrejka et al. 2013	AS-PCR	BM	13/13 (100%)	0/6 (0%)	-	-	-	0/8 (0%)	0/9 (0%)	-	1/13 (8%)	0/7 (0%)	0/6 (0%)
Varettoni et al. 2013	AS-PCR	BM	8/9 (89%)	-	-	1/2 (50%)	-	-	-	-	-	-	-
Xu et al. 2014	(RT) AS-PCR	PB CD19+ cells	291/337 (86%)	-	-	-	-	-	-	0/40 (0%)	-	-	-
	(RT) AS-PCR	BM CD19+ cells	177/188 (94%)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
La-gren et al. 2012	Sanger sequencing	BM	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mori et al. 2013	AS-PCR	BM	18/25 (72%)	-	-	-	-	0/38 (0%)	-	-	-	-	-
Ansell et al. 2014	RT-AS-PCR	BM (NS)	34/35 (97%)	3/35 (8%)	1/21 (5%)	-	1/23 (4%)	-	-	0/5 (0%)	-	-	-
Wang et al. 2011	Whole-genome sequencing	BM CD19+ cells	-	-	-	-	-	6/91 (7%)	-	-	-	-	-
TOTAL MYD88 L265P positive/total number of patients *			923/1041 (90%)	16/233 (7%)	2/37 (5%)	2/18 (11%)	3/51 (6%)	0/103 (0%)	7/174 (4%)	0/138 (0%)	1/48 (2%)	0/17 (0%)	1/29 (3%)
TOTAL % MYD88 L265P positive *			67-100%	0-21%	0-20%	6-50%	4-7%	0%	0-7%	0%	0-8%	0%	0-4%

Vraag1: Waarde MYD88 L265P? Diagnostisch (samenvatting)



MYD88 L265P positief

Waldenström macroglobulinemie
(90%)

MYD88 L265P variabel

IgM MGUS (52%)
Non-IgM lymfoplasmocytair lymfoom
(22%)
Marginale zone lymfoom (5-11%)

MYD88 L265P negatief

(<5% van de patiënten)

Multiple myeloom
IgG/IgA MGUS
Chronische lymfatische leukemie
Hairy cell leukemie
Folliculair lymfoom
Mantelcel lymfoom

MYD88 mutaties in lymfoom biopsies

Primair centraal nerveus systeem
lymfoom (36%)
ABC diffuus grootcellig lymfoom (29%)
primair cutaan DLBCL van het leg-type
(69%)
Burkitt lymfoom (2-5%)

Overzicht

- Diagnostisch
 - Waldenström Macroglobulinemie en IgM MGUS
- Prognostisch
 - IgM MGUS
 - Waldenström macroglobulinemie
- Opvolging therapie

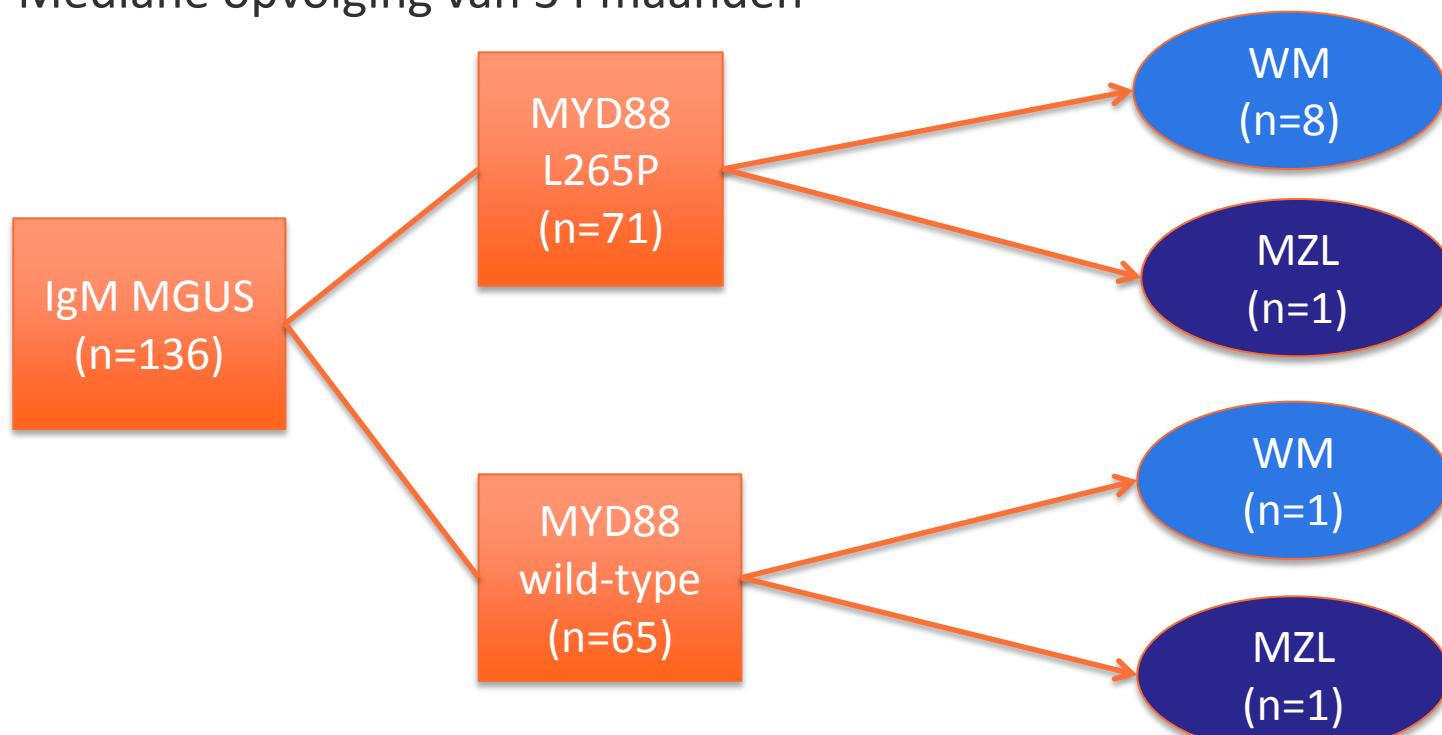
Vraag1: Waarde MYD88 L265P

Prognostische - IgM MGUS

Varettoni et al. 2013

IgM MGUS (n=136)

Mediane opvolging van 34 maanden



Vraag1: Waarde MYD88 L265P

Prognostische - IgM MGUS

Varettoni et al. 2013

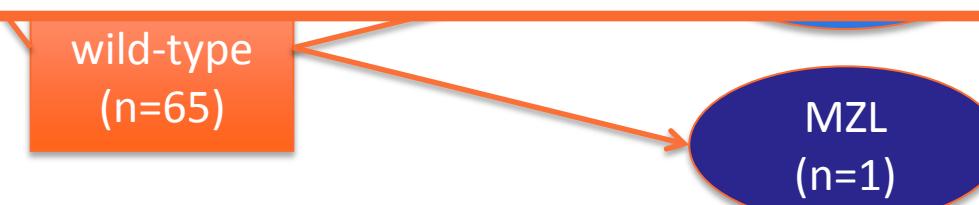
IgM MGUS (n=136)

Mediane opvolging van 34 maanden



5- en 10-jaars cumulatieve **incidentie tot progressie**
significant hoger bij MYD88 L265P tov MYD88 wild-type

MYD88 L265P **independente risicofactor tot progressie**



Vraag1: Waarde MYD88 L265P



Overzicht

- Diagnostisch
 - Waldenström Macroglobulinemie en IgM MGUS
- Prognostisch
 - IgM MGUS
 - Waldenström macroglobulinemie
- Opvolging therapie

Vraag1: Waarde MYD88 L265P

Prognostisch - WM

verschil in evolutie WM bij wild-type MYD88 vs L265P MYD88?

Jiménez et al. 2013 (retrospectief 117 WM patiënten)

- kleiner M-proteïne (1.77 vs 2.72 g/dl, p=0.022)
- meer lymfocytose (24 vs 5%, p=0.006)
- hogere lactaat dehydrogenase spiegel (371 vs 265 UI/L, p=0.002)
- atypisch immunofenotype (CD23-CD27++ FMC7++)
- minder immunoglobuline zware keten variabele gen (IGHV) somatische hypermutatie (57% vs 97%, p=0.012)
- minder IGHV3-23 gen selectie (9 vs 27%, p=0.014)

Kleine verschillen

Geen verschil in

- tijd tot eerste therapie
- antwoord op behandeling
- progressie-vrije overleving en totale overleving

Vraag1: Waarde MYD88 L265P



Overzicht

- Diagnostisch
 - Waldenström Macroglobulinemie en IgM MGUS
- Prognostisch
 - IgM MGUS
 - Waldenström macroglobulinemie
- Opvolging therapie

Vraag1: Waarde MYD88 L265P



Opvolging therapie WM

Xu et al. 2013

7 patiënten opgevolgd gedurende therapie

Kwantitatief MYD88 L265P goede correlatie met beenmerg invasie ($r=0,89$)

Table 1. Comparison of MYD88 L265P before and after treatment using real-time AS-PCR in patients with WM

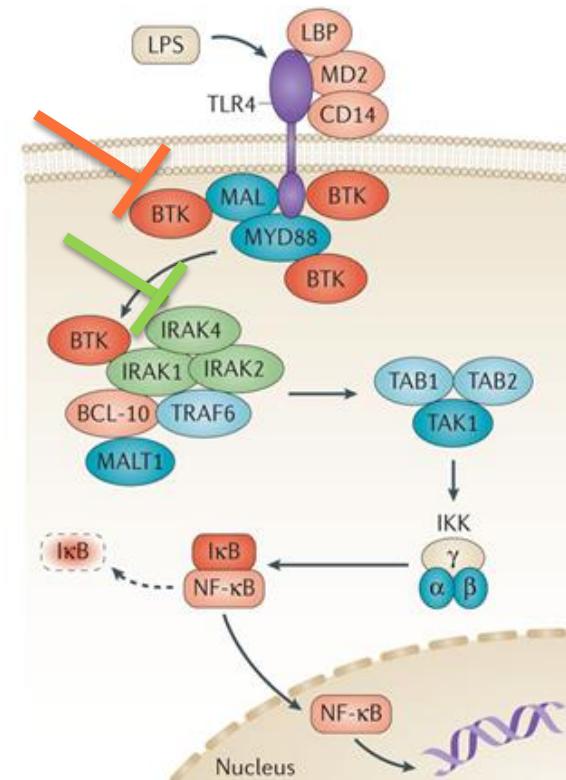
Patient	Age (years)	Gender	Treatment	Pre-/posttherapy BM involved, %	Pre-/posttherapy MYD88 L265P levels	Change in BM involved, %	Change in MYD88 L265P levels, %
A	61	Male	Benda-R	70 (negative)	78.45 (negative)	-100	-100
B	44	Male	R-CD	90 10 2.23	60.73 2.23	-89	-96.33
C	52	Male	R-CD	50 5 19.03	72.12 19.03	-90	-73.61
D	59	Male	Everolimus	95 50 54.15	99.15 54.15	-47	-45.39
E	63	Male	Everolimus	90 30 75.87	96.07 75.87	-67	-21.03
F	70	Male	Everolimus	95 60 87.67	95.93 87.67	-37	-8.61
G	63	Male	Everolimus	20 25 76.67	67.93 76.67	25	12.87

Changes in expression levels for MYD88 L265P were calculated from a standard curve.
Benda-R, bendamustine and rituximab; R-CD, rituximab, cyclophosphamide, and dexamethasone.

Vraag1: Waarde MYD88 L265P

TOEKOMST?

- Ontwikkeling van inhibitoren MYD88 signaalpathway
- Ibrutinib, BTK inhibitor
 - Fase 1 en fase 2 studies veelbelovend behandeling WM
 - Gecombineerd gebruik BTK inhibitoren en IRAK inhibitoren geeft verhoogde inhibitie NF-κB signaaloverdracht → WM cel doding ↑
 - Rechtstreekse inhibitie van MYD88 kan zorgen voor rechtstreekse blokkering van IRAK en BTK signaal pathways
- Patiënten identificeren die baat hebben bij deze therapie
- Opvolging van therapie



- Inleiding
 - Waldenström macroglobulinemie (WM)
 - MYD88
- CAT-vragen
 - Wat is de waarde van MYD88 L265P onderzoek bij Waldenström macroglobulinemie?
 - Welke methode leent zich momenteel het best om MYD88 L265P mutatie op te sporen?
 - Moet MYD88 L265P onderzoek aangeboden worden in AZ Delta Roeselare?
- To-do's
- Besluit

Methode MYD88 L265P onderzoek



Analysetechniek

Detection method MYD88 L265P mutation	Sensitivity	References
Whole-genome sequencing	ND	Treon et al. 2012; Hunter et al. 2014
Sanger sequencing of MYD88 gene	20-30%?	Treon et al. 2012; Poulain et al. 2013, Willenbacher et al. 2013, Mori et al. 2013
RFLP + Sanger sequencing	ND	Gachard et al. 2013
Allele-specific PCR		
a) conventional AS-PCR	0,10%	Varettonni et al. 2013; Ondrejka et al. 2013
b) real-time AS-PCR		
SYBR green	0,08%	Xu et al. 2013; Xu et al 2014;
probe	0,25%	Jiménez et al 2013, Ansell et al. 2014
Melting-curve analysis	5%	Wang et al. 2013

- Inleiding
 - Waldenström macroglobulinemie (WM)
 - MYD88
- CAT-vragen
 - Wat is de waarde van MYD88 L265P onderzoek bij Waldenström macroglobulinemie?
 - Welke methode leent zich momenteel het best om MYD L265P mutatie op te sporen?
 - Moet MYD88 L265P onderzoek aangeboden worden in AZ Delta Roeselare?
- To-do's
- Besluit

Indicaties

- Diagnostisch

Voorlopig enkel bij moeilijk te differentiëren lymfoproliferatieve aandoeningen:
WM versus MZL/(atypische) CLL/ MCL of andere

- Prognostisch

- IgM MGUS

Jonge patiënt met IgM MGUS

- Waldenström macroglobulinemie

voorlopig

- Opvolging therapie

Van belang in toekomst bij introductie inhibitoren MYD88 signaalpathway

Besluit AZ Delta Roeselare

- Verwachte aantal analyses per jaar: +/- 10 BM stalen
- Voorkeursmethode AZ Delta: commerciële RT-allel-specifieke PCR Qiagen
- Kostenraming afhankelijk van het aantal stalen
- Terugbetaling art 33 bis
- Beslissing AZ Delta: analyse doorsturen
herevaluatie na 1 jaar in het licht van nieuwe evidence

- Inleiding
 - Waldenström macroglobulinemie (WM)
 - MYD88
- CAT-vragen
 - Wat is de waarde van MYD88 L265P onderzoek bij Waldenström macroglobulinemie?
 - Welke methode leent zich momenteel het best om MYD L265P mutatie op te sporen?
 - Moet MYD88 L265P onderzoek aangeboden worden in AZ Delta Roeselare?
- To-do's
- Besluit

To Do's



- Doorstuuranalyse creëren en rapportering mogelijk maken
- Ontwikkelingen in het domein opvolgen om in toekomst eventueel zelf aan te bieden in AZ Delta Roeselare

- Inleiding
 - Waldenström macroglobulinemie (WM)
 - MYD88
- CAT-vragen
 - Wat is de waarde van MYD88 L265P onderzoek bij Waldenström macroglobulinemie?
 - Welke methode leent zich momenteel het best om MYD L265P mutatie op te sporen?
 - Moet MYD88 L265P onderzoek aangeboden worden in AZ Delta Roeselare?
- To-do's
- Besluit

MYD88 L265P mutatie

- Tot op heden, meest voorkomende genetische mutatie in **WM (67-100%)** welke ook rol heeft bij het ontstaan van de ziekte (MYD88 onderdeel van IL-1R en TLR signaalpathway voor cel overleving – MYD88 L265P gain-of-function mutatie)
- Ook positief in patiënten met IgM MGUS, MZL, grootcellige B-cel lymfomen (oa ABC-DLBCL, DLBC leg-type)
- Negatief (<5% van de patiënten) in CLL, MCL, MM, HCL, IgA/IgG MGUS, FL
- Diagnostische rol om **WM te onderscheiden van andere IgM gerelateerde lymfoproliferatieve aandoeningen**
- Mogelijke prognostische rol in IgM MGUS
- In toekomst: rol bij selecteren en opvolgen van patiënten behandeld met inhibitoren MYD88 signaalpathway (IRAK en BTK)

Met dank aan



Dr. Elisabeth Moreau

Promotor, klinisch bioloog AZ Delta Roeselare

Dr. Sc. Elke Boone

wetenschappelijk medewerker moleculair laboratorium AZ Delta Roeselare

Dr. Dries Deeren

Dr. Hilde Demuynck

klinisch hematologen AZ Delta Roeselare

Bedankt voor uw aandacht



Vragen?

A black and white cartoon illustration of two men sitting at a bar counter. They are both holding glasses and looking towards each other. The man on the left says, "Maar... wat is een goede vraag?" and the man on the right replies, "Nu vraag je mij wat!"

Maar...
wat is een
goede vraag?

Nu vraag je
mij wat!

Extra slides



Lymphoma	TOTAL MYD88 L265P positive/total number of patients	TOTAL % MYD88 L265P positive
MW	923/1041 (90%)	67-100%
IgM MGUS	161/312 (52%)	10-87%
non-IgM LPL	4/18 (22%)	0-100%
MZL NS	2/18 (11%)	6-50%
sMZL	16/233 (7%)	0-21%
nMZL	2/37 (5%)	0-20%
MALT	3/51 (6%)	4-7%
MM	0/103 (0%)	0%
CLL	7/174 (4%)	0-7%
HCL	1/48 (2%)	0-8%
FL	1/29 (3%)	0-4%
MCL	0/17 (0%)	0%
IgG/IgA MGUS	0/34 (0%)	0%
AL	0/6 (0%)	0%
CLPD	3/52 (4%)	4%
healthy donors	0/138 (0%)	0%

Fifty-nine percent of 382 patients with a lymphoid neoplasm and an associated IgM monoclonal protein consisted of lymphoplasmacytic/lymphoma WM. The remainder represented CLL/small lymphocytic lymphoma (20%), marginal zone lymphoma (7%), follicular lymphoma (5%), mantle cell lymphoma (3%), diffuse large B-cell lymphoma (2%), and miscellaneous (4%) (47). An M protein was detected in seven of 26 patients (27%) with extranodal marginal-zone lymphoma (48).

DD WM en MZL (marginale zone lymfoom)

- Moeilijk
- MZL in WHO classificatie onderverdeeld in drie types
 - Splenisch MZL (SLVL)
 - Nodaal MZL
 - Extranodaal of mucosa geassocieerd MZL (MALT)

	splenic MZL	nodal MZL	mucosa-associated lymphoid tissue (MALT)
Synonym	SLVL	-	extranodal MZL
Epidemiology (% of lymphoid neoplasms)	<2%	1,5-1,8%	7-8%
Primary involved site	spleen	lymph node	mucosa-associated lymphoid tissue (GI 50%)
Bone marrow involvement	67-100%	0-62% (+/- 30%)	2-20%
Peripheral blood	often	10-24%	?
Splenomegaly	100%	0%	10-20%
Liver involvement	15%	no	1%
Lymphadenopathy	extremely uncommon	yes	15-20% (not multifocal)
Extranodal infiltration	Extremely uncommon	no	yes
IgM paraprotein	30-45%	6-33%	30%
Clinical course	indolent	indolent	indolent

Diagnose - histologie

- Intertrabecular pattern of bone marrow infiltration

In praktijk moeilijk om histopathologisch vorm van lymfoplasmocytaire infiltratie te onderscheiden tussen WM en MZL

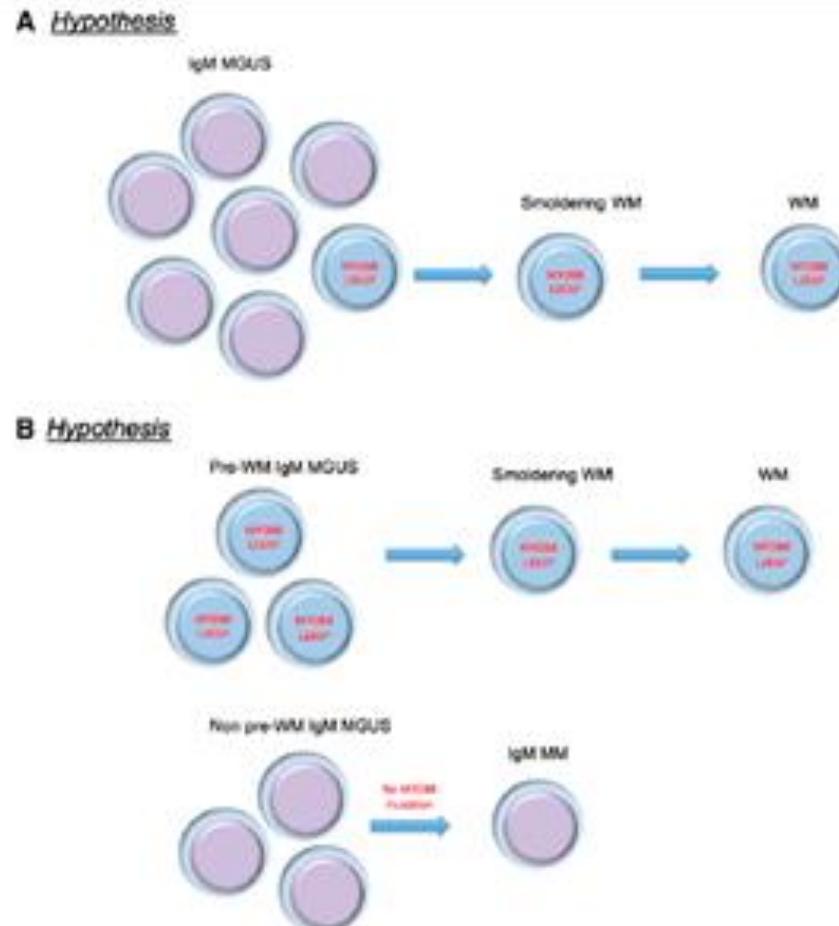
BM histology	sMZL	WM	
nodular paratrabecular	63%	33%	P=0,001
nodular intertrabecular	78%	24%	P<0,01
sinusal	70%	0%	P<0,01
interstitial	37%	82%	P<0,01
medium number of mastcells	2%	7%	p<0,001
CD23+ meshwork of dendritic cells within neoplastic nodules	54%	6%	

Arcaini L, Varettoni M, Boveri E et al. Distinctive clinical and histological features of Waldenström's macroglobulinemia and splenic marginal zone lymphoma. Clin Lymphoma Myeloma Leuk. 2011 Feb;11(1):103-5

Vraag1: Waarde MYD88 L265P?

MYD88 L265P geen onderscheid tussen IgM MGUS en WM

Wat is nu die rol van MYD88 L265P in IgM MGUS?



Vraag1: Waarde MYD88 L265P



Prognostisch – IgM MGUS

Varettoni et al. 2013

IgM MGUS (n=77)

MYD88 L265P (n=36)



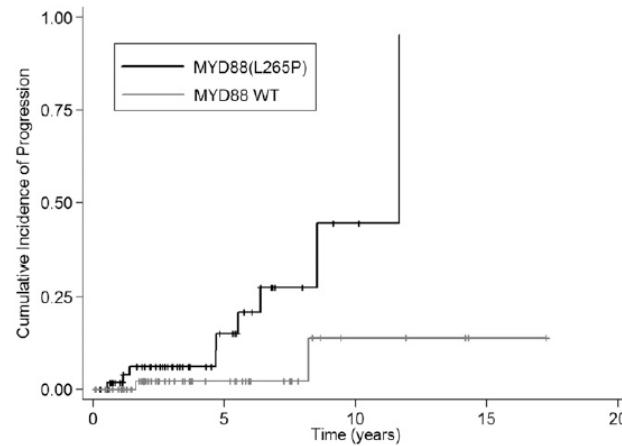
MYD88 wild-type (n=41)

- Significant **hoger risico om te evolueren** tot WM of andere lymfoproliferatieve aandoening ($P=0.047$)
- **Grotere disease burden** op diagnose (hogere IgM, diepere onderdrukking van IgG en IgA, meer Bence-Jones proteïnurie)

Vraag1: Waarde MYD88 L265P

Prognostische - IgM MGUS

Varettoni et al. 2013 (vervolg)



5- en 10-jaars cumulatieve **incidentie tot progressie** significant hoger bij MYD88 L265P tov MYD88 wild-type

MYD88 L265P **independente risicofactor tot progressie**

Indien MYD88 L265P

+ serum M-proteïne > 1,5g/dL

→ hoog risico tot progressie

Vraag1: Waarde MYD88 L265P



Opvolging therapie WM

Opvolging therapie adhv (Response assessment in WM: update from the VIthe International Workshop 2012)

- serum IgM concentratie
- beenmerg evaluatie (LPL invasie)
- extramedullaire ziekte evaluatie (splenomegalie, lymfadenopathie)

Problemen:

- variabele kinetiek van IgM afhankelijk van behandeling
- discrepancies tussen IgM en beenmerg/weefsel respons

Opvolging met MYD88 potentiële rol?

Vraag1: Waarde MYD88 L265P



Besluit

- Diagnostisch

Specifiek voor WM en IgM MGUS (geen onderscheid op basis van MYD88 L265P)

Afwezig bij IgM MM, CLL, MCL, HCL, IgA/IgG MGUS, gezonde vrijwilligers

Aanwezig bij enkele gevallen MZL, non-IgM LPL en grootcellige lymfomen (AMC DLBCL, DLBC leg-type) → opletten bij interpretatie

- Prognostisch

- IgM MGUS

Independente risicofactor tot progressie naar WM of andere lymfoproliferatieve ziekte

- Waldenström macroglobulinemie

Geen rol. Ondanks enkele klinische verschillen, geen verschil in tijd tot eerste therapie, antwoord op behandeling, progressie-vrij overleving en totale overleving

- Opvolging therapie

In één studie correlatie ΔCt MYD88 L265P en beenmerginvasie → uitgebreider onderzoek nodig

Methode MYD88 L265P onderzoek



Allel-specifieke PCR

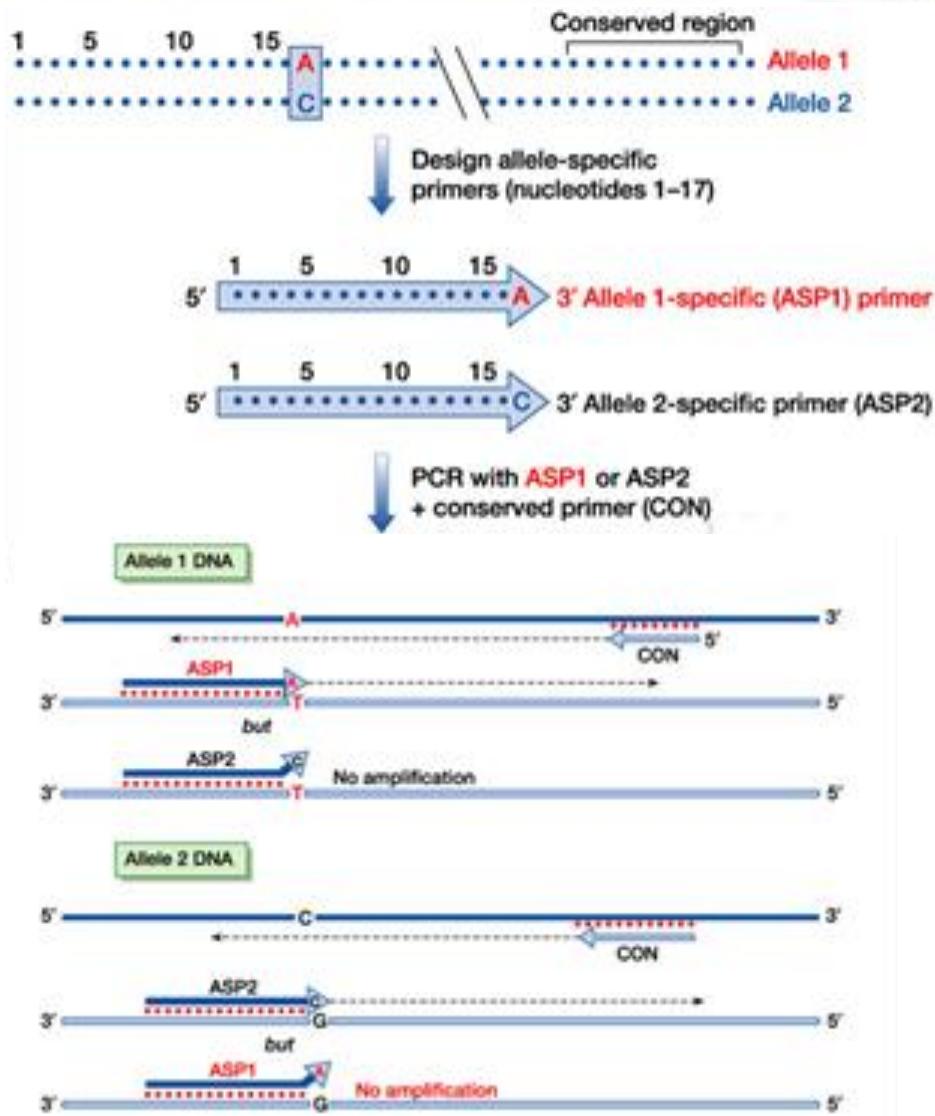


Figure 5-4 part 2 of 2 Human Molecular Genetics, 3rd. (© Garland Science 2004)

Analysetechniek

- Voorkeur AZ Delta:
 - Real-time techniek

real-time allel-specifieke PCR met **SYBR green** detectie
(Xu et al 2013/2014)

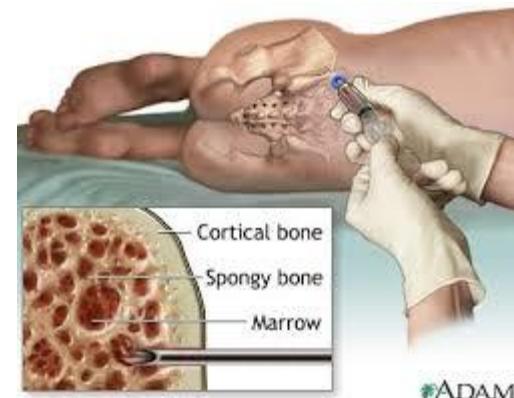


commerciële real-time allel-specifieke PCR (**qBiomarker Somatic Mutation Assay for MYD88_85940 (SABiosciences, Qiagene Xo, Hiden, Germany)**) met allel-specifieke amplificatie met Amplification Refractory Mutation System (ARMS) technologie en **hydrolysis probe** detectie. (Jiménez et al 2013)

real-time PCR met MGB (Minor Groove Binder) **probe detectie (WT en mutant probe)** en LNA (locked nucleic acid) wild-type MYD88 blokkerend oligonucleotide

Staal

- Alle studies op beenmergcellen (al dan niet CD19+ selectie)
- Eén studie MYD88 L265P op perifeer bloed met goede resultaten (doch inferieur aan BM) Xu et al. 2014
- WM primair BM ziekte → BM beste staal



MYD88 L265P in AZ Delta?



Totale Kostprijs per staal (qBiomarker Somatic Mutation Assay for MYD88)

Aantal stalen	Prijs per staal (euro) ¹	Prijs rekeninghoudend met 10% extra "verlies" (euro)	Prijs per staal incl. 21% btw (euro)	Totaal prijs per staal incl. werkuren ² (euro)
1	67,7	74,5	90,1	253,1
2	43,2	47,5	57,5	139,0
3	35,0	38,5	46,6	100,9
4	30,9	34,0	41,1	81,9
5	28,5	31,3	37,9	70,5
6	26,8	29,5	35,7	62,9
7	25,7	28,2	34,2	57,4
8	24,8	27,3	33,0	53,4

¹ Alle reagentia en materiaal voor extractie, PCR en IQC.

² Werkuren voor het inzetten van de stalen + verwerken van de resultaten door MLT en wetenschappelijk medewerker

Terugbetaling

artikel 33 bis

588453-588464 *Opsporen van verworven chromosoom of genafwijkingen (met uitsluiting van immuunglobuline- of een T-celreceptorgenherschikking), door middel van een moleculair biologische methode: in de diagnostische investigatiefase van een chronische lymfoïde aandoening (non-Hodgkin lymfoom, chronische lymfatische leukemie, multiple myeloom), exclusief een acute leukemie, Burkitt's lymfoom of T- of B-lymfoblastisch lymfoom en refractaire anemie met blastenoverproductie (RAEB) (Diagnoseregel 1,6: aanrekening maximaal 3x per diagnostische investigatiefase)).*

B3000 wat overeenkomt met **127.75 euro**.

Indien de patiënt niet gehospitaliseerd is en geen rechthebbende is met voorkeursregeling is er **8.68 euro** voor rekening van de patiënt.

Bij hoeveel patiënten kan MYD88 L265P meerwaarde zijn?

- Tussen 1 januari 2014 en 1 mei 2014:
2 gevallen waar MYD88 L265P nuttig was om diagnose te ondersteunen
- Verwacht: +/- 10 MYD88 L265P bepalingen per jaar

CASUS

- Casus 1 Man 54J
 - VG: december 2013: auto-immuun hemolytische anemie en IgM paraproteïne 1,4 g/l. Beenmerg kleine populatie klonale B-cellen. CLL-score 4/5.
 - Maart 2014: toenemende verzwakking + rugpijn + opgelopen paraproteïne 4,0g/l
 - BM:
 - 68% lymfocyten met deels lymfoplasmocytair voorkomen, hoog normaal aantal plasmacellen.
 - Flow: kappa zw+/CD5zw+/CD10-/CD20+/CD23+/CD38-/CD79b+/CD200+ met CLL score van 4/5.



MYD88 L265P positief