

**An autochthonous mouse model of *MYD88* p.L265P- and *BCL2*-driven diffuse large B cell lymphoma**

Autor: Gero Knittel

Prüfungsdatum: 11.01.2019

Erstprüfer: Prof. Dr. Björn Schumacher

Zweitprüfer: Prof. Dr. Manolis Pasparakis

Schlagwörter: Lymphom, Diffus-großzelliges B-Zell Lymphom, Mausmodell, *MYD88*, DLBCL

Keywords: Lymphoma, diffuse large B cell lymphoma, mouse model, *MYD88*, DLBCL

Zusammenfassung deutsch:

Das Adapterprotein *MYD88* spielt eine essentielle Rolle bei der Aktivierung von NFκB durch den Toll-like-Rezeptor Signalweg. Mutationen in *MYD88*, insbesondere die Punktmutation p.L265P, wurden in verschiedenen B-Zell-Tumoren gefunden, unter anderem im diffus-großzelligen B-Zell-Lymphom (engl. diffuse large B cell lymphoma, DLBCL). Etwa 18% aller DLBCL-Fälle sind *MYD88*-mutiert, wobei diese Mutationen stark im sogenannten "Activated B cell-like" (ABC) Subtypus von DLBCL angereichert sind. Der Großteil dieser Mutationen in *MYD88* resultieren in der Variante p.L265P, für welche gezeigt wurde, dass sie zu Stimulus-unabhängiger NFκB-Aktivierung führt.

Das Ziel dieser Thesis war, die Rolle der *MYD88* p.L265P Mutation in der Lymphomagenese zu untersuchen. Es wurde ein Mausmodell generiert, welches die Cre-vermittelte konditionale Expression von *Myd88* p.L252P (dem murinen Ortholog der humanen *MYD88* p.L265P-Variante) vom endogenen Locus erlaubt.

Da die Überexpression von *BCL2* ein häufiges Merkmal von ABC DLBCL ist, wurde dieses *Myd88*-Allel (abgekürzt "M") mit einem *BCL2*-Überexpressionsallel (abgekürzt "B") kombiniert. Beide Allele wurden dann durch B-Zell-spezifische Expression von *Cre* (durch Verwendung des *CD19:Cre*-Allels, abgekürzt "C") aktiviert. Die generierten MBC-Mäuse zeigen eine gesteigerte Aktivität des B-Zell-Kompartiments, angezeigt durch eine erhöhte Anzahl aktiver Keimzentren, Keimzentrumserfahrener B-Zell-Spezies und Immunglobulinen im Serum. Diese Überaktivierung ist zumindest teilweise auf den Verlust der Selbsttoleranz zurückzuführen, da MBC-Tiere erhöhte Konzentrationen selbstreaktiver Antikörper aufweisen. In MC- und BC-Tieren wurden ebenfalls vermehrt autoreaktive Immunglobuline gefunden, wenngleich in einem geringeren Ausmaß.

Immunisierungsexperimente zeigten, dass während *Myd88* p.L252P primär die Antwort auf thymusunabhängige Antigene verstärkt, *BCL2* Überexpression größere Effekte in der Immunantwort auf thymusabhängige Antigene zeigt. Beide Mutationen kooperieren bei der Generierung der stärksten humoralen Antworten in MBC-Tieren.

Schlussendlich entwickeln MBC-Tiere Tumore, primär im Mesenterium. Diese Läsionen sind klonal und entsprechen morphologisch DLBCL mit großen, blastären Zellen mit dem Immunophänotyp einer keimzentrumserfahrenen Zelle (*BCL6*<sup>-/</sup> *IRF4*<sup>+/</sup> *B220*<sup>-/</sup> *CD138*<sup>+</sup>). Transkriptionsprofile der Tumore zeigten eine signifikante Anreicherung ABC DLBCL-assoziiierter Genexpressionssignaturen im Vergleich zu *Ep:Myc*-getriebenen Läsionen. Diese MBC-Tumore sprechen auf *BCL2*-Inhibierung durch den Wirkstoff ABT-199 *in vitro* und *in vivo* an. Hemmung von *IRAK4* durch zwei unterschiedliche pharmakologische Substanzen zeigte mäßige Effekte *in vitro*, die aber nicht in einem Überlebensvorteil *in vivo* resultierten. Außerdem zeigen MBC-

Tumore eine höhere Expression von PD-L1 als *Eμ:Mye*-Tumore, und Behandlung mit einem α-PD-1-Antikörper hatte wachstumsstabilisierende Effekte auf den Tumor. Zusammengefasst wurde ein neues, von *Myd88* p.L252P und *BCL2*-Überexpression getriebenes, Mausmodell für ABC DLBCL generiert. Der Tumorbildung geht ein hyperaktiver Zustand des B-Zell-Kompartiments voraus, charakterisiert durch gesteigerte humorale Antworten auf exogenes Antigen sowie den Verlust von Selbsttoleranz. MBC-Tumore sprechen auf die Inhibierung von *BCL2* sowie der PD-L1/PD-1-Interaktion an, was eine mögliche Anwendbarkeit dieser Behandlungen in der Therapie von ABC DLBCL suggeriert.

Abstract english:

The adaptor protein MYD88 is critical to relay activation of Toll-like receptor signaling to NFκB activation. *MYD88* mutations have been described in different B cell malignancies, including diffuse large B cell lymphoma (DLBCL). Around 18% of DLBCL cases are mutated in *MYD88*, and these cases are strongly enriched in the activated B cell-like (ABC) subtype of DLBCL. The majority of these mutations represent the p.L265P point mutation, which has been shown to cause stimulus-independent signaling, resulting in NFκB activation.

The aim of this study was to investigate the role of the p.L265P mutation in lymphomagenesis. A mouse model was generated, where Cre-mediated recombination leads to the conditional expression of *Myd88* p.L252P (the orthologous position of the human *MYD88* p.L265P mutation) from the endogenous locus.

This *Myd88* allele (abbr. M) was combined with a *BCL2* overexpression allele (abbr. B), as *BCL2* overexpression is a common feature of ABC DLBCL, and both alleles were activated B cell-specifically with *CD19:Cre* (abbr. C). These MBC mice show a hyperreactive B cell compartment, indicated by increased numbers of germinal centers, post-germinal center B cell species and serum immunoglobulins. This hyperactivation is, at least in part, the result of a loss of self-tolerance, as MBC animals show elevated levels of self-reactive antibodies. Elevated levels of autoreactive immunoglobulins were also found in MC and BC animals, albeit to a lower extent.

Immunization experiments revealed that whereas *Myd88* p.L252P greatly enhances the response to thymus-independent antigen, the effects of *BCL2* overexpression are stronger in response to thymus-dependent antigen, and both mutations cooperate in generating the strongest responses in MBC animals.

Ultimately, MBC animals develop tumors, mainly in the mesenteric area. These lesions were shown to be clonal, and they morphologically resemble DLBCL. The infiltrates consisted of large blastoid cells with a post-germinal center immunophenotype (*BCL6*<sup>-</sup>/*IRF4*<sup>+</sup>/*B220*<sup>-</sup>/*CD138*<sup>+</sup>). Compared to *Eμ:Mye*-driven lesions, the tumor transcription profiles were enriched for ABC DLBCL gene expression signatures. These MBC tumors were exquisitely sensitive to inhibition of *BCL2* by ABT-199 in vitro and in vivo. Inhibition of *IRAK4* by two experimental compounds showed some effect on cell viability in vitro, which did not translate into a survival benefit in vivo. MBC tumors expressed PD-L1 at elevated levels, compared to *Eμ:Mye* tumors and treatment with an α-PD1 antibody had stabilizing effects on tumor growth.

Taken together, a novel mouse model for ABC DLBCL-like disease, driven by *Myd88* p.L252P and *BCL2* overexpression, was established. Tumor formation is preceded by a hyperactivated state characterized by exaggerated responses to exogenous antigen and the break of self tolerance. MBC tumors are sensitive to the inhibition of *BCL2* by ABT-199 and respond to immune checkpoint blockade by α-PD1 treatment, suggesting these treatments as potential new strategies in the therapy of ABC DLBCL.