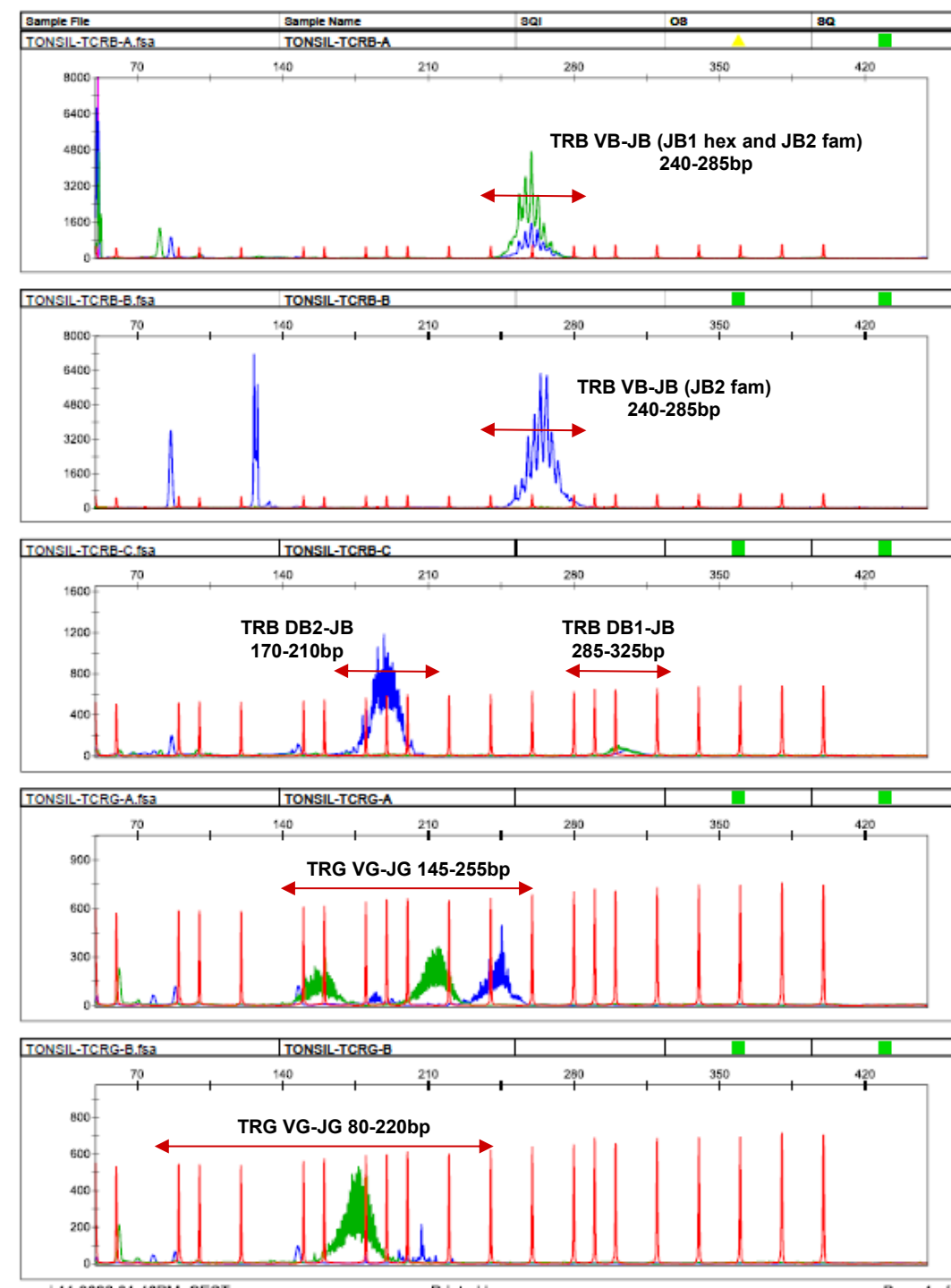
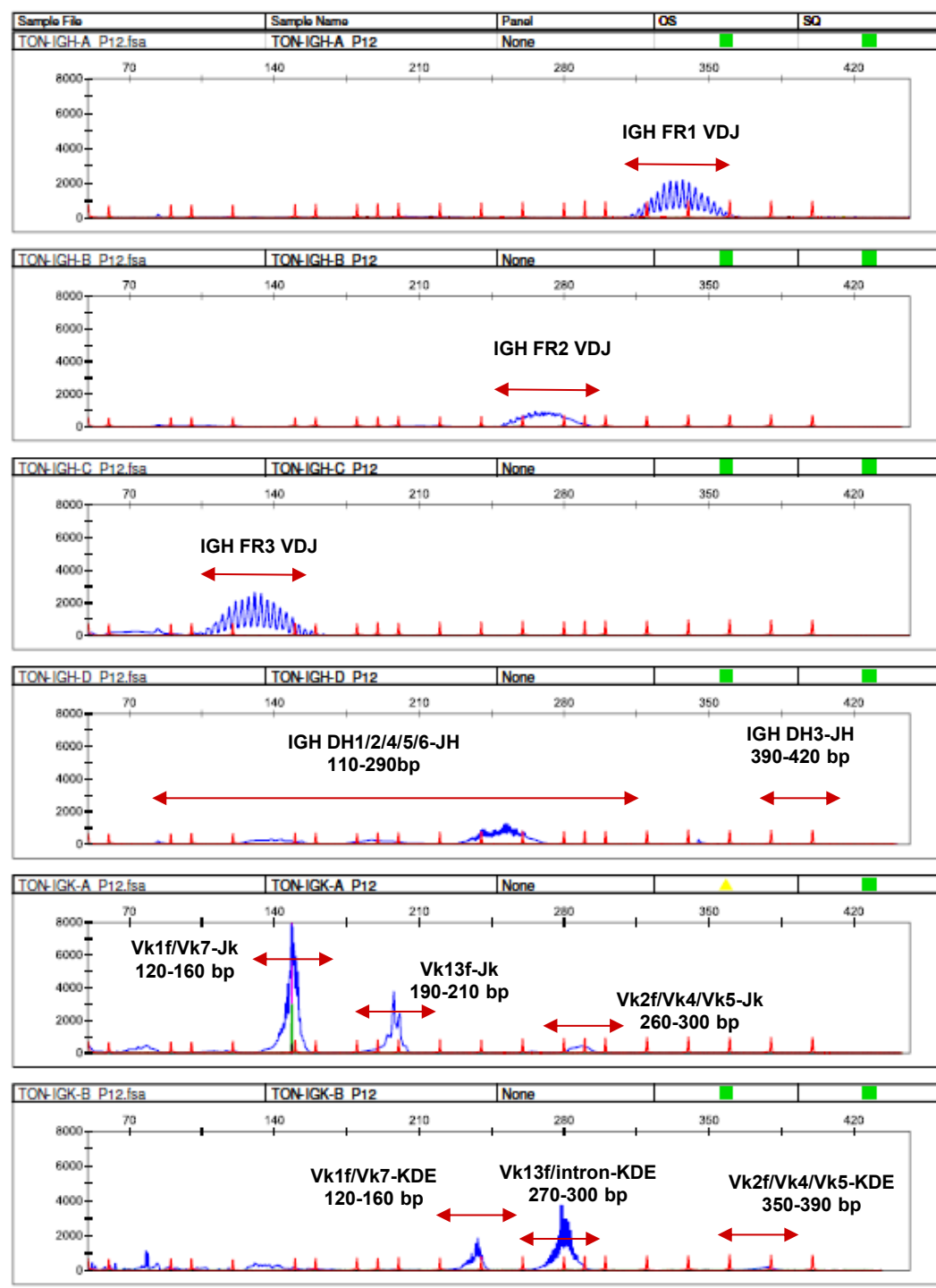


Interpretation of 'GeneScan' Clonality Analysis (IG and TR) in lymphoproliferative disorders



Voorwaarden voor goede interpretatie van klonaliteitsanalyses

- Goede kennis van de genetische opbouw van de IG en TR genherschikkingen
- Goede kennis van de setup van de verschillende PCR-reacties en de mogelijke technische pitfalls:
 - effect van staalkwaliteit en/of staaltype
 - effect van analyse instellingen
 - specifieke pieken
 - effect van somatische hypermutatie bij IGH
 - verschillende pieken van zelfde herschikking
 - Cross-annealing van primers
- Goede kennis van het normale B- of T-cel repertoire in verschillende weefsels

Europese Richtlijn (Langerak et al., Leukemia 2012)

DUTCH LANGUAGE TABLES

Europese richtlijn voor interpretatie en rapportage van Ig / TCR klonaliteitsanalyses bij verdachte lymfoproliferaties

Anton W. Langerak¹, Patricia J.T.A. Groenen²

¹ Dept. of Immunology, Erasmus MC, University Medical Center, Rotterdam, The Netherlands

² Dept. of Pathology, Radboud University Nijmegen Medical Center, Nijmegen, The Netherlands

Original publication

EuroClonality / BIOMED-2 guidelines for interpretation and reporting of Ig/TCR clonality testing in suspected lymphoproliferations.

Anton W. Langerak *, Patricia J.T.A. Groenen, Monika Brüggemann, Kheira Beldjord, Cristiana Bellan, Lisa Bonello, Elke Boone, Ian Carter, Mark Catherwood, Frederic Davi, Marie-Hélène Delfau-Larue, Tim Diss, Paul A.S. Evans, Paula Gameiro, Ramon Garcia Sanz, David Gonzalez, David Grand, Åsa Håkansson, Michael Hummel, Hongxiang Liu, Luis Lombardia, Elizabeth A. Macintyre, Ben Milner, Santiago Montes-Moreno, Ed Schuurin, Marcel Spaargaren, Elizabeth Hodges, Jacques J.M. van Dongen

Leukemia 2012;26:2159-2172; * a.langerak@erasmusmc.nl

¹
When using these Tables, please refer to www.euroclonality.org and to the original publication in which the English version of the Tables is published: Langerak AW, et al., *Leukemia* 2012;26:2159-2172

Europese Richtlijn (Langerak et al., Leukemia 2012)

Tabel 3 Typische Ig / TCR patronen bij verschillende immunobiologische condities

<i>Immunobiologische conditie</i>	<i>Voorbeelden</i>	<i>Verwacht patroon</i>
- geen lymfocyten	- niet-hematopoietisch weefsel	- geen pieken / banden, zonder achtergrond ^a
- weinig lymfocyten	- klein infiltraat, klein monster (bijv. huid)	- (kleine) pieken / banden, <u>niet reproduceerbaar</u>
- (immuun)activatie met dominante klonen	- dominante immuunrespons (bijv. infectie, autoimmunitet)	- (meerdere) pieken / banden, <u>reproduceerbaar</u>
- reactieve lymfocyten	- brede immuunrespons	- (irregulaire) Gausse curve / smeer
- monoklonaliteit (mono-/bi-allelisch)	- leukemie, lymfoom, (kloon zonder duidelijke betekenis) ^b	- 1 of 2 pieken / banden ^c
- monoklonaliteit + polyklonale achtergrond	- idem, (kleine) kloon temidden van normale / reactieve lymfocyten ^b	- 1 of 2 pieken / banden ^c + Gausse curve / smeer
- monoklonaliteit (somatisch gemuteerd)	- idem, (post-)folliculaire B-celproliferatie	- geen pieken / banden ^d (of Gausse curve / smeer) ^a

^a Niet-specifieke piek(en) / banden kunnen aanwezig zijn

^b Kloon zonder duidelijke betekenis wordt meestal gezien bij situaties met enige achtergrond van polyklonale cellen

^c Aantal pieken / banden is afhankelijk van competitie in PCR reactie; In geval van IGK en TCRB loci kunnen tot 4 producten detecteerbaar zijn binnen 1 kloon.

^d Betreft vals-negatief resultaat

Interpretatie per tube

Tabel 4 EuroClonality uniform scoringssysteem m.b.t. technische beschrijving

<i>Type patron per tube (in duplo)</i>	<i>Technische beschrijving per tube</i>	<i>Optioneel: meer gedetailleerde technische beschrijving^a</i>
- geen pieken / banden (maar: slechte DNA kwaliteit)	- geen (<u>specifiek</u>) product, slecht DNA	
-geen pieken / banden (zonder achtergrond)	- geen (<u>specifiek</u>) product	- <u>niet-specifiek</u> product (... nt)
- 1 of 2 <u>reproduceerbare</u> klonale pieken / banden ^b	- klonaal (...nt)	- zwak klonaal (... nt) - klonaal (...nt) +polyklonale achtergrond (Gausse curve / smeer)
- 1 of 2 <u>niet-reproduceerbaar</u> (duidelijke) pieken / banden ^b	- pseudoklonaal	
- meerdere (n ≥3) <u>niet-reproduceerbare</u> pieken / banden ^b	- meerdere producten	
- meerdere (n ≥3) <u>reproduceerbare</u> pieken / banden ^b	- meerdere producten (n=...) (...nt)	
- Gausse curve / smeer ^c (met of zonder kleine reproduceerbare pieken / banden ^b)	- polyklonaal (niet klonaal ^c)	- onregelmatig polyklonaal (niet klonaal ^c)
- patroon dat niet past bij de bovenstaande beschrijvingen	- niet te beoordelen ^d	

Afkortingen: nt, nucleotide

^a Meer gedetailleerde technische beschrijving opties kunnen door de gebruiker worden aangevuld; enkele mogelijke voorbeelden zijn aangegeven

^b Bij HD analyse komt aantal banden en aantal PCR producten niet noodzakelijkerwijs overeen, omdat extra heteroduplexen tussen producten kunnen worden gevormd

^c Bij HD analyse kan een polyklonale smeer minder goed detecteerbaar zijn, ondanks specifiek product in de agarose gel; dit wordt gescoord als "niet klonaal"

^d In minder dan 5% van de PCR resultaten geen goede technische beschrijving mogelijk

Finale moleculaire interpretatie (alle tuben samen)

Tabel 5 EuroClonality uniform scoringssysteem m.b.t. moleculaire conclusie

<i>Overall technische beschrijving Ig/TCR</i>	<i>Moleculaire interpretatie / conclusie</i>	<i>Optioneel: meer gedetailleerde moleculaire interpretatie^a</i>
- geen (<u>specifiek</u>) product, slecht DNA	- niet te beoordelen, vanwege slechte DNA kwaliteit	
- geen (<u>specifiek</u>) product	- geen herschikkingen in Ig/ TCR targets detecteerbaar	
- klonaal (...nt) ^f	- klonaliteit detecteerbaar	- klonaliteit detecteerbaar (biallelische producten) - klonaliteit detecteerbaar (biklonaliteit) - klonaliteit detecteerbaar (zwak klonaal product) - klonaliteit detecteerbaar (geïsoleerd klonaal product) - klonaliteit detecteerbaar (terughoudendheid vereist, met advies voor follow-up analyse / nieuw monster) - klonaliteit detecteerbaar met B- / T-cel achtergrond
- pseudoklonaal / meerdere <u>niet-reproduceerbare</u> producten	- geen klonaliteit detecteerbaar, passend bij geringe hoeveelheid template	
- meerdere <u>reproduceerbare</u> producten (n≥3) ^b	- oligoklonaliteit / meerdere klonen detecteerbaar	- dominante kloon in oligo/polyklonale achtergrond
- polyklonaal (niet klonaal ^c)	- polyklonaliteit detecteerbaar (geen klonaliteit detecteerbaar ^c)	- polyklonaliteit detecteerbaar plus kleine kloon zonder duidelijke betekenis ^d
- niet te beoordelen	- niet te beoordelen ^e	

^a Meer gedetailleerde moleculaire interpretatie opties kunnen door de gebruiker worden aangevuld; enkele mogelijke voorbeelden zijn aangegeven

^b In geval van IGK en TCRB loci kunnen tot 4 producten detecteerbaar zijn binnen 1 kloon

^c Bij HD analyse kan een polyklonale smeer minder goed detecteerbaar zijn, ondanks specifiek product in de agarose gel; dit wordt gescoord als "niet klonaal"

^d Voor gevallen met kleine reproduceerbare pieken / banden in een polyklonale achtergrond

^e In minder dan 5% van de gevallen geen goede moleculaire interpretatie mogelijk

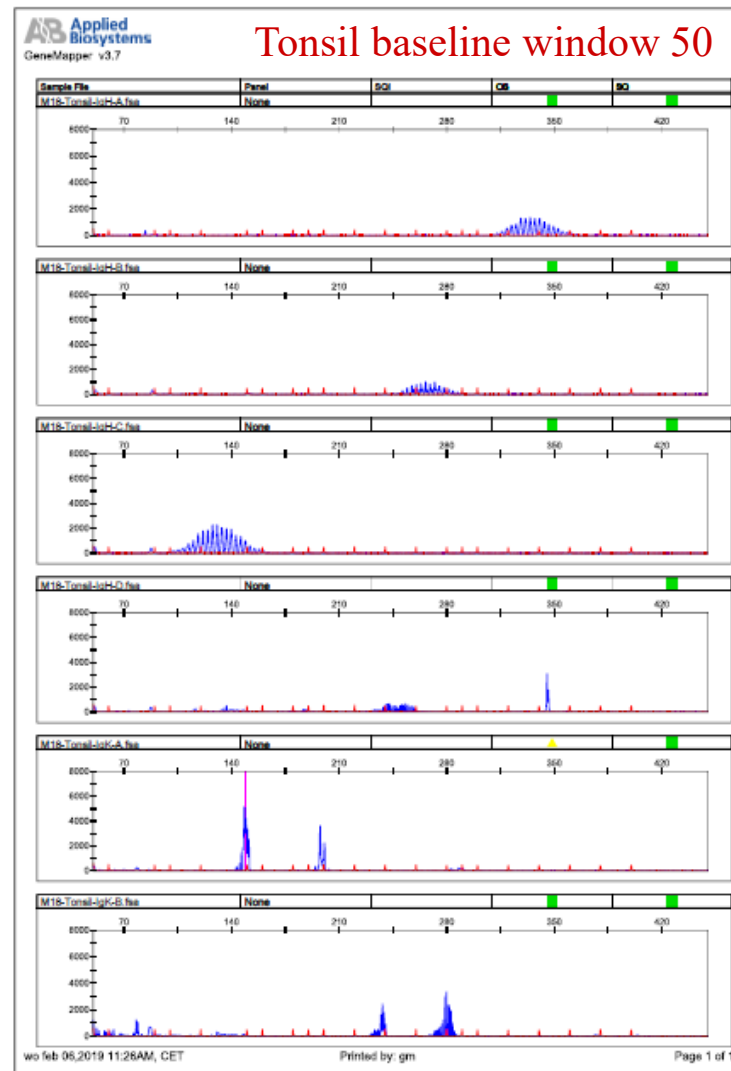
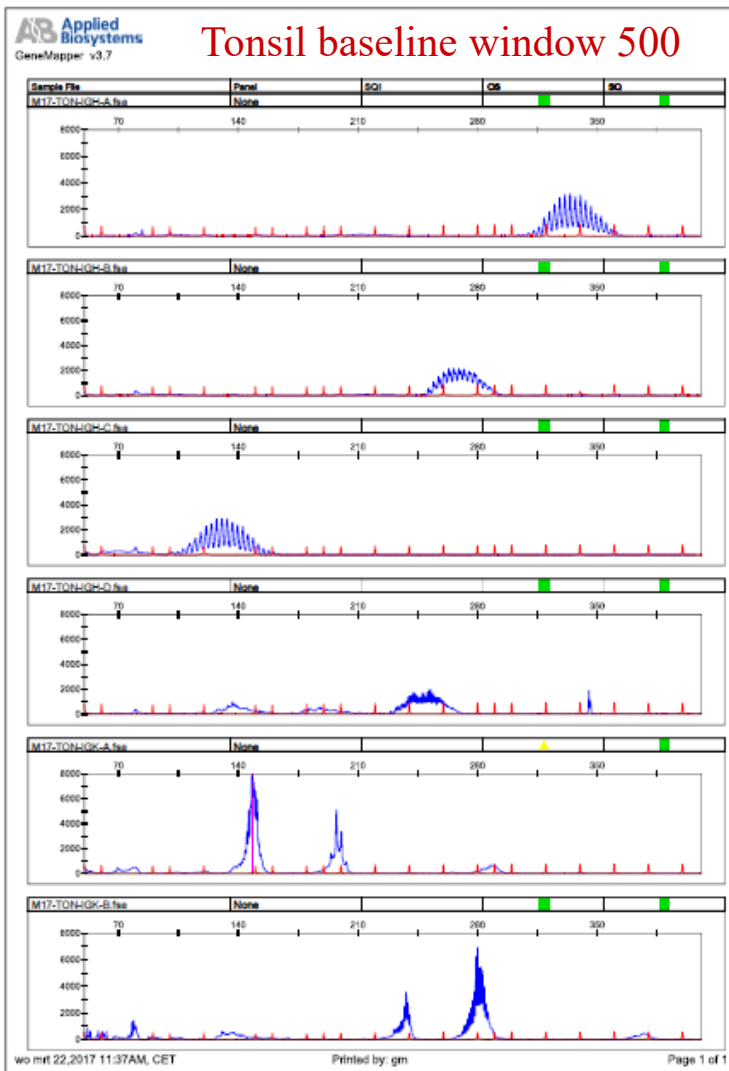
^f Klonale pieken / banden hoeven niet noodzakelijkerwijs in elk Ig/TCR target aanwezig te zijn om tot de moleculaire conclusie "klonaliteit gedetecteerd"

Interpretatie per tube: invloed analyse instellingen en/of toestel/polymeer

- Gausse curve / smeer^c (met of zonder kleine reproduceerbare pieken / banden^b)

- polykloonaal (niet klonaal^c)

- onregelmatig polykloonaal (niet klonaal^c)

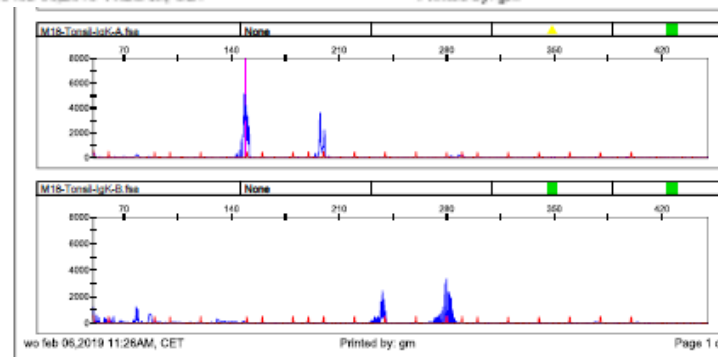
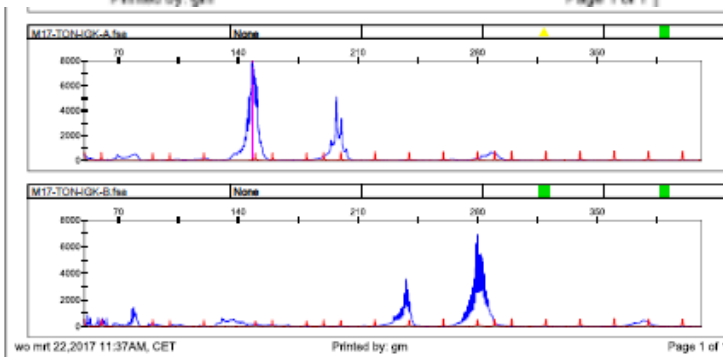
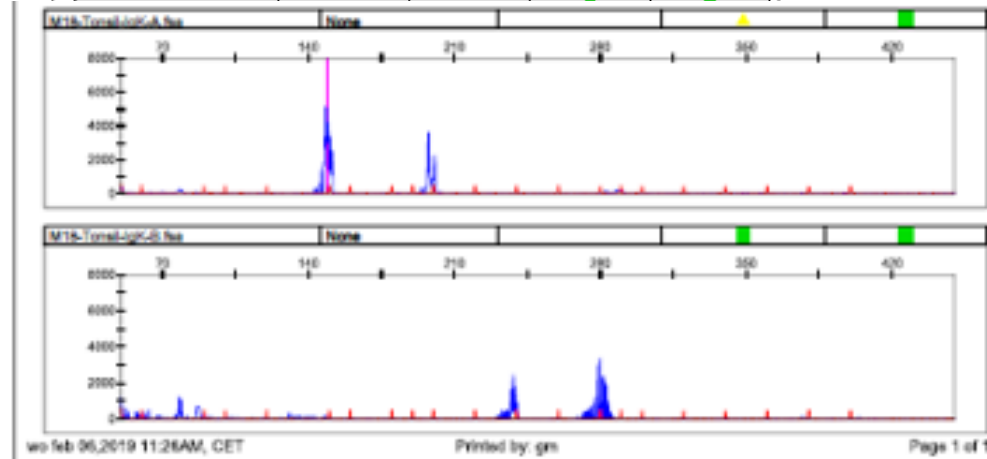
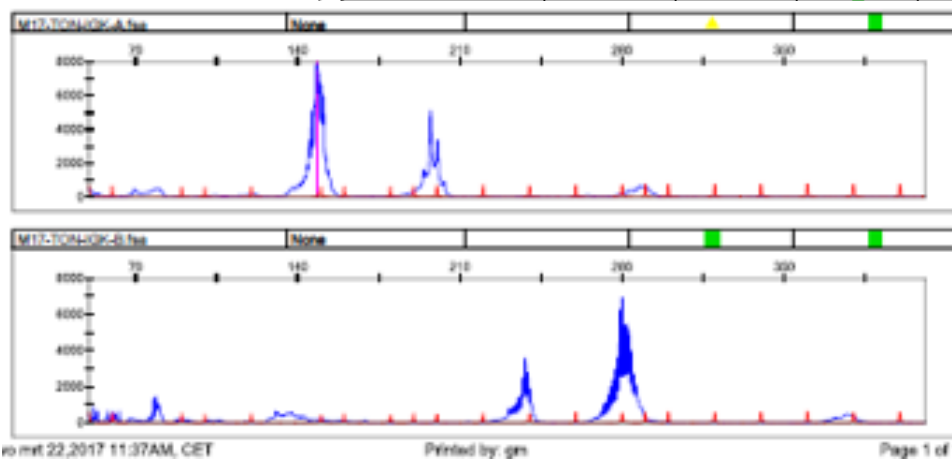
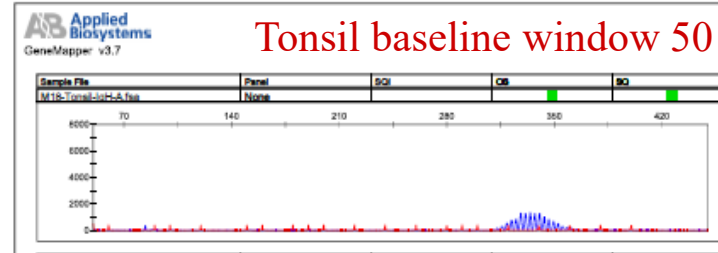
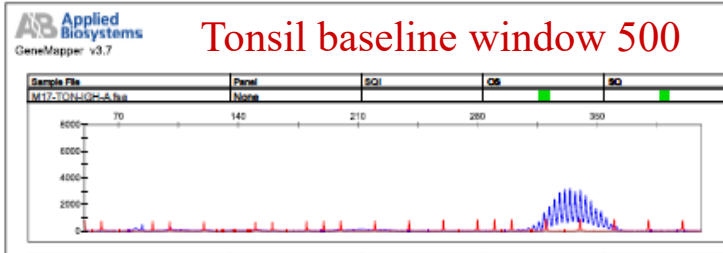


Interpretatie per tube: invloed analyse instellingen en/of toestel/polymeer

- Gausse curve / smeer^c (met of zonder kleine reproduceerbare pieken / banden^b)

- polyklonaal (niet klonaal^c)

- onregelmatig polyklonaal (niet klonaal^c)

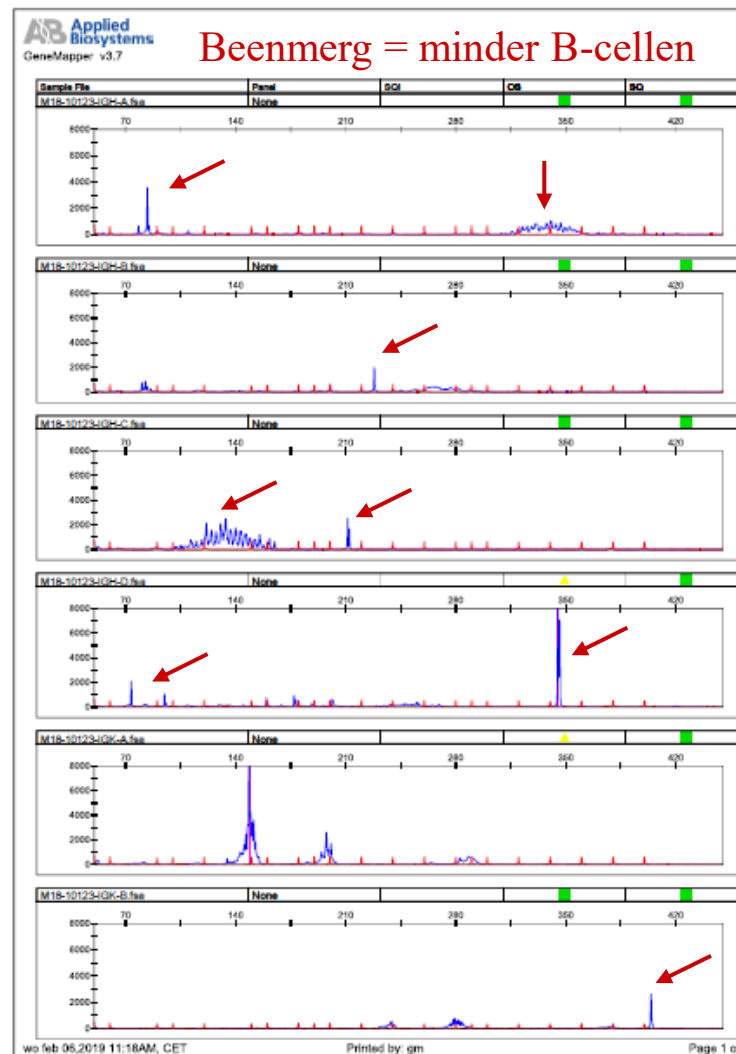
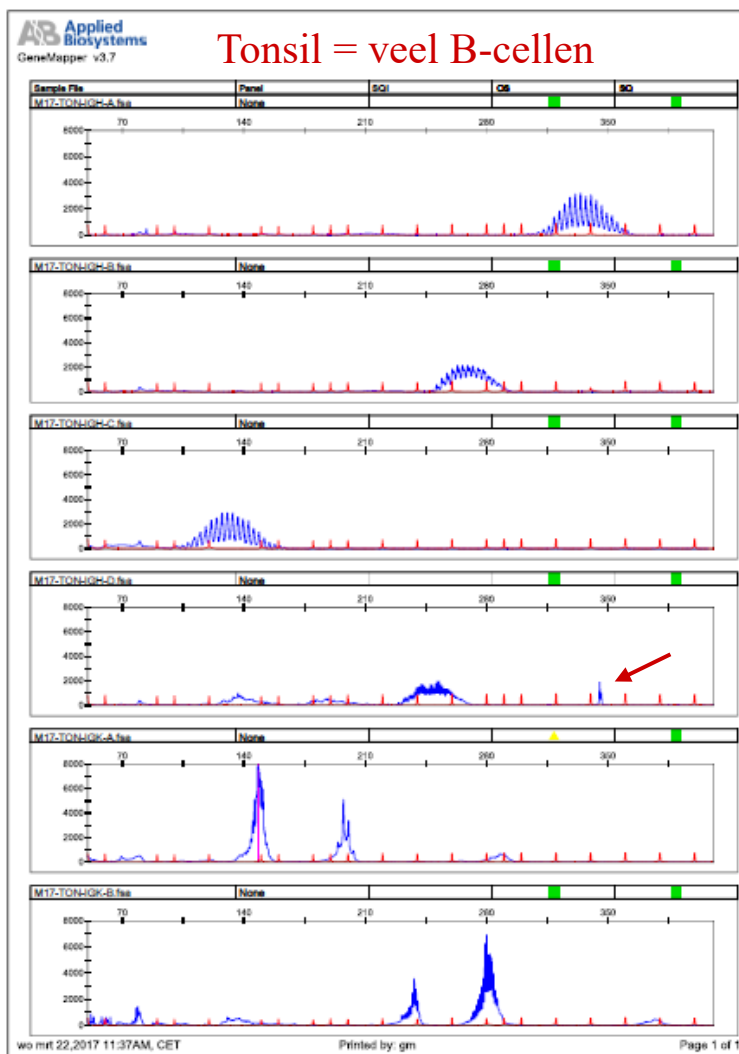


Interpretatie per tube: polyklonaal (niet klonaal)

- Gausse curve / smeer^c (met of zonder kleine reproduceerbare pieken / banden^b)

- polyklonaal (niet klonaal^c)

- onregelmatig polyklonaal (niet klonaal^c)



Zwakker, minder
mooi PC beeld

‘Meer’ aspecifieke
pieken

Onregelmatig of
gewoon polyklonaal

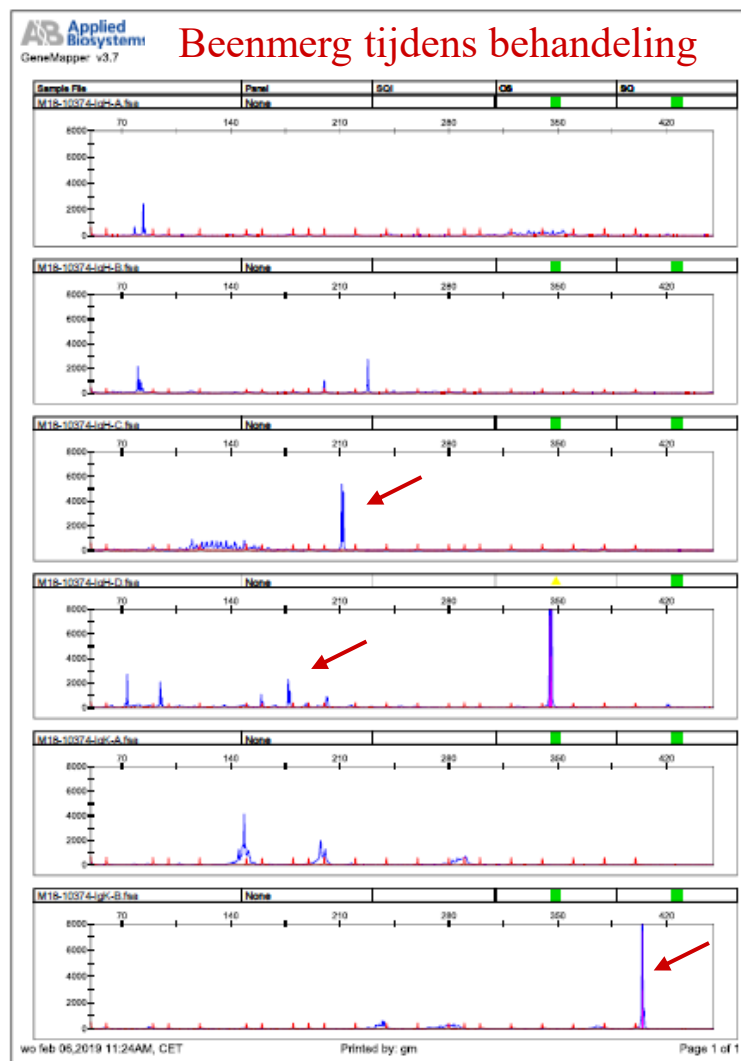
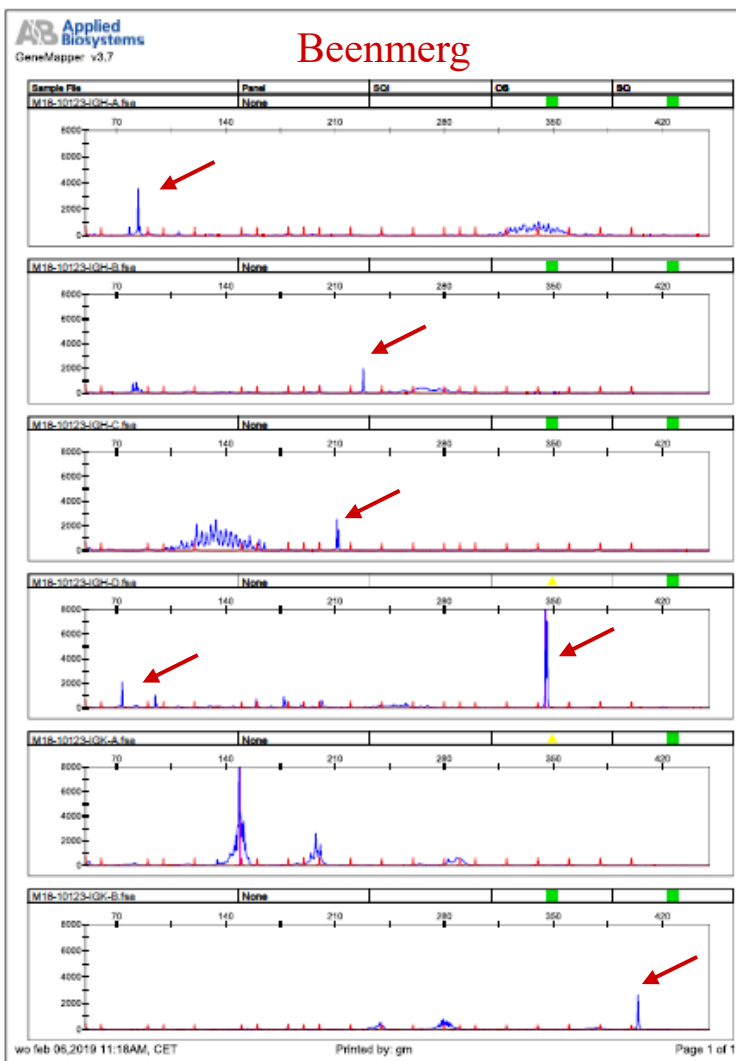
‘Flavor of the LAB’

Interpretatie per tube: polyklonaal (niet klonaal)

- Gausse curve / smeer^c (met of zonder kleine reproduceerbare pieken / banden^b)

- polyklonaal (niet klonaal^c)

- onregelmatig polyklonaal (niet klonaal^c)

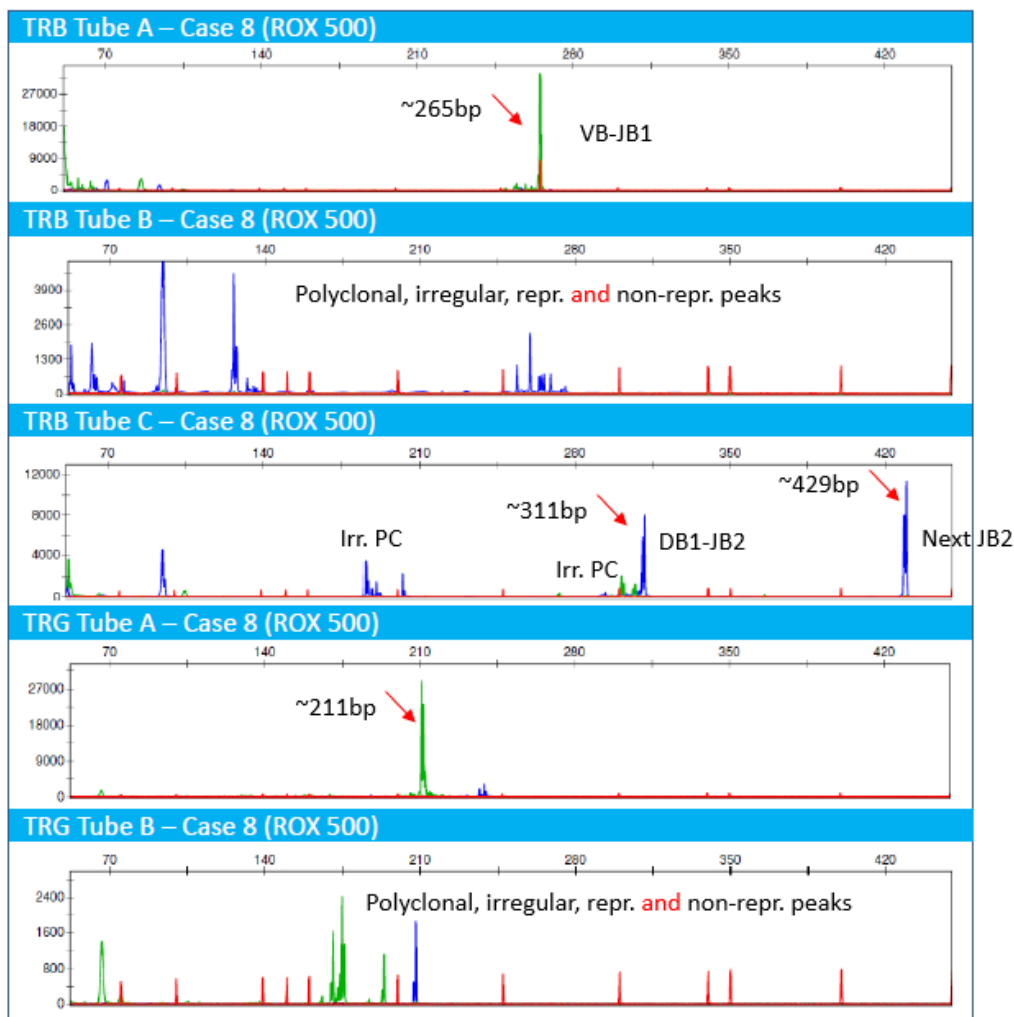


Interpretatie per tube: polyklonaal (niet klonaal)

- Gausse curve / smeer^e (met of zonder kleine reproduceerbare pieken / banden^b)

- polyklonaal (niet klonaal^e)

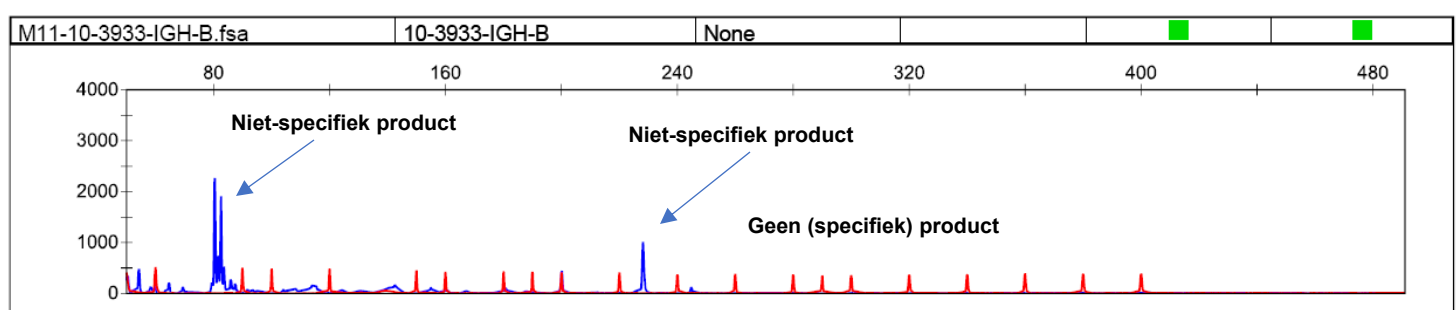
- onregelmatig polyklonaal (niet klonaal^e)



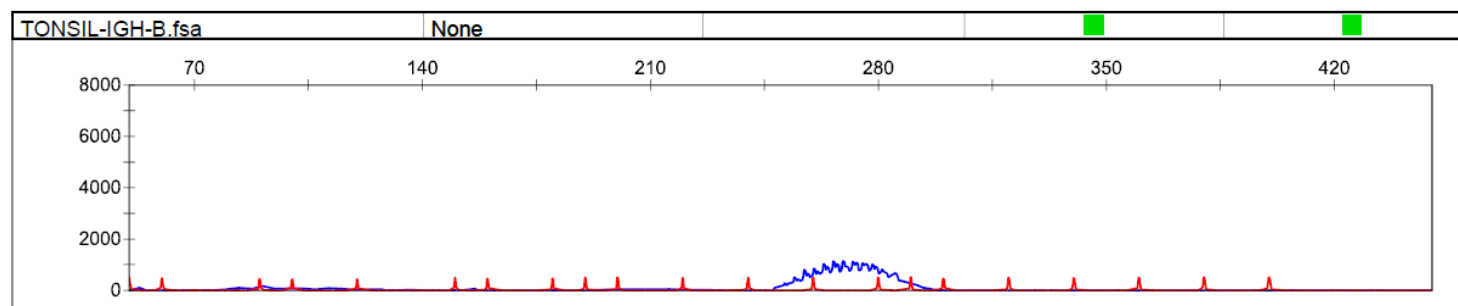
✓ FFPE biopsy from base of tongue, 400bp DNA quality

Interpretatie per tube: geen (specifiek) of niet-specifiek product

Type patron per tube (in duplo)	Technische beschrijving per tube	Optioneel: meer gedetailleerde technische beschrijving ^a
- geen pieken / banden (maar: slechte DNA kwaliteit)	- geen (specifiek) product, slecht DNA	
-geen pieken / banden (zonder achtergrond)	- geen (specifiek) product	- niet-specifiek product (... nt)



DNA maar geen B-cellen in staal



Niet-specifieke producten per tube identificeren/kennen

Type patron per tube (in duplo)	Technische beschrijving per tube	Optioneel: meer gedetailleerde technische beschrijving ^a
- geen pieken / banden (maar: slechte DNA kwaliteit)	- geen (specifiek) product, slecht DNA	
-geen pieken / banden (zonder achtergrond)	- geen (specifiek) product	- niet-specifiek product (... nt)

Table 1. Ig/TCR multiplex PCR: preferred method of analysis, expected size ranges and nonspecific bands^a

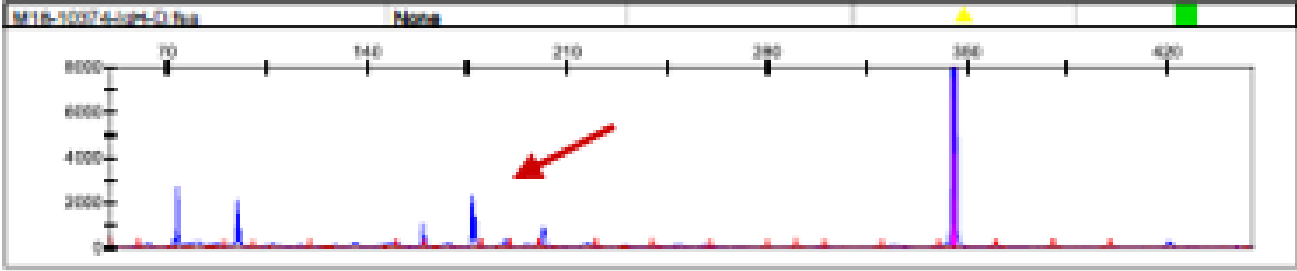
Multiplex PCR	Preferred method of analysis	Size range (nt)	Nonspecific bands (nt)
IGH V _H -J _H	GS and HD both suitable	Tube A: 310–360 Tube B: 250–295 Tube C: 100–170	Tube A: ~85 Tube B: ~228 ^b Tube C: ~211 ^b
IGH D _H -J _H	HD slightly preferred over GS (Amplicon variation hampers GS)	Tube D: 110–290 (D _H 1/2/4/5/6-J _H) 390–420 (D _H 3-J _H) Tube E: 100–130	Tube D: ~350 ^c Tube E: 211 ^d
IGK	GS and HD have complementary value (Small CDR3 + amplicon variation hamper GS)	Tube A: 120–160 (V _K 1f/6/V _K 7-J _K) 190–210 (V _K 3f-J _K) 260–300 (V _K 2f/V _K 4/V _K 5-J _K) Tube B: 210–250 V _K 1f/6/V _K 7-Kde 270–300 (V _K 3f/intron-Kde) 350–390 (V _K 2f/V _K 4/V _K 5-Kde)	Tube A: ~217 ^b Tube B: ~404 ^b
IGL	HD slightly preferred over GS (Small CDR3 hampers GS)	Tube A: 140–165	Tube A:—
TCRB	GS and HD both suitable	Tube A: 240–285 Tube B: 240–285 Tube C: 170–210 (D _β 2) 285–325 (D _β 1)	Tube A: ~213 ^{b,e} , ~273 ^b Tube B: ~93, ~126, ~221 ^{b,e} Tube C: ~128, ~337 ^{b,e}
TCRG	GS and HD both suitable	Tube A: 145–255 Tube B: 80–220	Tube A:— Tube B:—
TCRD	HD slightly preferred over GS (Low template amount + amplicon variation hamper GS)	Tube A: 120–280	Tube A: ~90, ~123

Abbreviations: GS, GeneScan; HD, heteroduplex; Ig, immunoglobulin; IGH, IG heavy chain; IGK, IG kappa; IGL, IG lambda; nt, nucleotide; TCR, T-cell receptor; TCRB, TCR beta; TCRD, TCR delta; TCRG, TCR gamma. ^aUpdate of table 25 of earlier BIOMED-2/EuroClonality report.¹⁵ ^bParticularly seen in samples with low numbers of contaminating lymphoid cells. ^cNonspecific 350-bp band is the result of cross-annealing of the D_H2 primer to a sequence upstream of J_H4. In GeneScanning this nonspecific band does not comigrate with D–J products. ^dThe 211-bp PCR product represents product from germline D_H7–J_H1 region; when PCR amplification is very efficient, also longer PCR products might be obtained based on primer annealing to downstream J_H genes; for example, 419 bp (D_H7–J_H2), 1031 bp (D_H7–J_H3), and so on. ^eDetection of nonspecific band depends on quality of primers (batch-dependent).

Niet-specifieke producten per tube identificeren/kennen

Type patron per tube (in duplo)	Technische beschrijving per tube	Optioneel: meer gedetailleerde technische beschrijving ^a
- geen pieken / banden (maar: slechte DNA kwaliteit)	- geen (specifiek) product, slecht DNA	
-geen pieken / banden (zonder achtergrond)	- geen (specifiek) product	- niet-specifiek product (... nt)

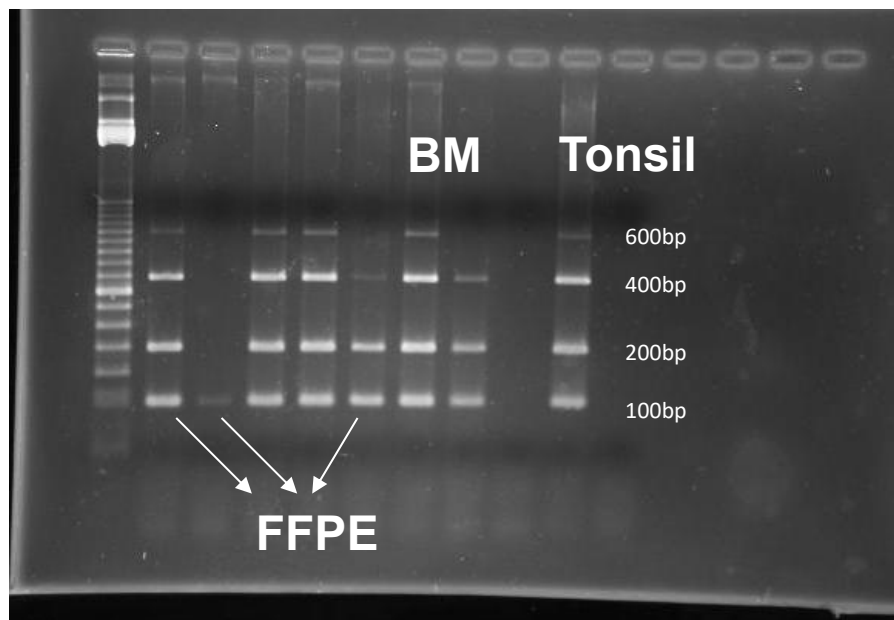
Table 1. Ig/TCR multiplex PCR: preferred method of analysis, expected size ranges and nonspecific bands^a

Multiplex PCR	Preferred method of analysis	Size range (nt)	Nonspecific bands (nt)
IGH V _H -J _H	GS and HD both suitable	Tube A: 310–360 Tube B: 250–295 Tube C: 100–170	Tube A: ~85 Tube B: ~228 ^b Tube C: ~211 ^b
IGH D _H -J _H	HD slightly preferred over GS	Tube D: 110–290 (D _H 1/2/4/5/6-J _H)	Tube D: ~350 ^c
			
TCRG	GS and HD both suitable	Tube C: 170–210 (Dβ2) 285–325 (Dβ1) Tube A: 145–255 Tube B: 80–220	Tube C: ~128, ~337 ^{b,e} Tube A:— Tube B:—
TCRD	HD slightly preferred over GS (Low template amount + amplicon variation hamper GS)	Tube A: 120–280	Tube A: ~90, ~123

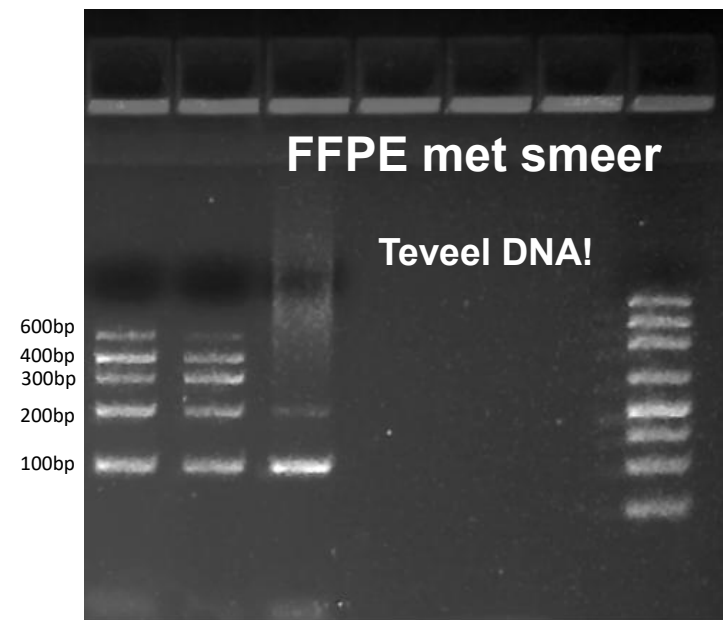
Abbreviations: GS, GeneScan; HD, heteroduplex; Ig, immunoglobulin; IGH, IG heavy chain; IGK, IG kappa; IGL, IG lambda; nt, nucleotide; TCR, T-cell receptor; TCRB, TCR beta; TCRD, TCR delta; TCRG, TCR gamma. ^aUpdate of table 25 of earlier BIOMED-2/EuroClonality report.¹⁵ ^bParticularly seen in samples with low numbers of contaminating lymphoid cells. ^cNonspecific 350-bp band is the result of cross-annealing of the D_H2 primer to a sequence upstream of J_H4. In GeneScanning this nonspecific band does not comigrate with D–J products. ^dThe 211-bp PCR product represents product from germline D_H7–J_H1 region; when PCR amplification is very efficient, also longer PCR products might be obtained based on primer annealing to downstream J_H genes; for example, 419 bp (D_H7–J_H2), 1031 bp (D_H7–J_H3), and so on. ^eDetection of nonspecific band depends on quality of primers (batch-dependent).

Belang van goede DNA kwaliteit (400bp) en correcte DNA input

Type patron per tube (in duplo)	Technische beschrijving per tube	Optioneel: meer gedetailleerde technische beschrijving ^a
- geen pieken / banden (maar: slechte DNA kwaliteit)	- geen (<u>specifiek</u>) product, slecht DNA	
-geen pieken / banden (zonder achtergrond)	- geen (<u>specifiek</u>) product	- <u>niet-specifiek</u> product (... nt)



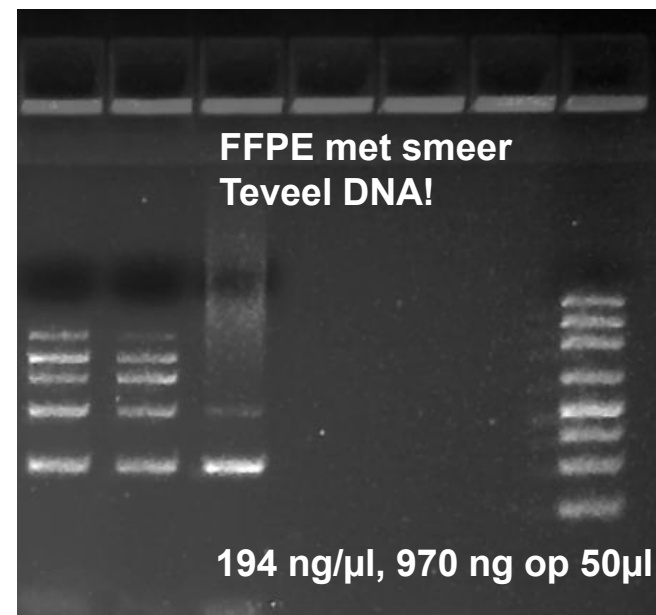
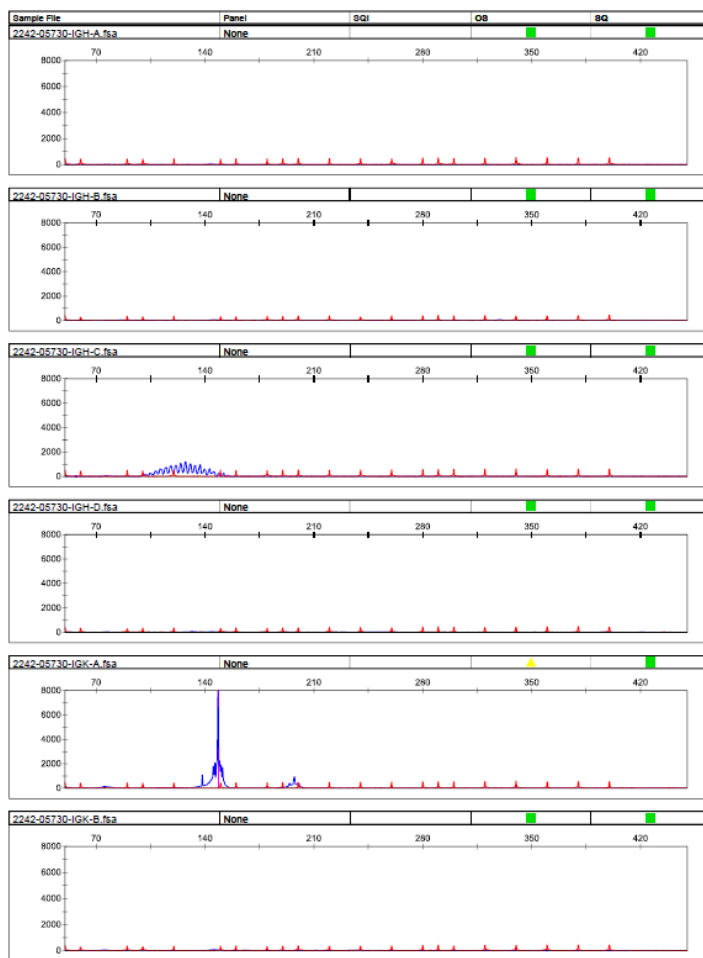
Degradatie van DNA door formaline fixatie



ook verse stalen kunnen dit patroon geven

Geen (specifiek) product, slechte DNA kwaliteit

Type patron per tube (in duplo)	Technische beschrijving per tube	Optioneel: meer gedetailleerde technische beschrijving ^a
- geen pieken / banden (maar: slechte DNA kwaliteit)	- geen (specifiek) product, slecht DNA	
-geen pieken / banden (zonder achtergrond)	- geen (specifiek) product	- niet-specifiek product (... nt)



Geen (specifiek) product, slechte DNA kwaliteit

Type patron per tube (in duplo)

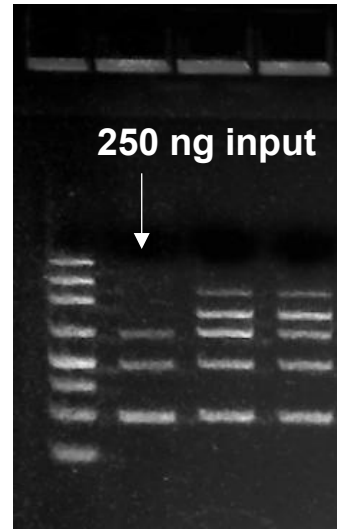
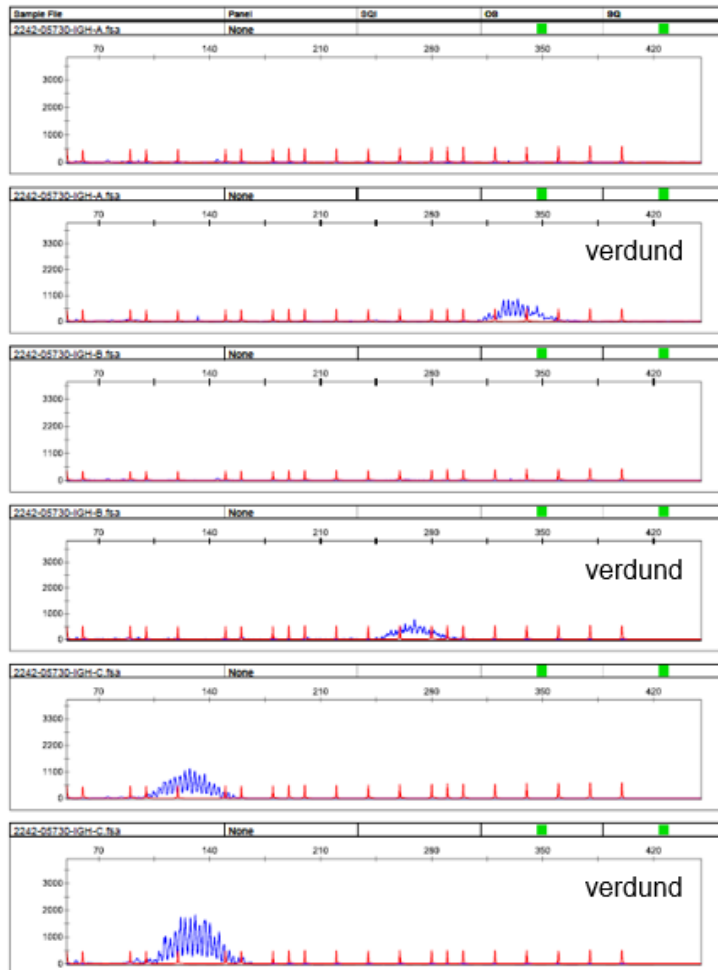
- geen pieken / banden (maar: slechte DNA kwaliteit)
- geen pieken / banden (zonder achtergrond)

Technische beschrijving per tube

- geen (specifiek) product, slecht DNA
- geen (specifiek) product

Optioneel: meer gedetailleerde technische beschrijving^a

- niet-specifiek product (... nt)



Polyclonaal beeld onderdrukt door teveel DNA
Grotere PCR-producten gevoeliger aan inhibitie

Kleinere PCR-producten minder sterk bij teveel DNA

Indien 'ladder PCR' maar tot 100bp > slecht DNA

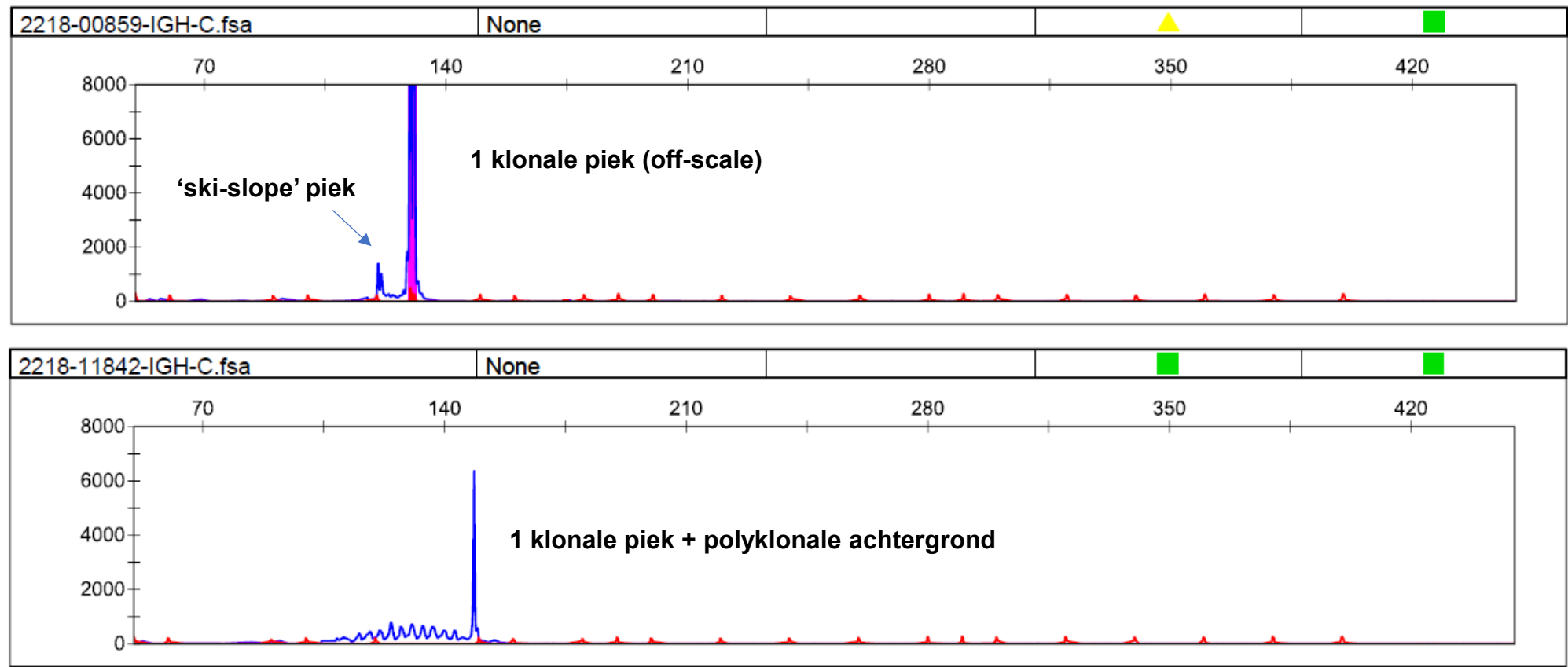
Altijd de oorzaak nakijken (FFPE en/of DNA hoeveelheid)

Bij gedegradieerd FFPE-DNA kan je dit niet meer goed krijgen

Analyse wel opstarten omdat je soms toch nog clonaliteit via de targets met kleinere PCR producten kan oppikken

Interpretatie per tube: klonaal (zwak of + polyklonaal)

- 1 of 2 <u>reproduceerbare</u> klonale pieken / banden ^b	- klonaal (...nt)	- zwak klonaal (... nt)	- klonaal (...nt) +polyklonale achtergrond (Gausse curve / smeer)
--	-------------------	-------------------------	---

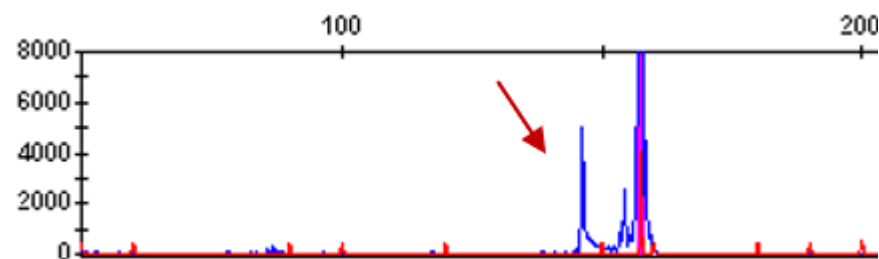
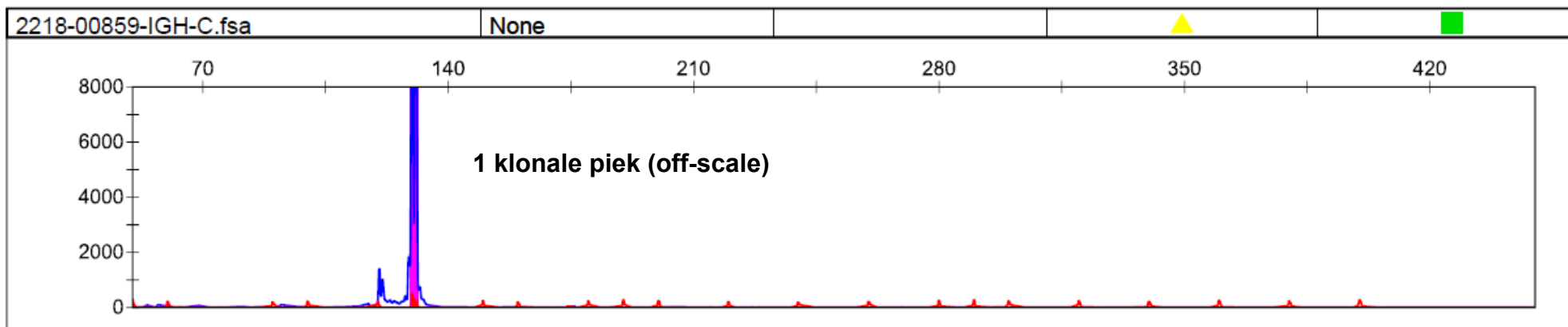


Interpretatie per tube: definitie 'ski-slope' piek

- 1 of 2 reproduceerbare klonale pieken / banden^b - klonaal (...nt)

- zwak klonaal (... nt)

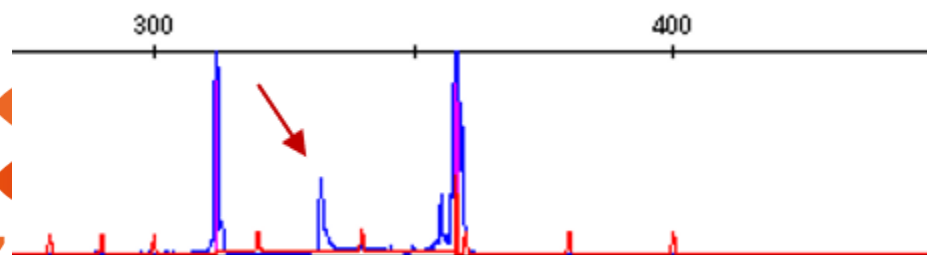
- klonaal (...nt) +polyklonale achtergrond (Gausse curve / smeer)



Voor een off-scale piek

Vorm van 'ski-schans' (afhankelijk van POP)

Afstand tov off-scale piek is verschillend



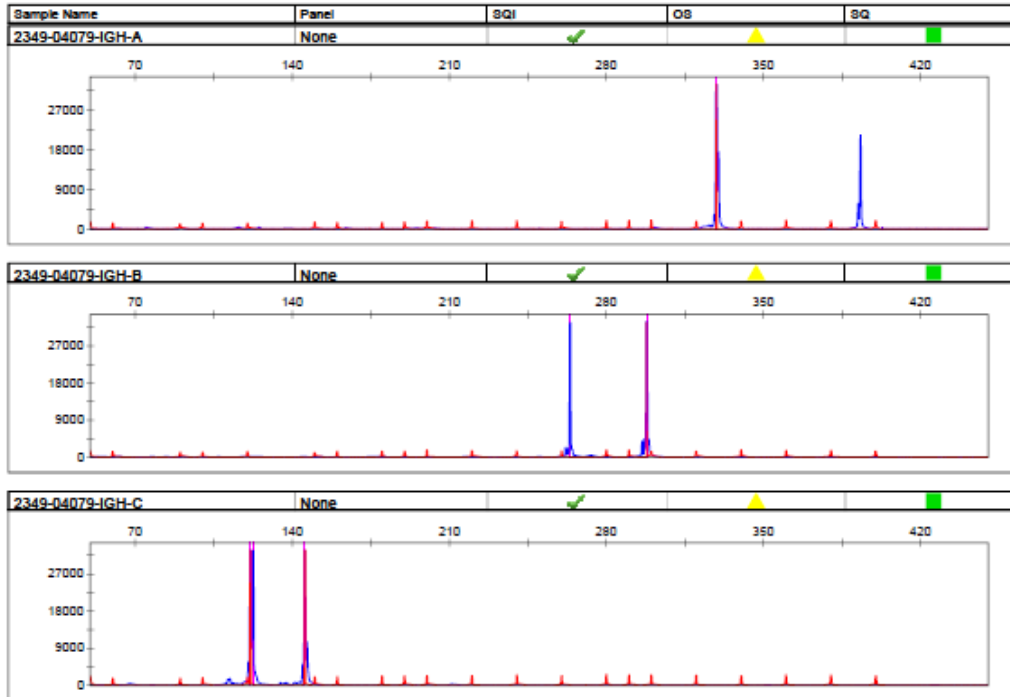
Oplossing staal verdunnen of minder PCR product op analyser

Interpretatie per tube: klonaal (zwak of + polyklonaal)

- 1 of 2 reproduceerbare klonale pieken / banden^b - klonaal (...nt)

- zwak klonaal (... nt)

- klonaal (...nt) +polyklonale achtergrond (Gausse curve / smeer)



2 klonale pieken

Intensiteit kan verschillend zijn zelfs bij 1 kloon

Oorzaak: verschillende binding efficiënties, consensus primers, sommige VH segmenten hebben mutaties tov de primer

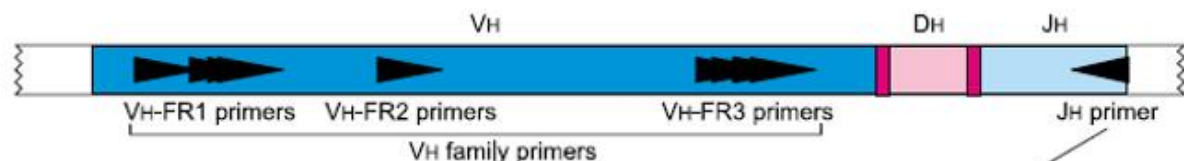
Afstand tussen pieken bij IGH VDJ kan verschillen door lokalisatie van primers en/of insertie/deleties

Interpretatie per tube: OUT-OF-RANGE pieken: somatische hypermutatie

- 1 of 2 reproduceerbare klonale pieken / banden^b - klonaal (...nt)

- zwak klonaal (... nt)

- klonaal (...nt) +polyklonale achtergrond (Gausse curve / smeer)



IGH tube A

VH1-FR1 (1-2) (-252)	GGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAG	5'	3'
VH2-FR1 (2-5) (-284)	GTCTGGTCTACGCTGGTGAAACCC		
VH3-FR1 (3-7) (-256)	CTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTG		
VH4-FR1 (4-4) (-256)	CTTCGGAGACCCTGTCCCTCACCTG		
VH5-FR1 (5-51) (-255)	CGGGGAGTCTCTGAAGATCTCCTGT		
VH6-FR1 (6-1) (-263)	TCGCAGACCCTCTCACTCACCTGTG		

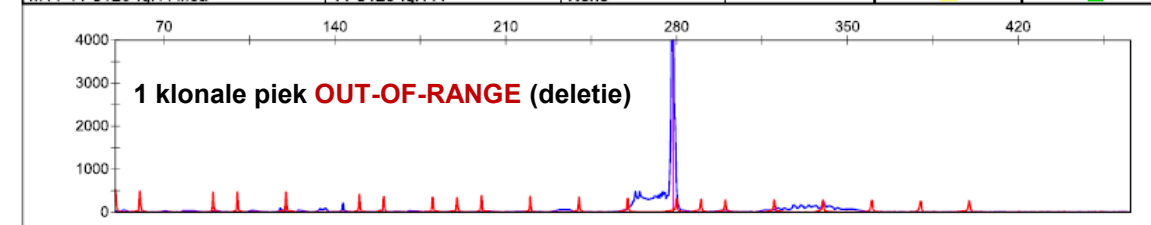
IGH tube B

VH1-FR2 (1-2) (-192)	CTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAA
VH2-FR2 (2-5) (-190)	TGGATCCGTGAGCCCCAGGGAAGG
VH3-FR2 (3-7) (-189)	GGTCCGCCAGGCTCCAGGGAA
VH4-FR2 (4-4) (-188)	TGGATCCGCCAGCCCCAGGGAAGG
VH5-FR2 (5-51) (-190)	GGGTGCCAGATGCCCGGGAAGG
VH6-FR2 (6-1) (-194)	TGGATCAGGCAGTCCCCATCGAGAG
VH7-FR2 (7) (-192)	TTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAA

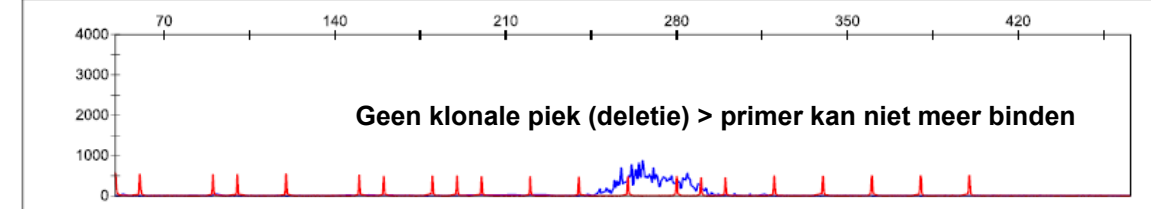
IGH tube C

VH1-FR3 (1-2) (-55)	TGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGA
VH2-FR3 (2-5) (-54)	CAATGACCAACATGGACCTGTGGA
VH3-FR3 (3-7) (-57)	TCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCC
VH4-FR3 (4-4) (-48)	GAGCTCTGTGACCGCCGCGGACACG
VH5-FR3 (5-51) (-69)	CAGCACCGCCTACCTGCAGTGGAGC
VH6-FR3 (6-1) (-63)	GTTCTCCCTGCAGCTGAACCTCTGTG
VH7-FR3 (7) (-69)	CAGCACGGCATATCTGCAGATCAG

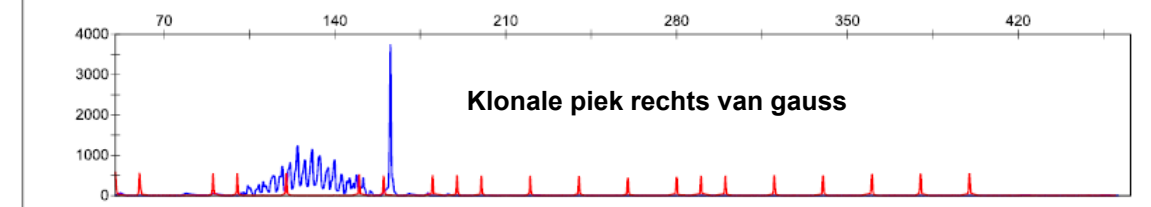
Sample File	Sample Name	Panel	SQI	OS	SQ
M11-11-0126-IgH-A.fsa	11-0126-IgH-A	None			



Sample File	Sample Name	Panel	SQI	OS	SQ
M11-11-0126-IgH-B.fsa	11-0126-IgH-B	None			

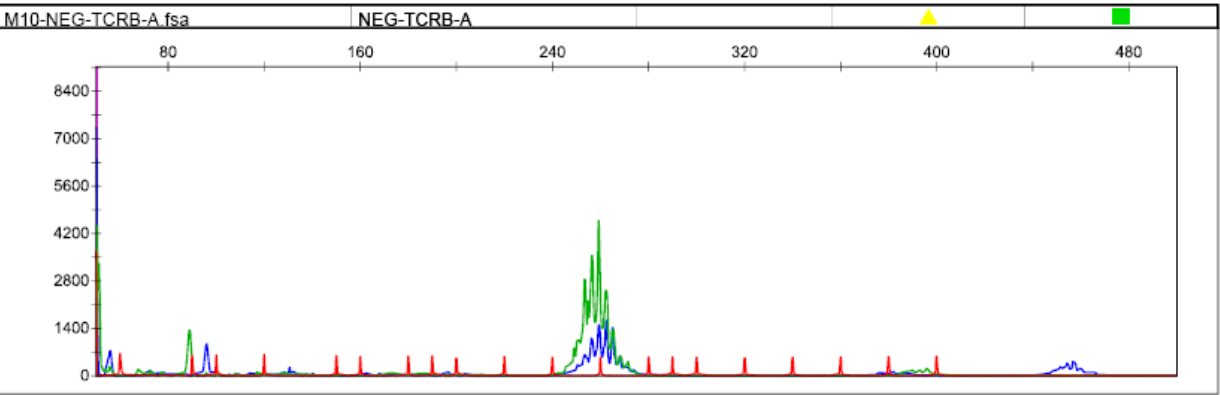
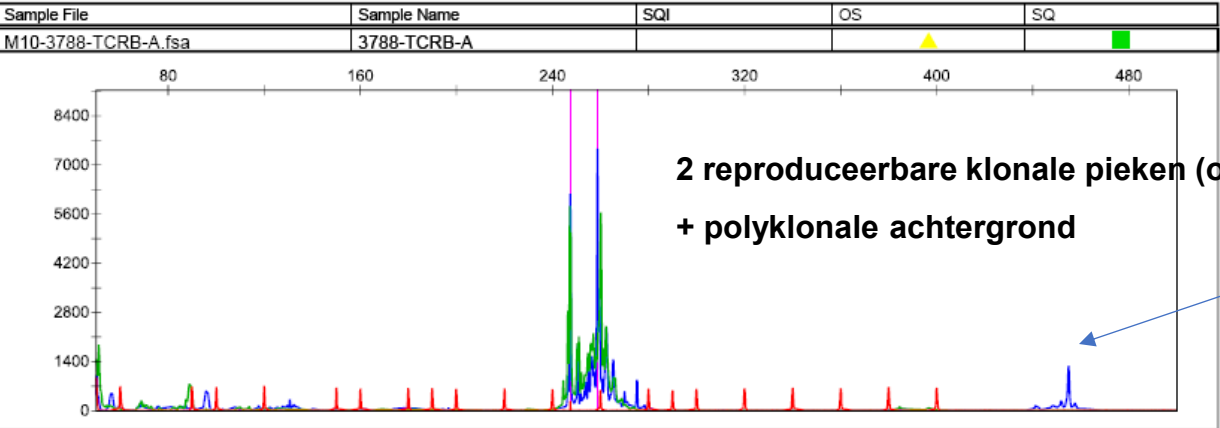


Sample File	Sample Name	Panel	SQI	OS	SQ
M11-11-0126-IgH-C.fsa	11-0126-IgH-C	None			



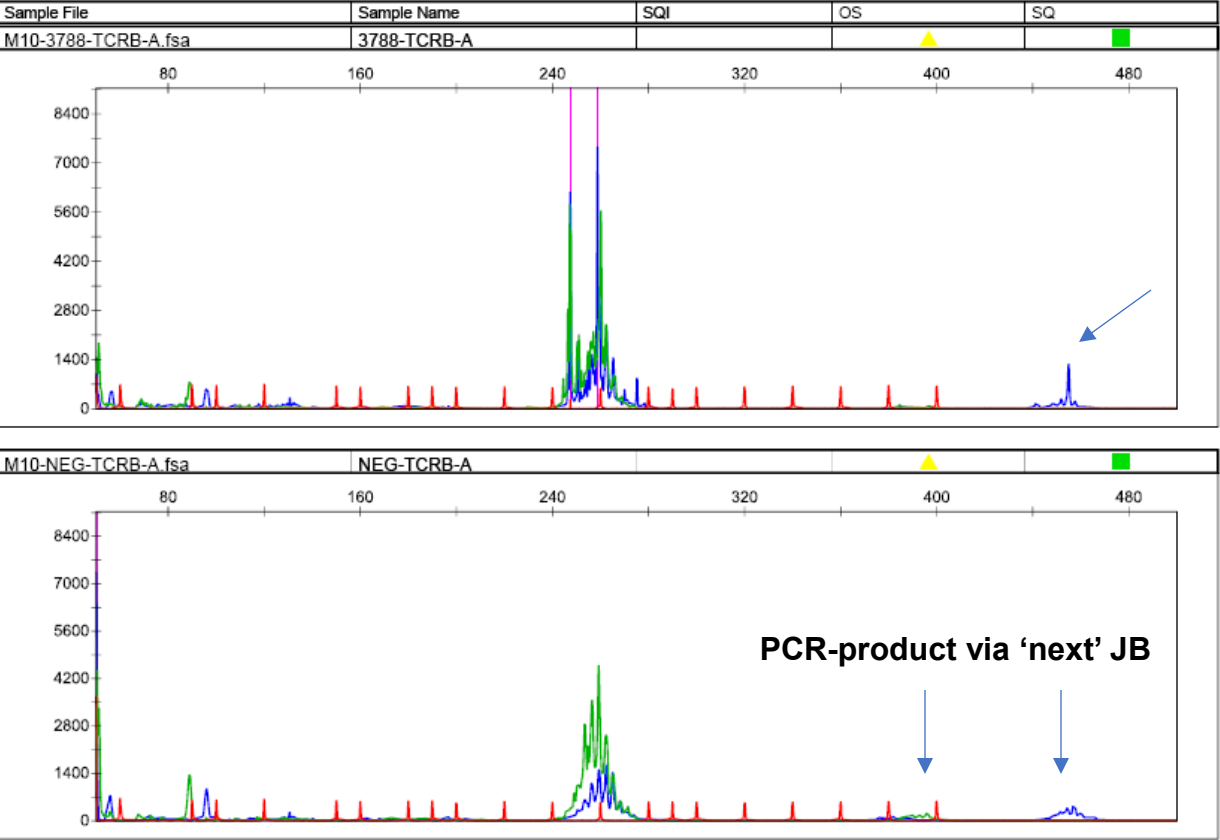
Interpretatie per tube: OUT-OF-RANGE pieken: volgende JH, JK of JB

- 1 of 2 <u>reproduceerbare</u> klonale pieken / banden ^b	- klonaal (...nt)	- zwak klonaal (... nt)
		- klonaal (...nt) +polyklonale achtergrond (Gausse curve / smeer)



Interpretatie per tube: OUT-OF-RANGE pieken: volgende JH, JK of JB

- 1 of 2 reproduceerbare klonale pieken / banden^b - klonaal (...nt)
- zwak klonaal (... nt)
- klonaal (...nt) +polyklonale achtergrond (Gausse curve / smeer)

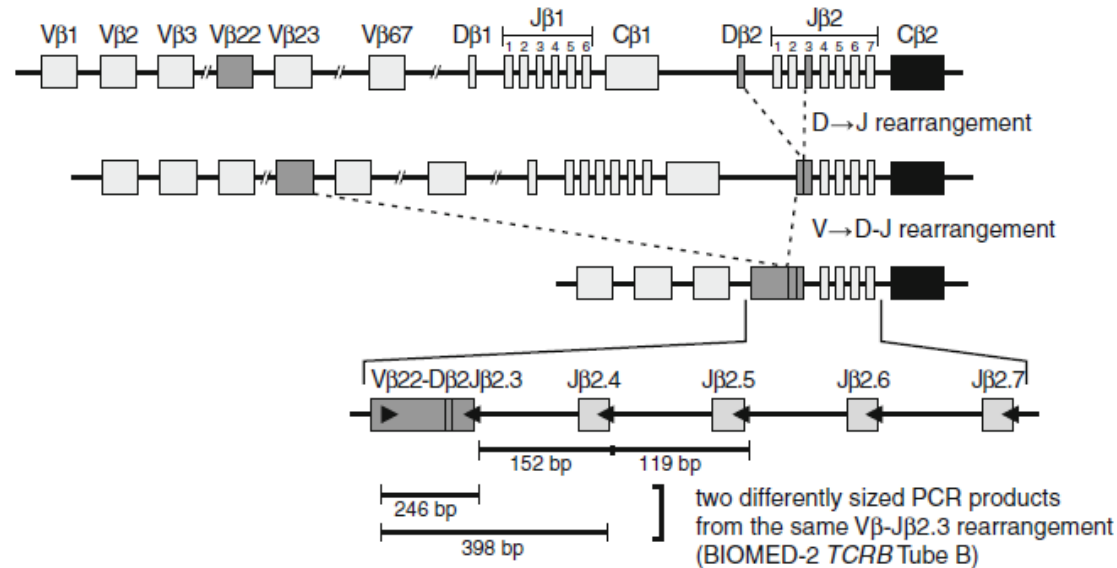


Interpretatie per tube: OUT-OF-RANGE pieken: volgende JH, JK of JB

- 1 of 2 reproduceerbare klonale pieken / banden^b - klonaal (...nt)

- zwak klonaal (... nt)

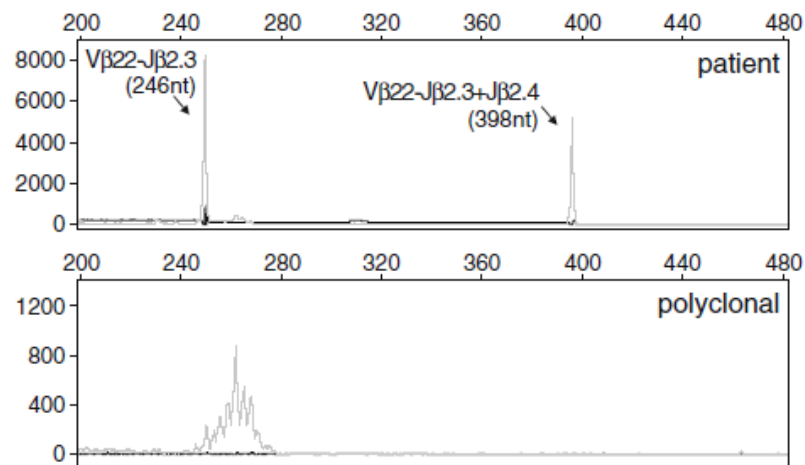
- klonaal (...nt) + polyklonale achtergrond (Gausse curve / smeer)



Primer binding op volgende JB segment:

➤ extra piek afkomstig van hetzelfde herschikte gen

➤ niet tellen als extra piek bij finale interpretatie!

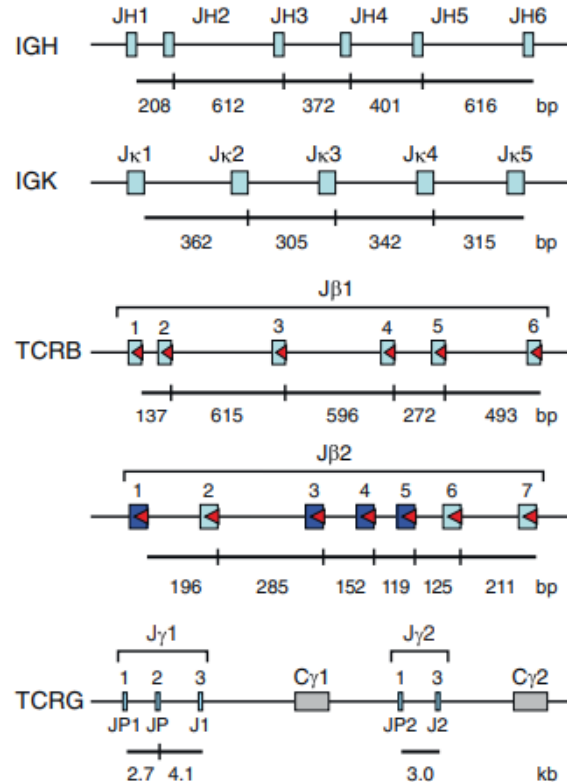


Interpretatie per tube: OUT-OF-RANGE pieken: volgende JH, JK of JB

- 1 of 2 reproduceerbare klonale pieken / banden^b - klonaal (...nt)

- zwak klonaal (... nt)

- klonaal (...nt) +polyklonale achtergrond (Gausse curve / smeer)



Ook bij IGH en IGK mogelijk!

TRB tube A bevat licht blauwe JB1 (HEX) en JB2 (FAM) primers

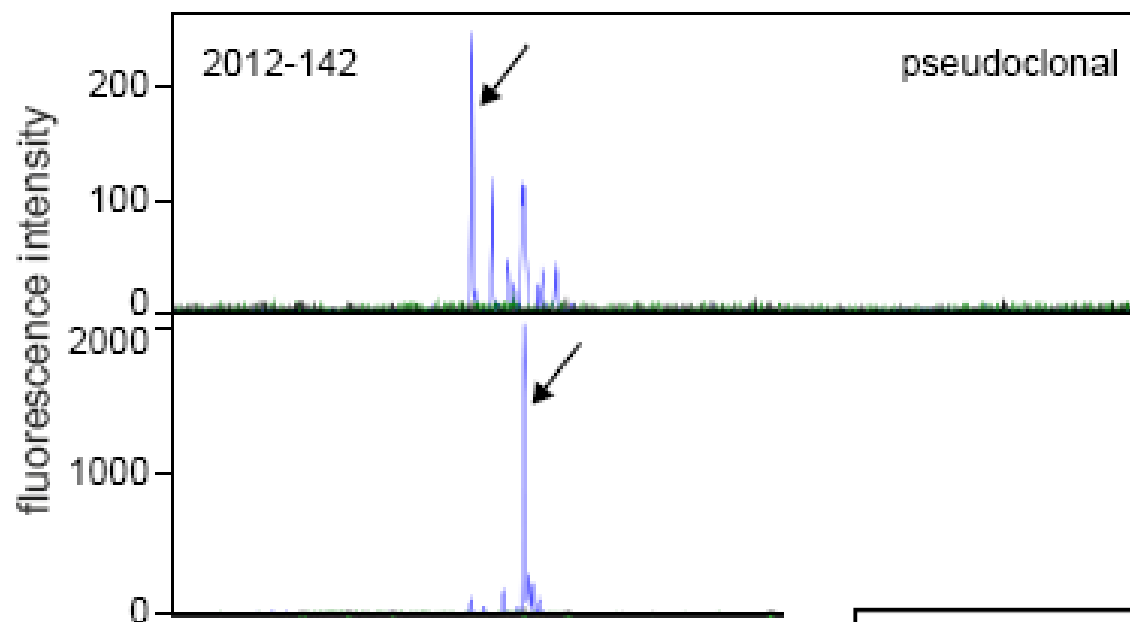
TRB tube B bevat enkel de donker blauwe JB2 (FAM) primers

Niet bij TRG > afstand tussen verschillende J fragmenten is te groot

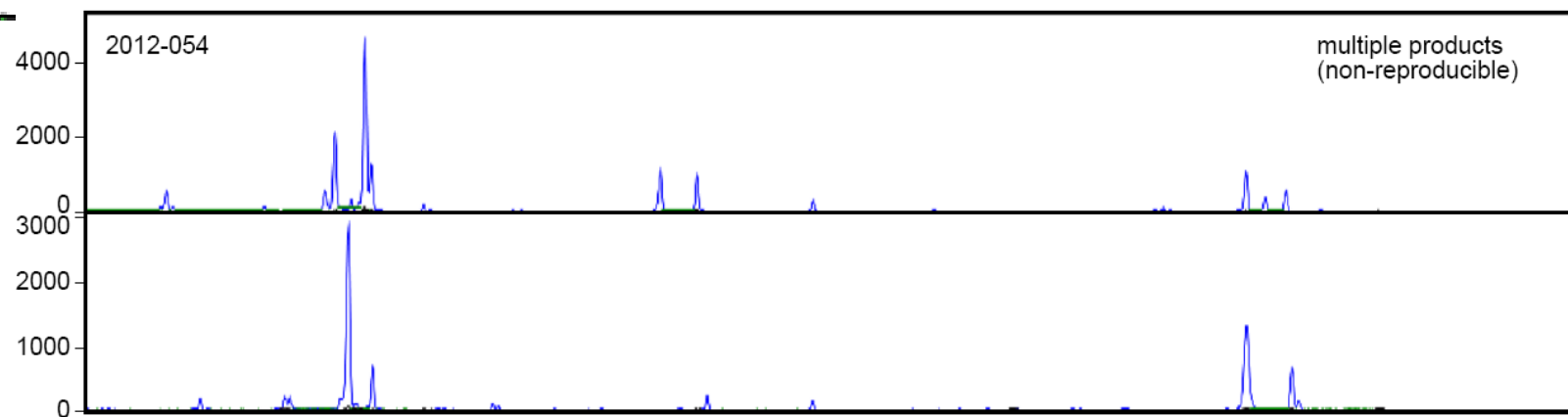
Fig. 7 Intergenic distances for the J regions of the *IGH*, *IGK*, *TCRB*, and *TCRG* loci. The numbers represent the distances in nucleotides. The *TCRB* primers for the J genes shown in light blue are in BIOMED-2 multiplex tube A, whereas primers for the J genes shown in dark blue are in BIOMED-2 multiplex tube B. Note that the distances for all loci, except for *TCRG*, are small, enabling efficient PCR amplification from a downstream J gene

Interpretatie per tube: niet-reproduceerbaar

- | | |
|--|----------------------|
| - 1 of 2 <u>niet-reproduceerbaar</u> (duidelijke) pieken / banden ^b | - pseudoklonaal |
| - meerdere (n ≥ 3) <u>niet-reproduceerbare</u> pieken / banden ^b | - meerdere producten |



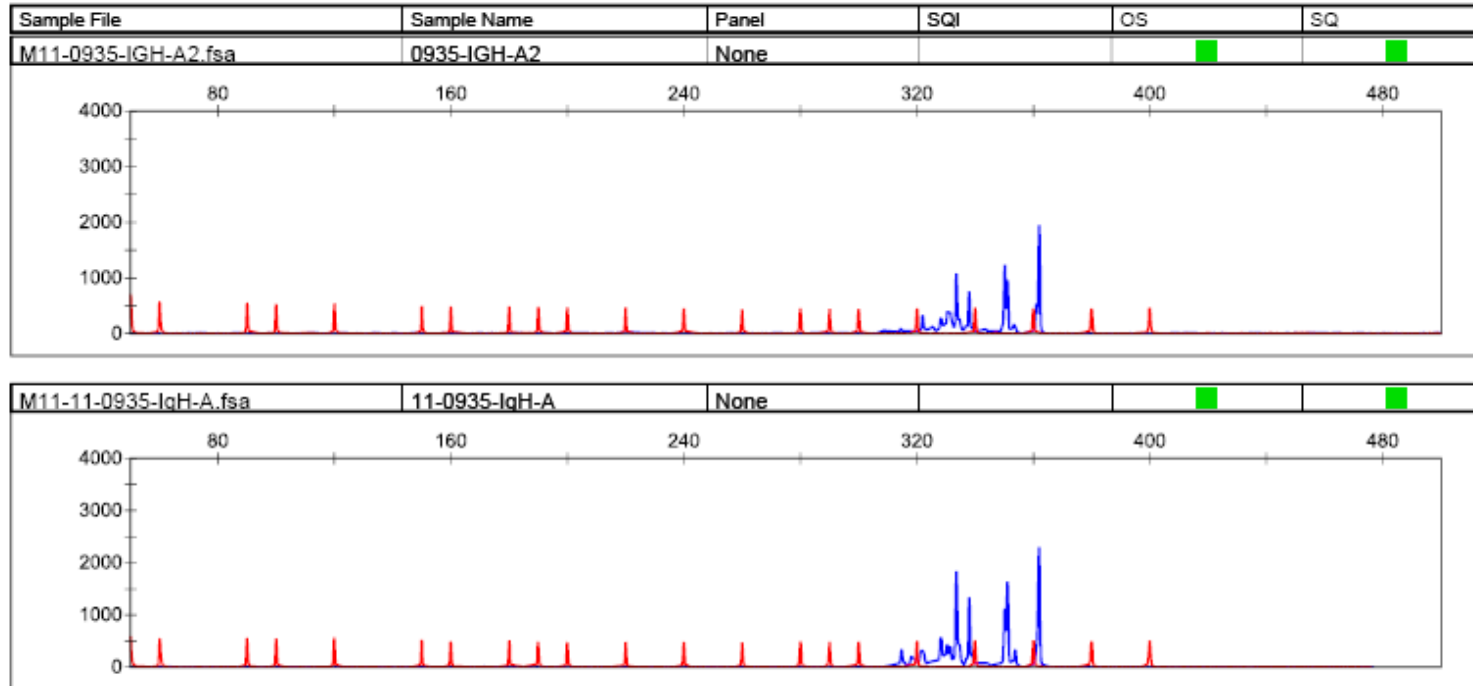
Duplo analyse heel belangrijk in FFPE materiaal of CSV
(degradatie DNA, weinig B- of T-cellen)



Interpretatie per tube: reproduceerbaar

- meerdere (n ≥ 3) reproduceerbare pieken / banden^b

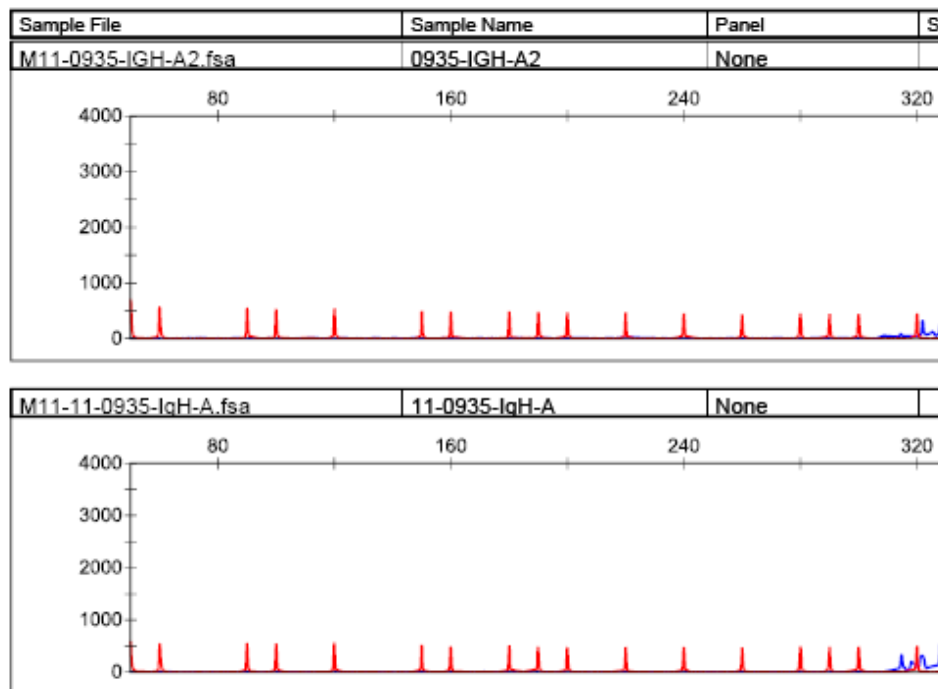
- meerdere producten (n=...) (...nt)



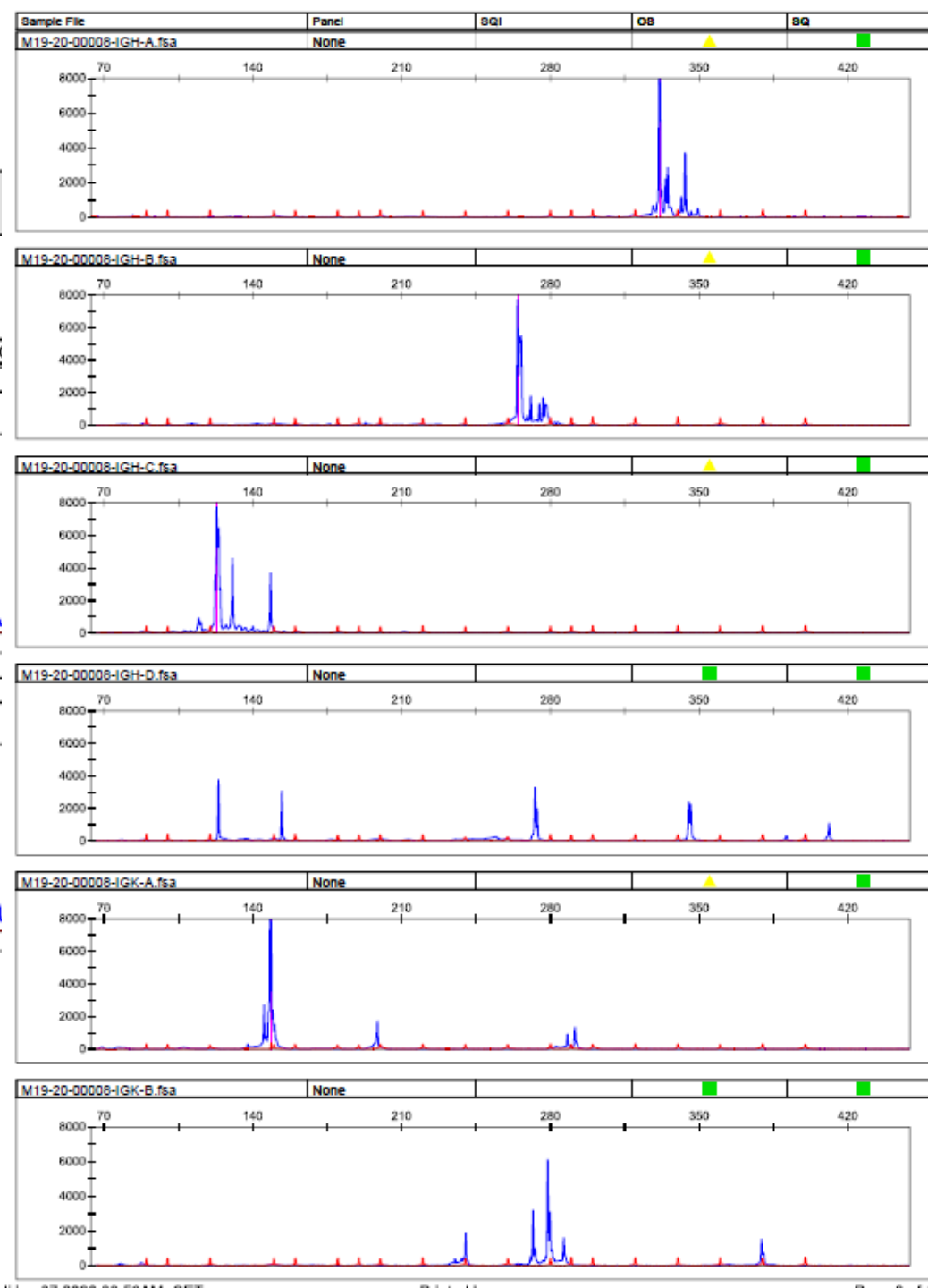
Immuunactivatie!

Interpretatie per tube: reproduceerbaar

- meerdere (n ≥ 3) reproduceerbare pieken / banden^b - meerdere producten (n=...) (...nt)



Immuunactivatie!



Interpretatie per tube

Tabel 4 EuroClonality uniform scoringssysteem m.b.t. technische beschrijving

<i>Type patron per tube (in duplo)</i>	<i>Technische beschrijving per tube</i>	<i>Optioneel: meer gedetailleerde technische beschrijving^a</i>
- geen pieken / banden (maar: slechte DNA kwaliteit)	- geen (<u>specifiek</u>) product, slecht DNA	
-geen pieken / banden (zonder achtergrond)	- geen (<u>specifiek</u>) product	- <u>niet-specifiek</u> product (... nt)
- 1 of 2 <u>reproduceerbare</u> klonale pieken / banden ^b	- klonaal (...nt)	- zwak klonaal (... nt) - klonaal (...nt) +polyklonale achtergrond (Gausse curve / smeer)
- 1 of 2 <u>niet-reproduceerbaar</u> (duidelijke) pieken / banden ^b	- pseudoklonaal	
- meerdere (n ≥3) <u>niet-reproduceerbare</u> pieken / banden ^b	- meerdere producten	
- meerdere (n ≥3) <u>reproduceerbare</u> pieken / banden ^b	- meerdere producten (n=...) (...nt)	
- Gausse curve / smeer ^c (met of zonder kleine reproduceerbare pieken / banden ^b)	- polyklonaal (niet klonaal ^c)	- onregelmatig polyklonaal (niet klonaal ^c)
- patroon dat niet past bij de bovenstaande beschrijvingen	- niet te beoordelen ^d	

Afkortingen: nt, nucleotide

^a Meer gedetailleerde technische beschrijving opties kunnen door de gebruiker worden aangevuld; enkele mogelijke voorbeelden zijn aangegeven

^b Bij HD analyse komt aantal banden en aantal PCR producten niet noodzakelijkerwijs overeen, omdat extra heteroduplexen tussen producten kunnen worden gevormd

^c Bij HD analyse kan een polyklonale smeer minder goed detecteerbaar zijn, ondanks specifiek product in de agarose gel; dit wordt gescoord als "niet klonaal"

^d In minder dan 5% van de PCR resultaten geen goede technische beschrijving mogelijk

Finale moleculaire interpretatie: waarom verschillende tubes per locus?

Doel van clonaliteitsanalyse =
aantonen van aanwezigheid van een
clonale B- of T-celpopulatie

BIOMED-2 Concerted Action: BMH4-CT98-3936



IGH Framework- Clonality detection

in B-cell malignancies

Clonale populatie niet opgepikt?

1. *IGH*, *IGK*, *TRB*, *TRG* niet
herschikt
2. Niet binden van 'consensus'
primers
3. somatische hypermutatie

	<i>IGH</i>			
	FR1	FR2	FR3	all FR
MCL (n=54)	100%	98%	93%	100%
B-CLL/SLL (n=56)	95%	91%	93%	100%
FL (n=109)	73%	76%	52%	84%
MZL (n=41)	73%	85%	68%	88%
DLBCL (n=109)	68%	61%	50%	79%
TOTAL (n=369)	79%	78%	66%	88%

Finale moleculaire interpretatie: waarom verschillende loci?

BIOMED-2 Concerted Action: BMH4-CT98-3936



Complementarity of Ig targets for clonality detection in B-cell malignancies

	IGH			IGK			all IGH + IGK	DH-JH + Kde*
	VH-JH	DH-JH	VH-JH +DH-JH	Vκ-Jκ	Kde	Vκ-Jκ + Kde		
MCL (n=54)	100%	11%	100%	94%	75%	100%	100%	78%
B-CLL/SLL (n=56)	100%	43%	100%	96%	61%	100%	100%	73%
FL (n=109)	84%	19%	86%	63%	59%	84%	100%	64%
MZL (n=41)	88%	51%	95%	68%	54%	83%	100%	68%
DLBCL (n=109)	79%	30%	85%	61%	58%	80%	98%	72%
TOTAL (n=369)	88%	28%	91%	73%	60%	88%	99%	70%

Finale moleculaire interpretatie: waarom verschillende loci?

BIOMED-2 Concerted Action: BMH4-CT98-3936

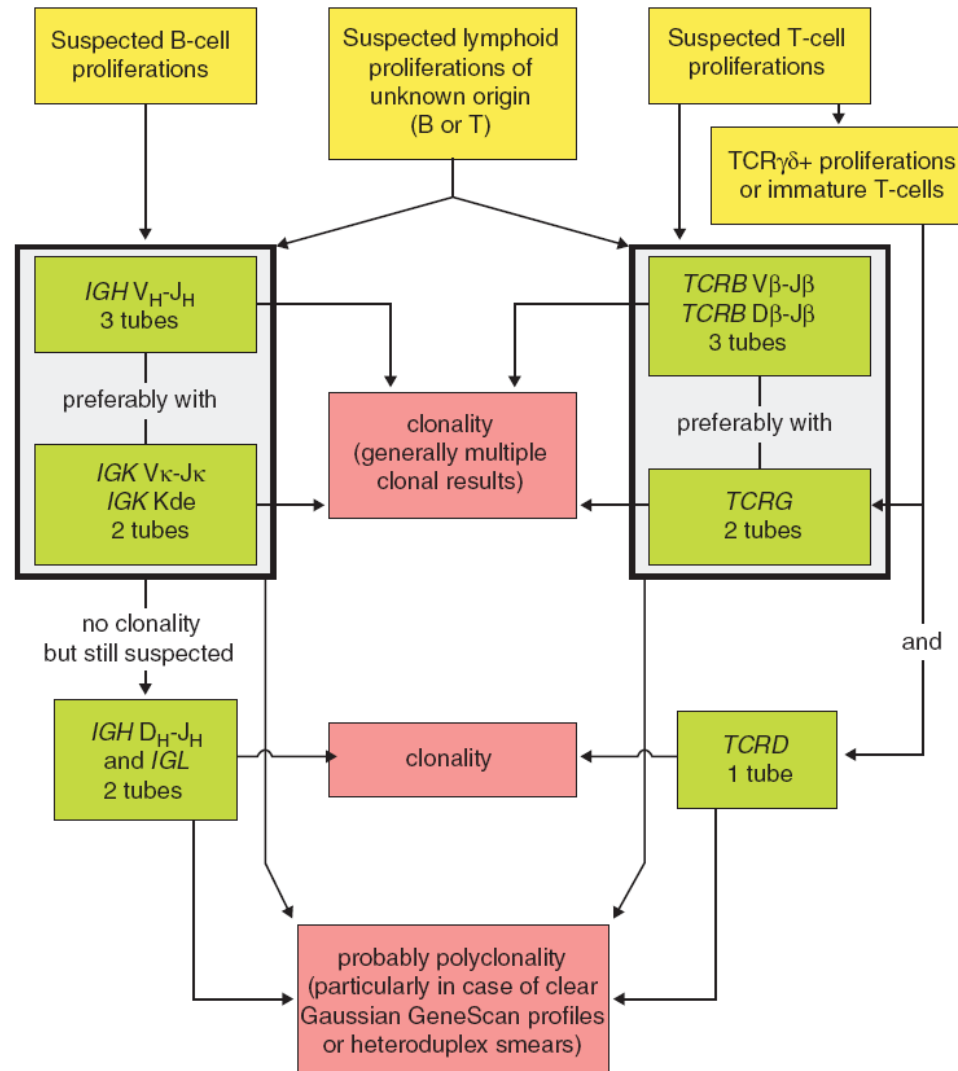
Complementarity of TCR targets for clonality detection in T-cell malignancies

	TCRB			TCRG <i>Vγ-Jγ</i>	TCRB + TCRG
	<i>Vβ-Jβ</i>	<i>Dβ-Jβ</i>	<i>Vβ-Jβ</i> + <i>Dβ-Jβ</i>		
T-PLL (n=33)	94%	47%	100%	94%	100%
T-LGL (n=28)	86%	62%	96%	96%	100%
PTCL-U (n=47)	85%	67%	98%	94%	100%
AITL (n=37)	70%	61%	89%	92%	95%
ALCL (n=43)	70%	48%	74%	74%	79%*
TOTAL (n=188)	80%	58%	91%	89%	94%* (99%)

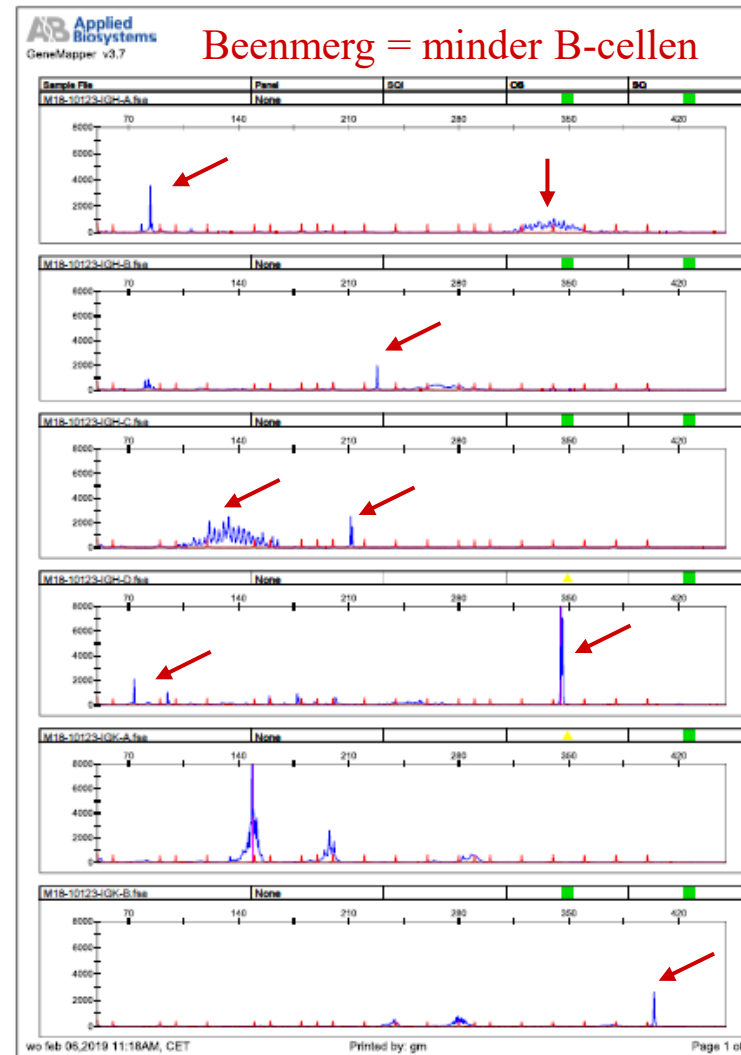
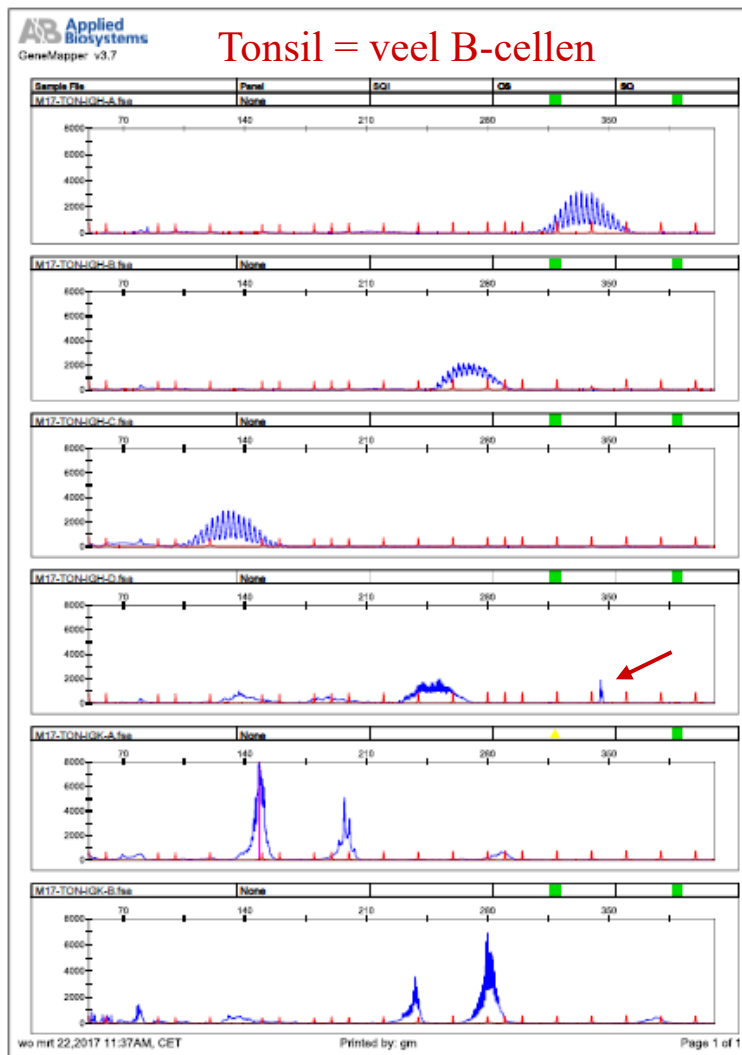
* 20% to 25 % of anaplastic large cell lymphomas do not have TCR gene rearrangements (null-ALCL)

M. Brüggemann et al, *Leukemia* 2007;21:215-221

Finale moleculaire interpretatie: waarom verschillende loci?



Finale moleculaire interpretatie: Moleculaire morfologie



Finale moleculaire interpretatie (alle tuben samen)

Tabel 5 EuroClonality uniform scoringssysteem m.b.t. moleculaire conclusie

<i>Overall technische beschrijving Ig/TCR</i>	<i>Moleculaire interpretatie / conclusie</i>	<i>Optioneel: meer gedetailleerde moleculaire interpretatie^a</i>
- geen (<u>specifiek</u>) product, slecht DNA	- niet te beoordelen, vanwege slechte DNA kwaliteit	
- geen (<u>specifiek</u>) product	- geen herschikkingen in Ig/ TCR targets detecteerbaar	
- klonaal (...nt) ^f	- klonaliteit detecteerbaar	- klonaliteit detecteerbaar (bialeleische producten) - klonaliteit detecteerbaar (biklonaliteit) - klonaliteit detecteerbaar (zwak klonaal product) - klonaliteit detecteerbaar (geïsoleerd klonaal product) - klonaliteit detecteerbaar (terughoudendheid vereist, met advies voor follow-up analyse / nieuw monster) - klonaliteit detecteerbaar met B- / T-cel achtergrond
- pseudoklonaal / meerdere <u>niet-reproduceerbare</u> producten	- geen klonaliteit detecteerbaar, passend bij geringe hoeveelheid template	
- meerdere <u>reproduceerbare</u> producten (n≥3) ^b	- oligoklonaliteit / meerdere klonen detecteerbaar	- dominante kloon in oligo/polyklonale achtergrond
- polyklonaal (niet klonaal ^c)	- polyklonaliteit detecteerbaar (geen klonaliteit detecteerbaar ^c)	- polyklonaliteit detecteerbaar plus kleine kloon zonder duidelijke betekenis ^d
- niet te beoordelen	- niet te beoordelen ^e	

^a Meer gedetailleerde moleculaire interpretatie opties kunnen door de gebruiker worden aangevuld; enkele mogelijke voorbeelden zijn aangegeven

^b In geval van IGK en TCRB loci kunnen tot 4 producten detecteerbaar zijn binnen 1 kloon

^c Bij HD analyse kan een polyklonale smeer minder goed detecteerbaar zijn, ondanks specifiek product in de agarose gel; dit wordt gescoord als "niet klonaal"

^d Voor gevallen met kleine reproduceerbare pieken / banden in een polyklonale achtergrond

^e In minder dan 5% van de gevallen geen goede moleculaire interpretatie mogelijk

^f Klonale pieken / banden hoeven niet noodzakelijkerwijs in elk Ig/TCR target aanwezig te zijn om tot de moleculaire conclusie "klonaliteit gedetecteerd"

Finale moleculaire interpretatie (alle tuben samen)

Tabel 5 EuroClonality uniform scoringssysteem m.b.t. moleculaire conclusie

Overall technische beschrijving Ig/TCR	Moleculaire interpretatie / conclusie	Optioneel: meer gedetailleerde moleculaire interpretatie ^a
- geen (<u>specifiek</u>) product, slecht DNA	- niet te beoordelen, vanwege slechte DNA kwaliteit	
- geen (<u>specifiek</u>) product	- geen herschikkingen in Ig/ TCR targets detecteerbaar	
- klonaal (...nt) ^f	- klonaliteit detecteerbaar	- klonaliteit detecteerbaar (biallelische producten) - klonaliteit detecteerbaar (biklonaliteit) - klonaliteit detecteerbaar (zwak klonaal product) - klonaliteit detecteerbaar (geïsoleerd klonaal product) - klonaliteit detecteerbaar (terughoudendheid vereist, met advies voor follow-up analyse / nieuw monster) - klonaliteit detecteerbaar met B- / T-cel achtergrond
- pseudoklonaal / meerdere <u>niet-reproduceerbare</u> producten	- geen klonaliteit detecteerbaar, passend bij geringe hoeveelheid template	
- meerdere <u>reproduceerbare</u> producten (n≥3) ^b	- oligoklonaliteit / meerdere klonen detecteerbaar	- dominante kloon in oligo/polyklonale achtergrond
- polyklonaal (niet klonaal ^c)	- polyklonaliteit detecteerbaar (geen klonaliteit detecteerbaar ^c)	- polyklonaliteit detecteerbaar plus kleine kloon zonder duidelijke betekenis ^d
- niet te beoordelen	- niet te beoordelen ^e	

^a Meer gedetailleerde moleculaire interpretatie opties kunnen door de gebruiker worden aangevuld; enkele mogelijke voorbeelden zijn aangegeven

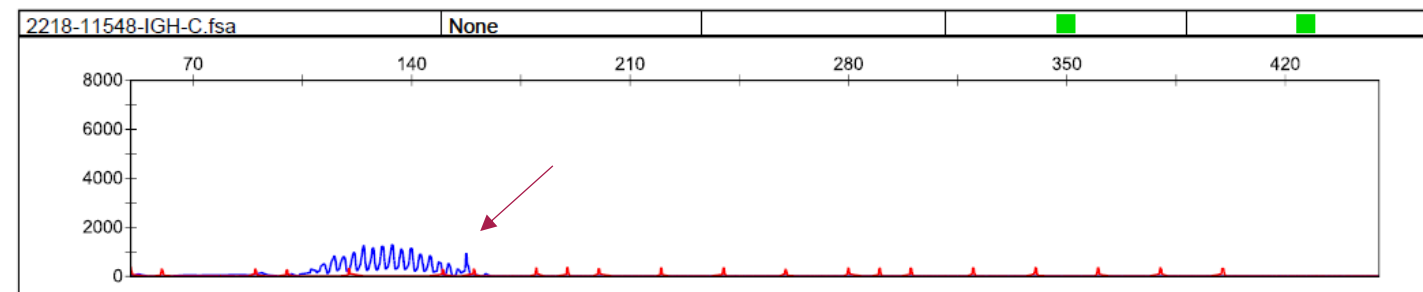
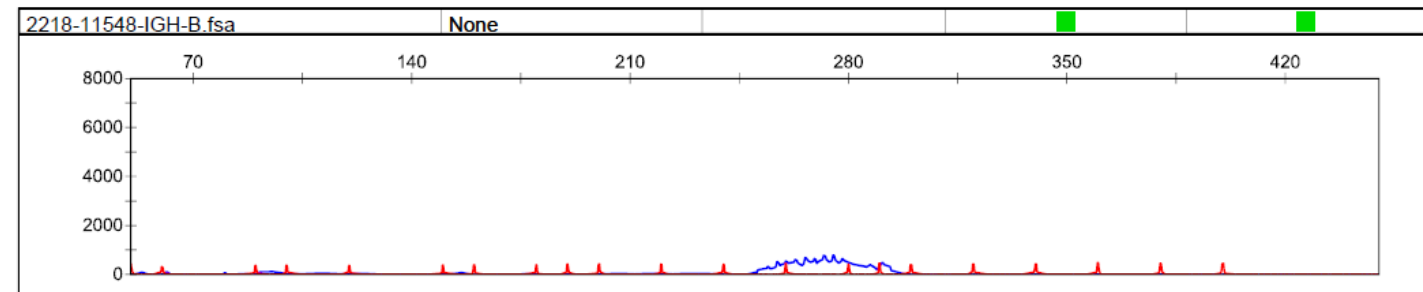
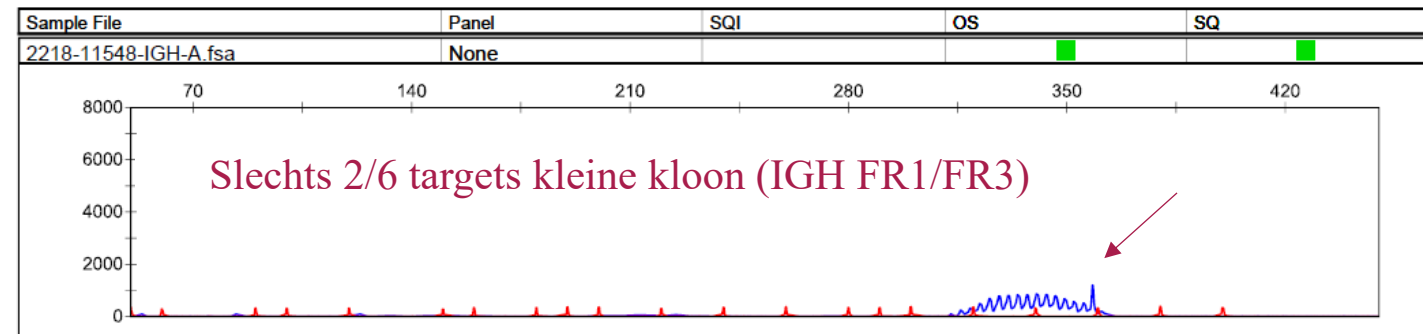
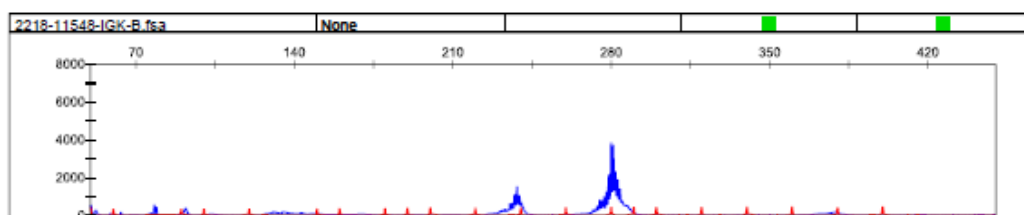
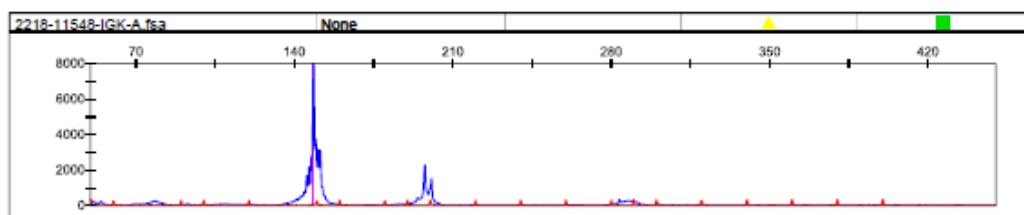
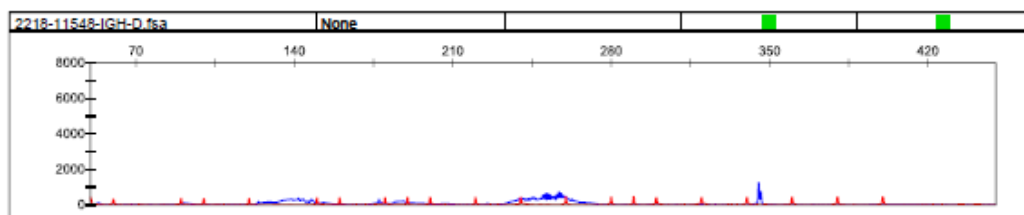
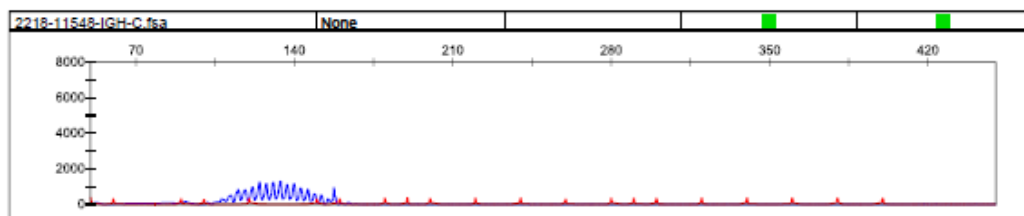
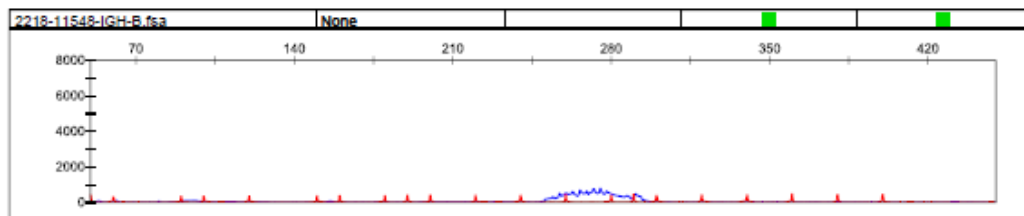
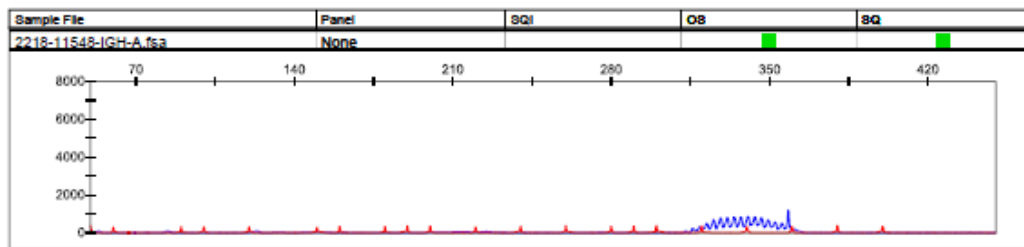
^b In geval van IGK en TCRB loci kunnen tot 4 producten detecteerbaar zijn binnen 1 kloon

^c Bij HD analyse kan een polyklonale smeer minder goed detecteerbaar zijn, ondanks specifiek product in de agarose gel; dit wordt gescoord als "niet klonaal"

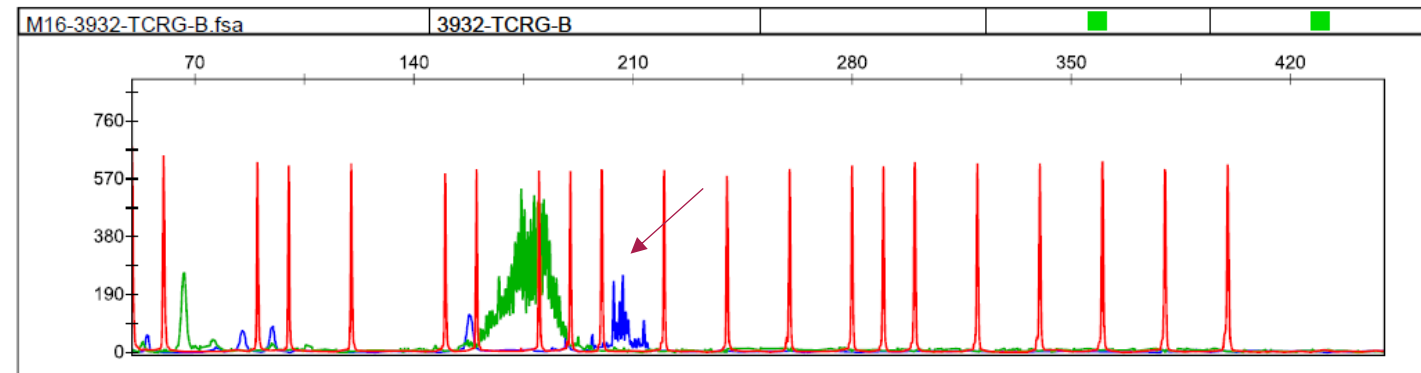
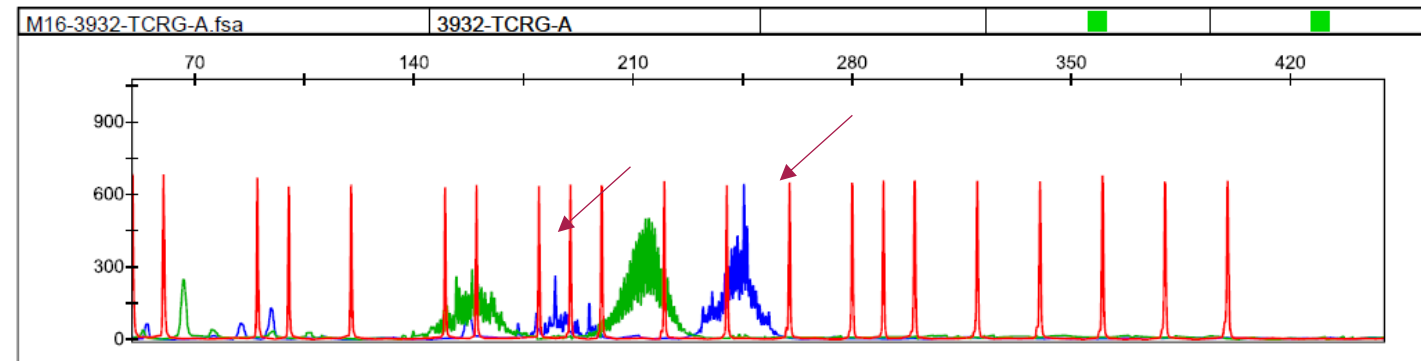
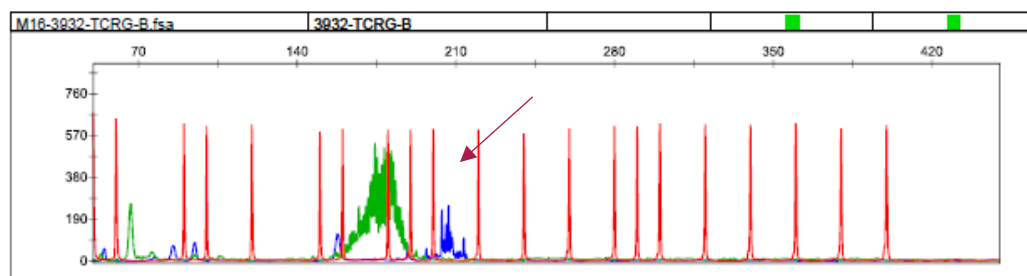
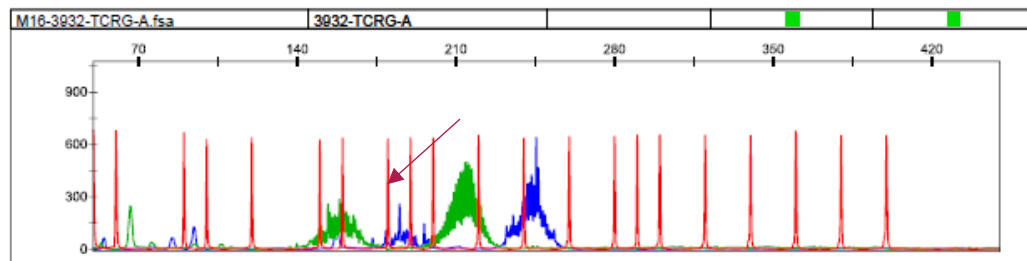
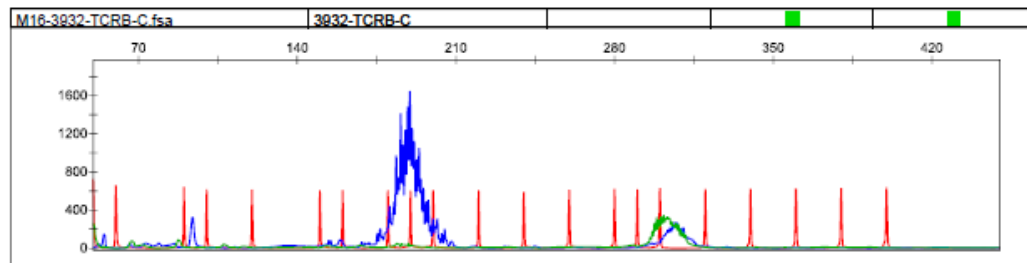
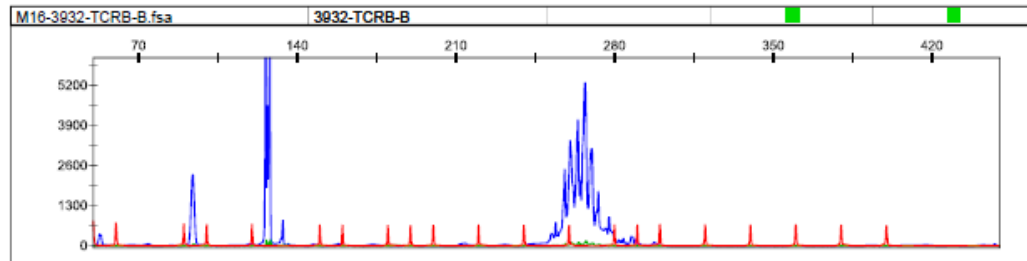
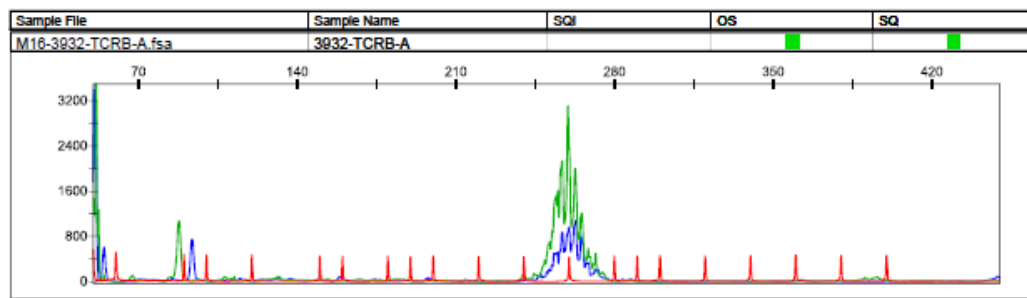
^d Voor gevallen met kleine reproduceerbare pieken / banden in een polyklonale achtergrond

^e In minder dan 5% van de gevallen geen goede moleculaire interpretatie mogelijk

^f Klonale pieken / banden hoeven niet noodzakelijkerwijs in elk Ig/TCR target aanwezig te zijn om tot de moleculaire conclusie "klonaliteit gedetecteerd"

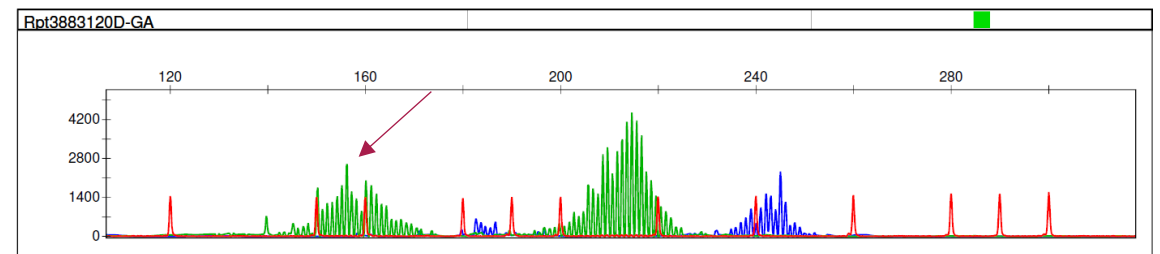
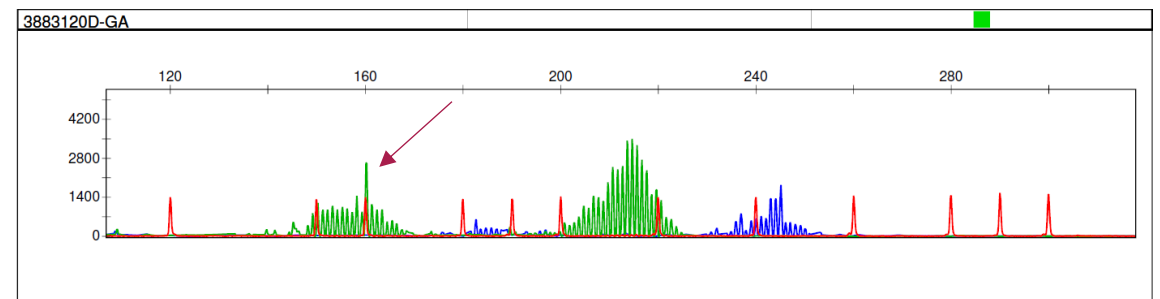
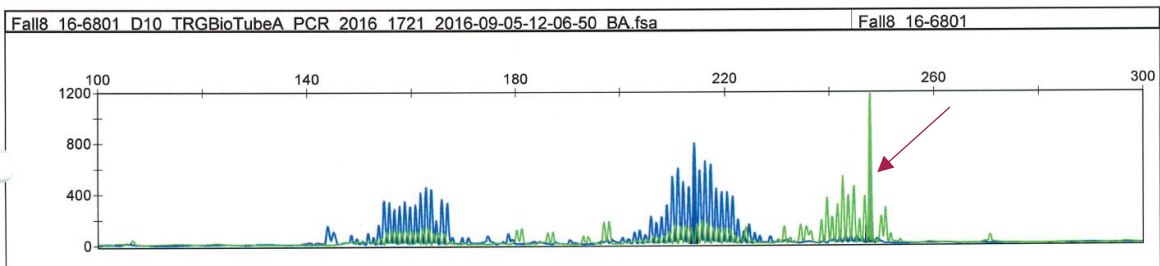
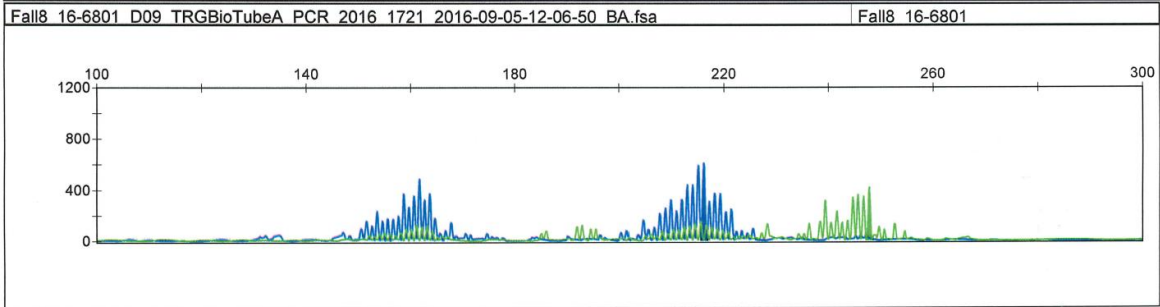


Polyklonaal plus kleine kloon zonder duidelijke betekenis
OF
Klonaliteit detecteerbaar (terughoudendheid vereist, met advies voor follow-up
analyse / nieuw monster)

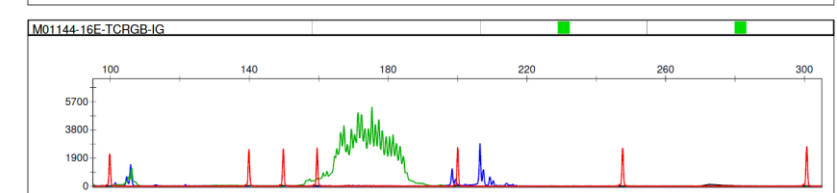
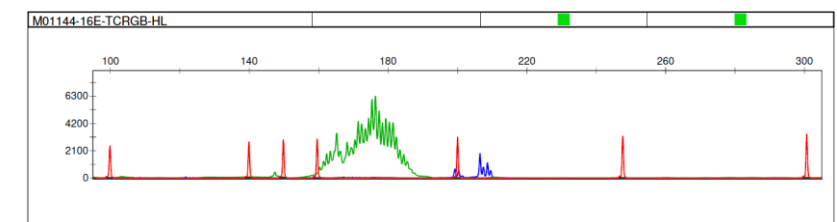
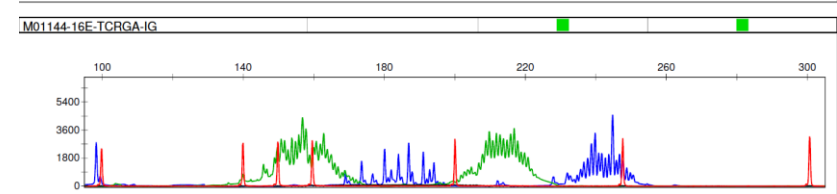
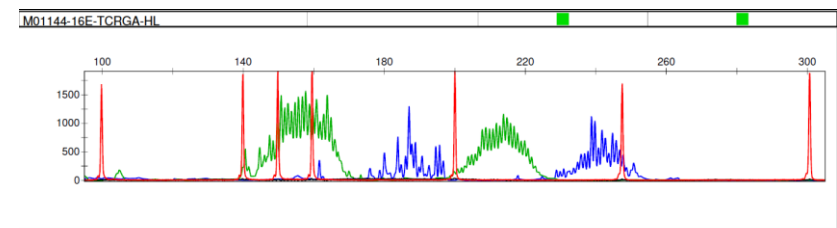


Polyklonaal plus kleine kloon(s) zonder duidelijke betekenis
OF
Klonaliteit detecteerbaar (terughoudendheid vereist, met advies voor follow-up
analyse / nieuw monster

Bij TCR patronen vaker 'kleine kloon(s)' en patroon LAB-afhankelijk



Kleine kloon(s) niet altijd reproduceerbaar
Duplo analyses helpen!

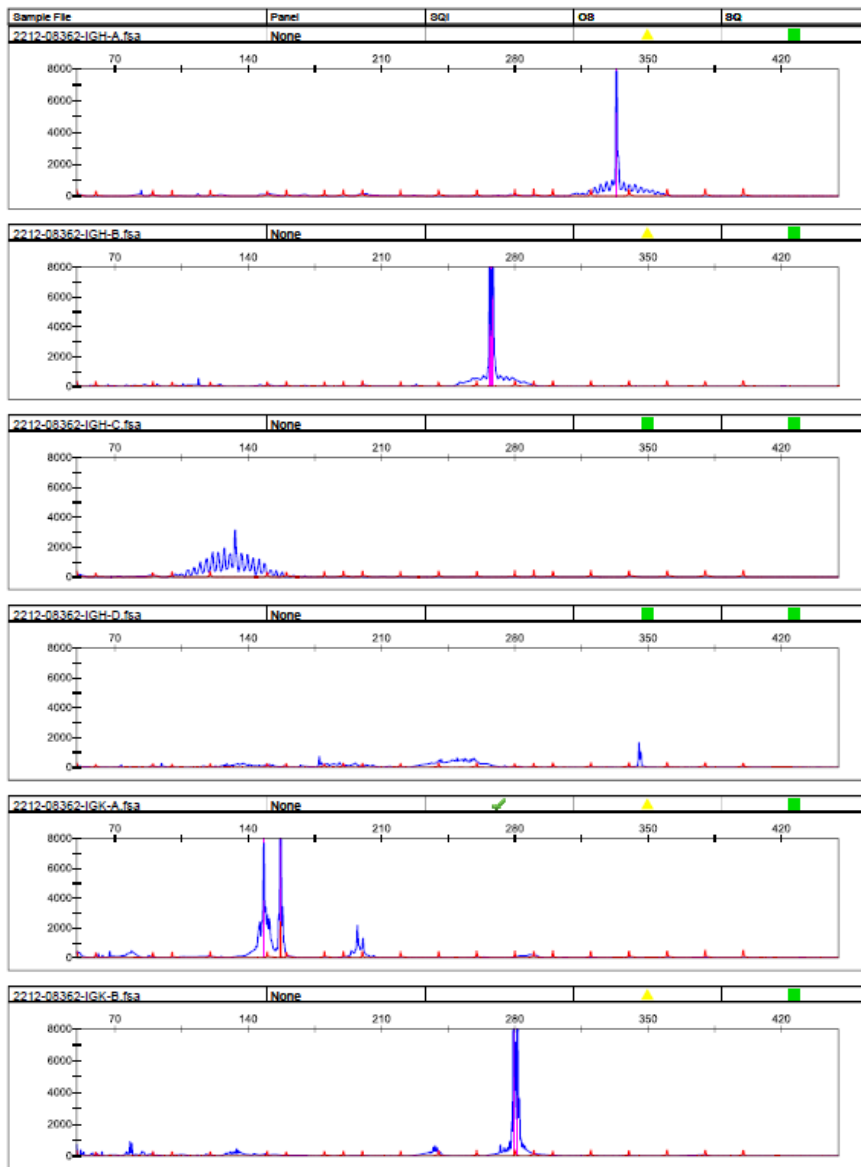


Finale moleculaire interpretatie: klonaal + polyklonaal

- klonaal (...nt)

- klonaliteit detecteerbaar

- klonaliteit detecteerbaar (biallelische producten)
- klonaliteit detecteerbaar (biklonaliteit)
- klonaliteit detecteerbaar (zwak klonaal product)
- klonaliteit detecteerbaar (geïsoleerd klonaal product)
- klonaliteit detecteerbaar (terughoudendheid vereist, met advies voor follow-up analyse / nieuw monster)
- klonaliteit detecteerbaar met B- / T-cel achtergrond



IGH Locus > 1 x VDJ (+ somatische hypermutatie)

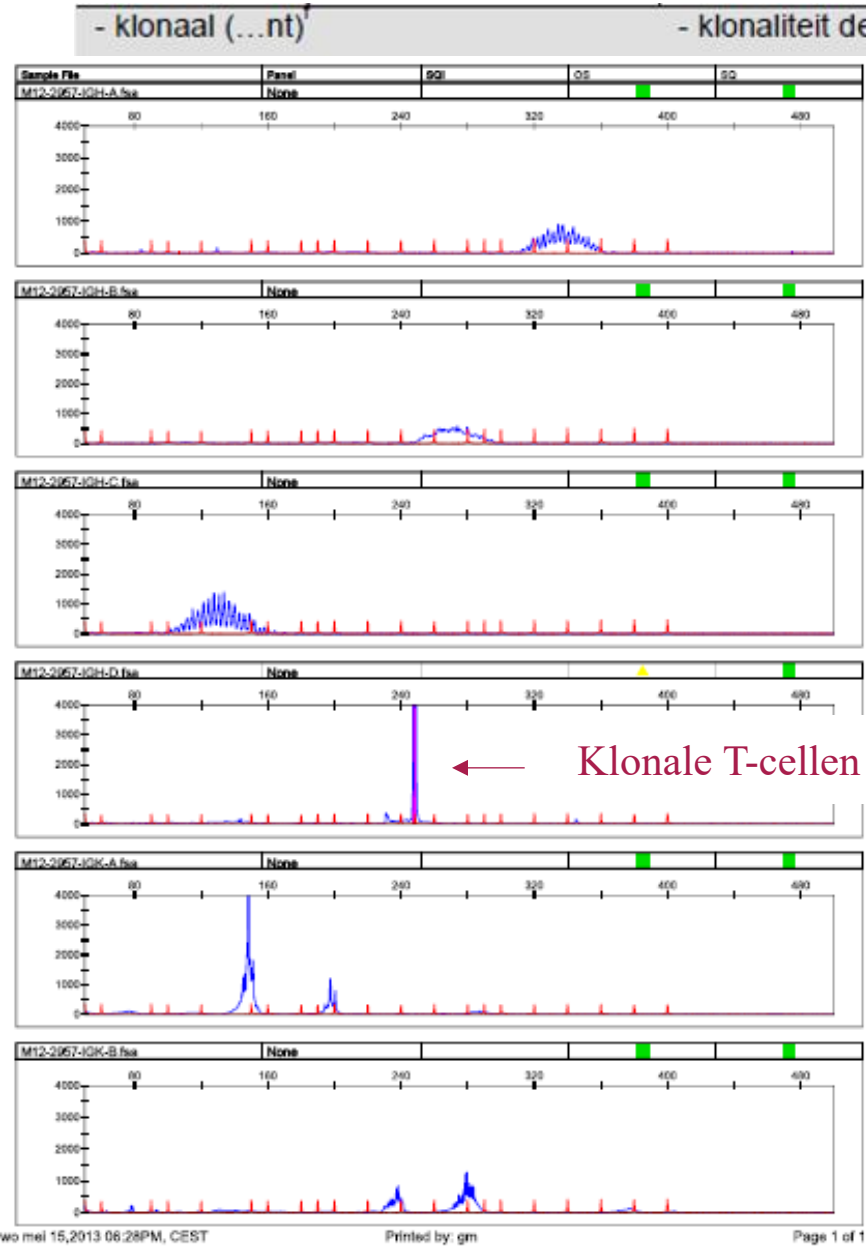
IGH Locus > in alle targets nog polyklonaal

Klonaal + polyklonaal

IGK Locus > 1 x Vk1,6,7-JK en 1 x Vk3-KDE of Intr-KDE

IGK Locus > in alle targets nog polyklonaal (soms heel zwak, tube IGK-B)

Finale moleculaire interpretatie: geïsoleerd klonaal product



- klonaliteit detecteerbaar (biallelische producten)
- klonaliteit detecteerbaar (biklonaliteit)
- klonaliteit detecteerbaar (zwak klonaal product)
- klonaliteit detecteerbaar (geïsoleerd klonaal product)
- klonaliteit detecteerbaar (terughoudendheid vereist, met advies voor follow-up analyse / nieuw monster)
- klonaliteit detecteerbaar met B- / T-cel achtergrond

IGH Locus > 1 x DJ

IGH Locus > andere tubes polyklonaal

Geïsoleerd klonaal product

Kan indicatie zijn van
CROSS-LINEAGE
herschikking

IGK Locus > polyklonaal

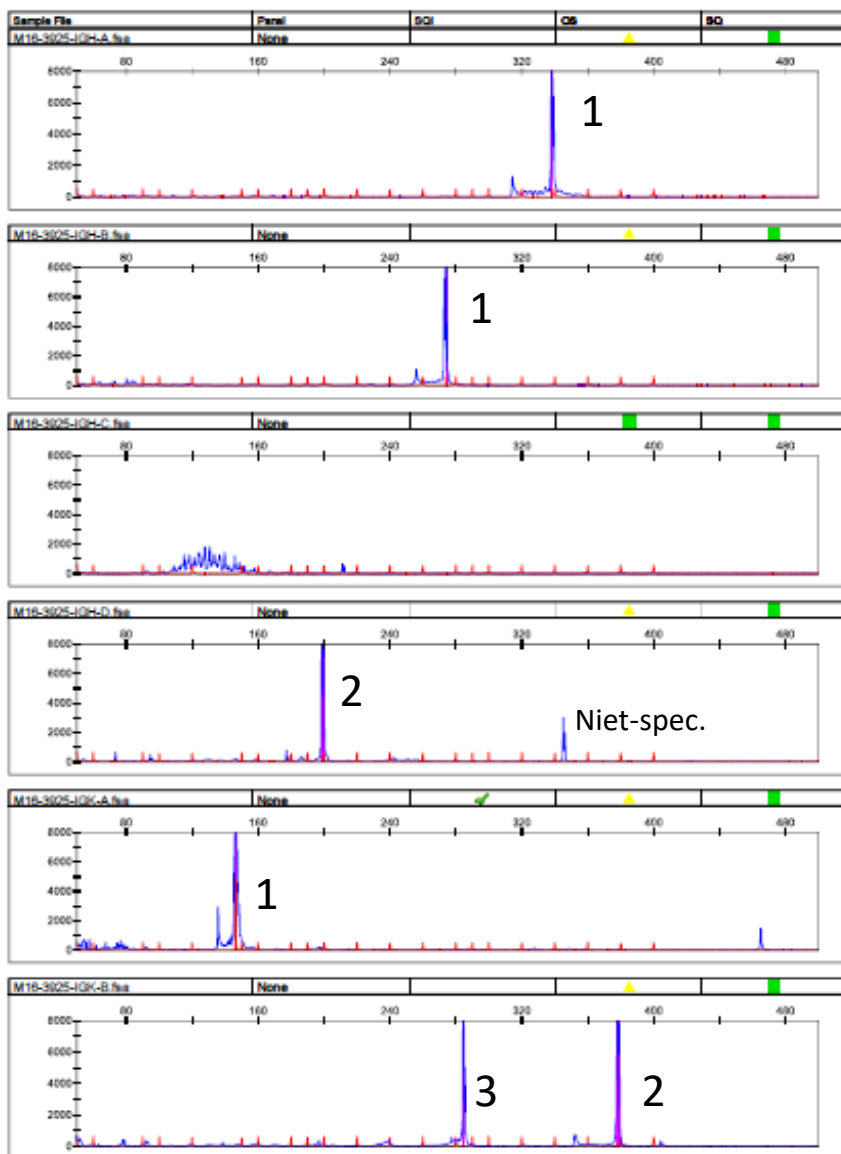
Vaak partieel herschikte genen
> DJ bij IGH en TRB

Finale moleculaire interpretatie: biallelisch versus biklonaal

- klonaal (...nt)

- klonaliteit detecteerbaar

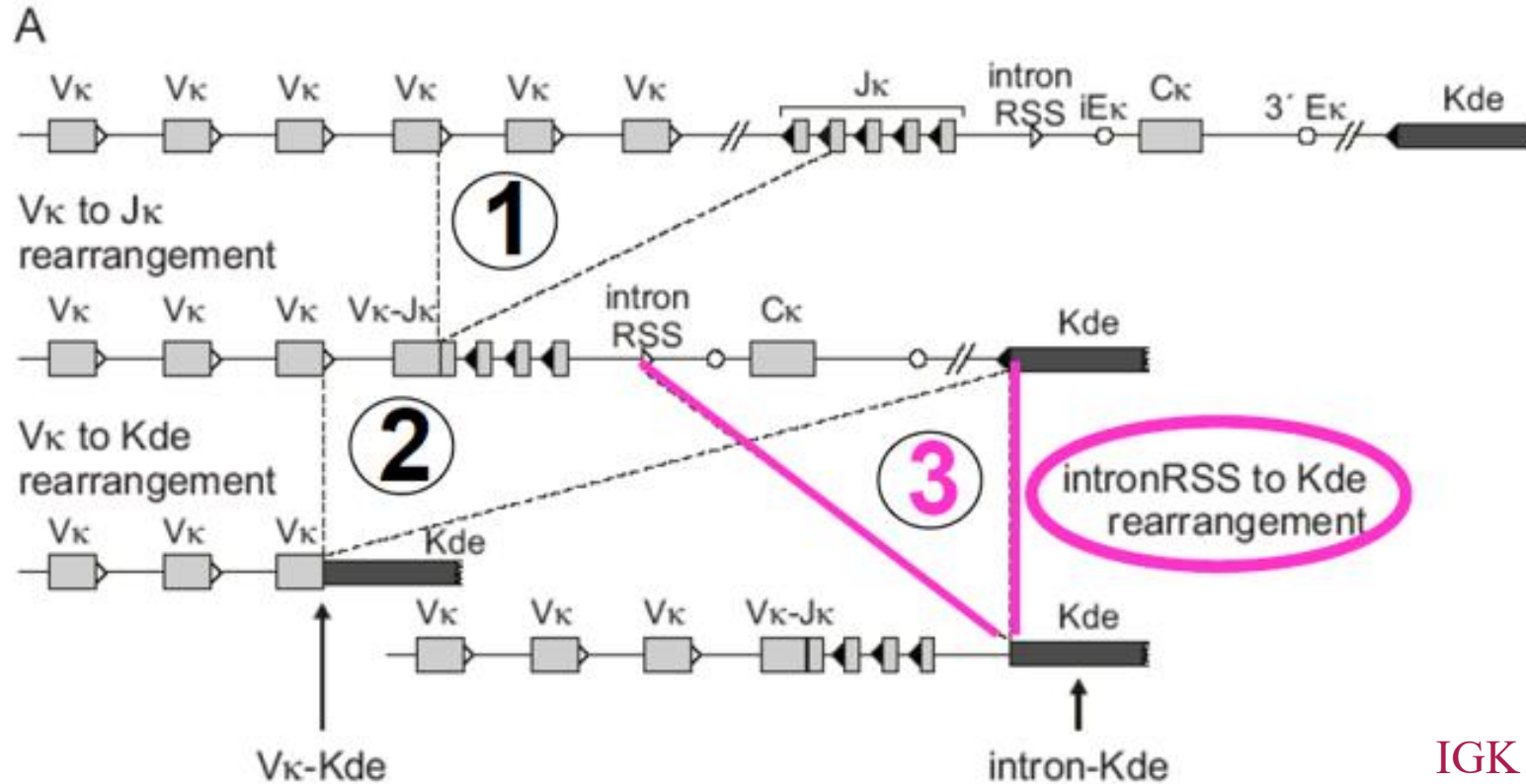
- klonaliteit detecteerbaar (biallelische producten)
- klonaliteit detecteerbaar (biklonaliteit)
- klonaliteit detecteerbaar (zwak klonaal product)
- klonaliteit detecteerbaar (geïsoleerd klonaal product)
- klonaliteit detecteerbaar (terughoudendheid vereist, met advies voor follow-up analyse / nieuw monster)
- klonaliteit detecteerbaar met B- / T-cel achtergrond



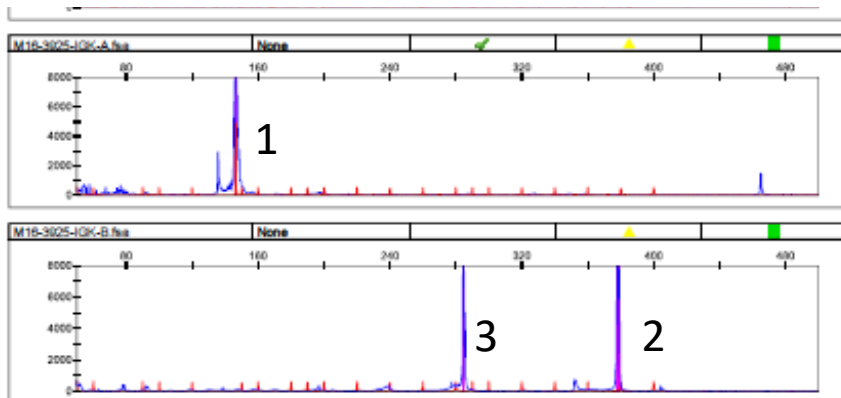
IGH Locus > 1 x VDJ (+ som. Hypermutatie) en 1x DJ
IGH Locus > biallelisch = 2 herschikte chromosomen

IGK Locus > 3 klonale pieken > 2 klonen? > NEE!

Finale moleculaire interpretatie: biallelisch versus biklonaal

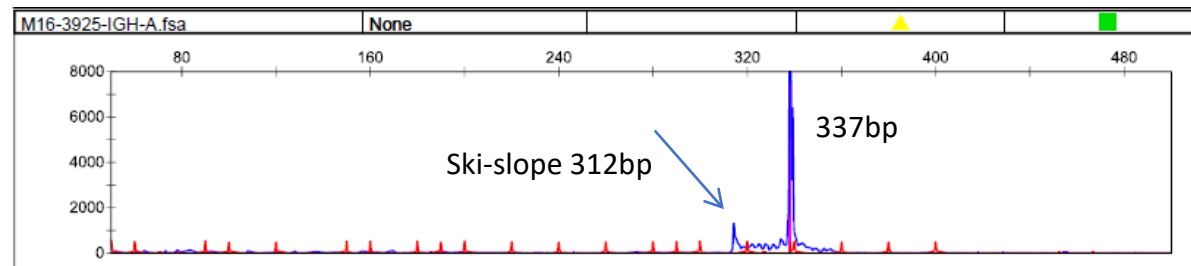
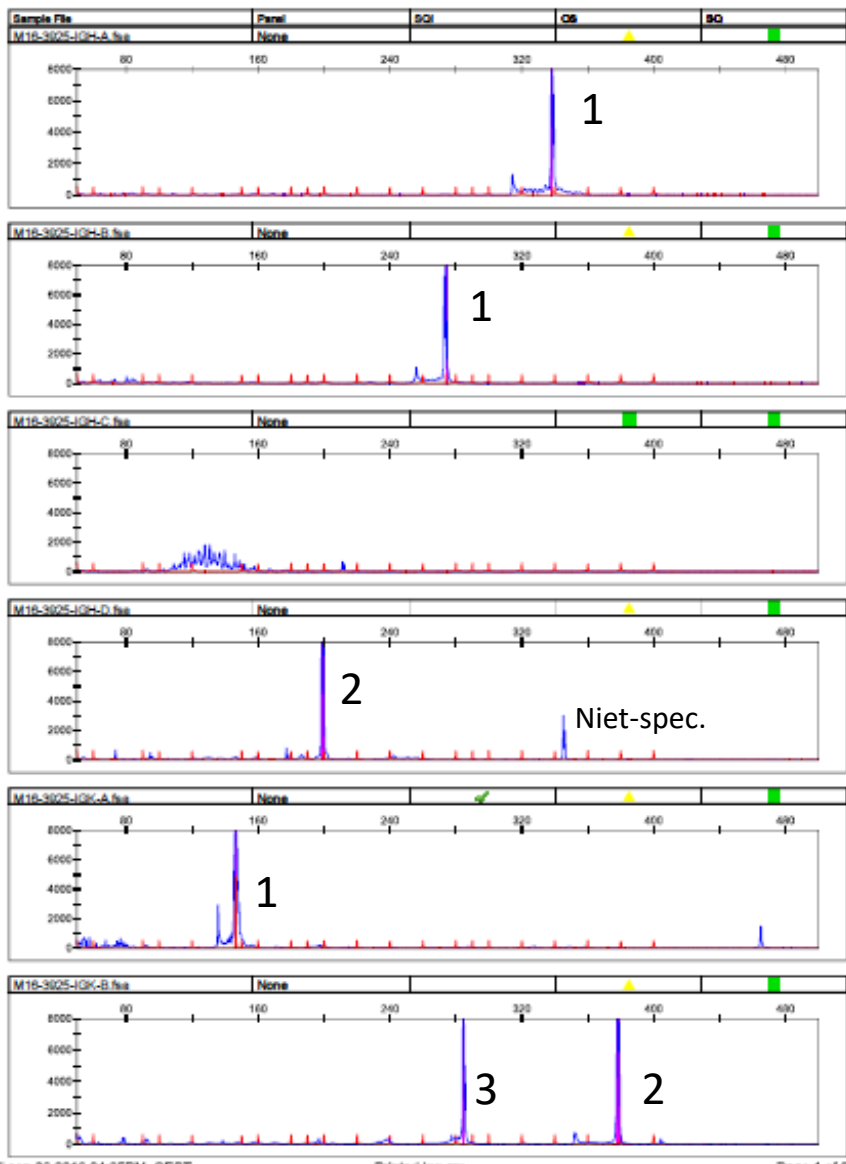


IGK Locus > 4 klonale pieken kan = 1 kloon



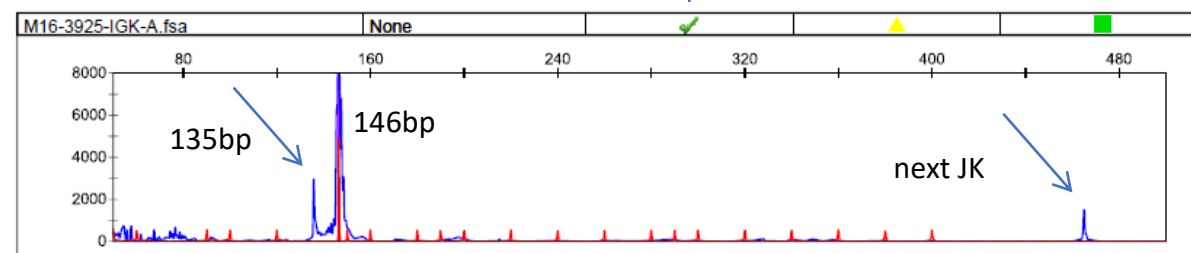
IGK Locus > 3 klonale pieken > 2 klonen? > NEE!
 IGK Locus > biallelisch = 2 herschikte chromosomen

Finale moleculaire interpretatie: biallelisch versus biklonaal



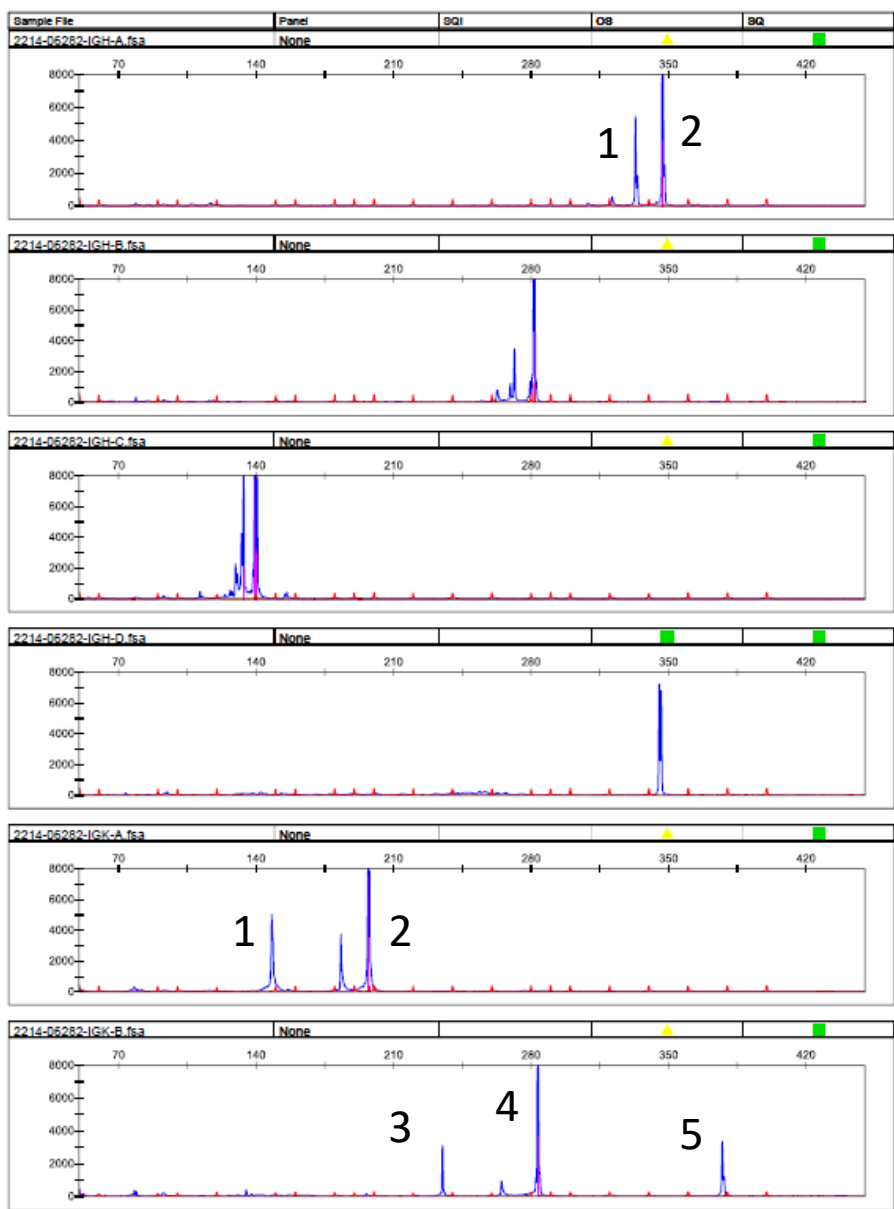
2 x VDJ + 1DJ

Biklonaal als je ski-slope (overload) of 'next JK' pieken meetelt > geen correcte interpretatie!



2 x VJ + intr/Vk3-KDE + Vk-KDE

Finale moleculaire interpretatie: biallelisch versus biklonaal



IGH Locus > 2 x VDJ
IGH Locus > biallelisch

Biklonaal (ook op flow!)

Suggestief voor 2 klonale populaties

Indicatief voor 'dubbele pathologie' of
2 klonen binnen dezelfde pathologie

Voorbeeld: MBL + DLBCL

IGK Locus > 5 pieken > biclonaal

Allel 1 = 2 + 4

Allel 2 = 1

Allel 3 = 3

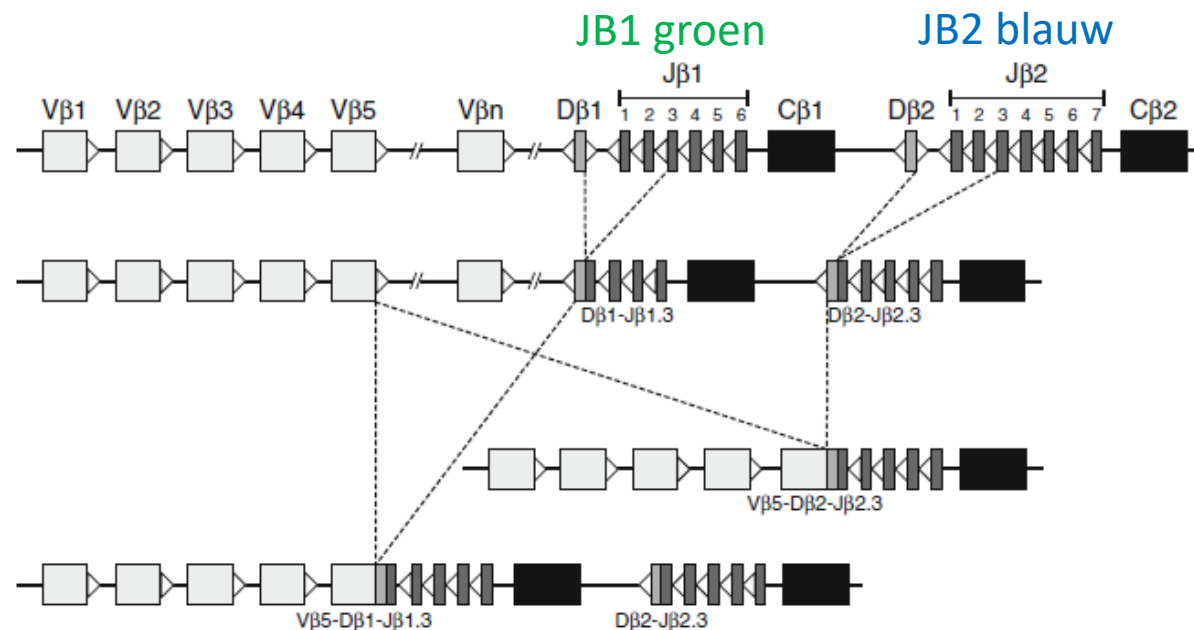
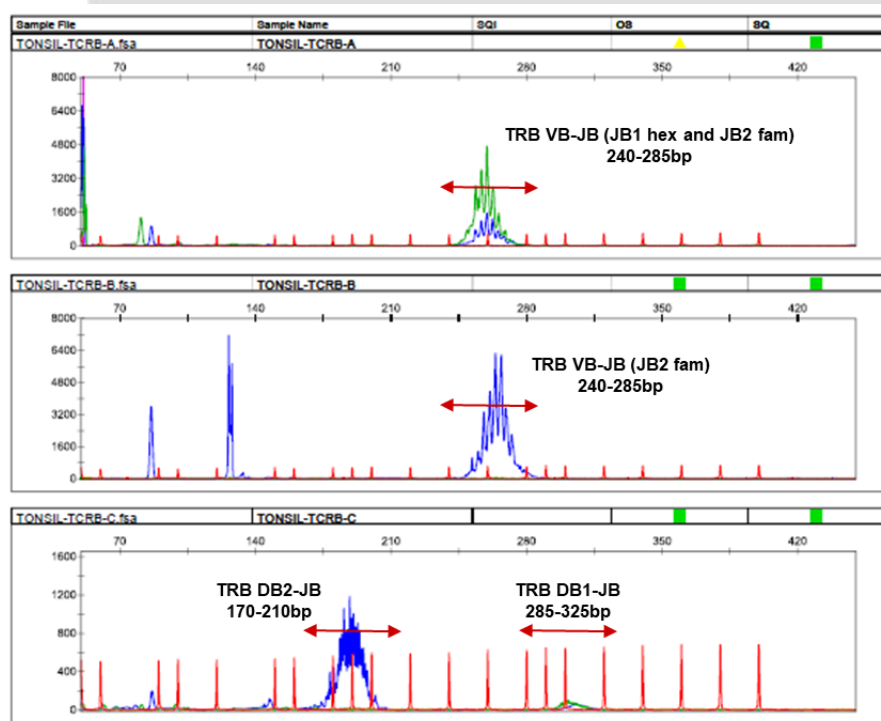
Allel 4 = 5

Finale moleculaire interpretatie: biallelisch versus biklonaal

- klonaal (...nt)

- klonaliteit detecteerbaar

- klonaliteit detecteerbaar (biallelische producten)
- klonaliteit detecteerbaar (biklonaliteit)
- klonaliteit detecteerbaar (zwak klonaal product)
- klonaliteit detecteerbaar (geïsoleerd klonaal product)
- klonaliteit detecteerbaar (terughoudendheid vereist, met advies voor follow-up analyse / nieuw monster)
- klonaliteit detecteerbaar met B- / T-cel achtergrond



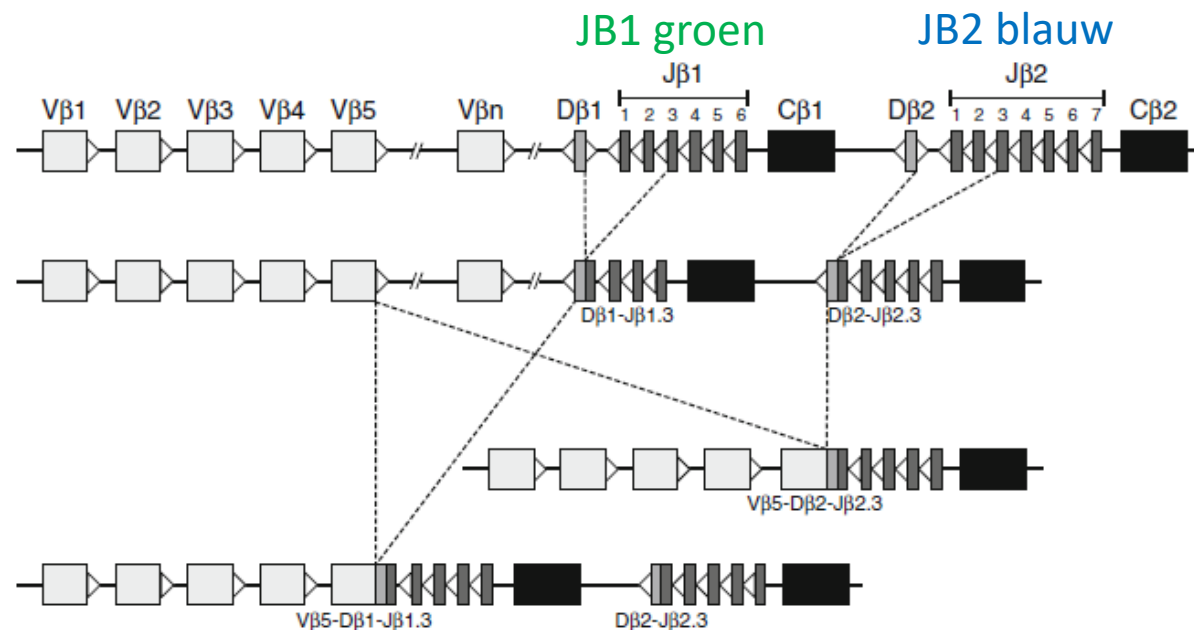
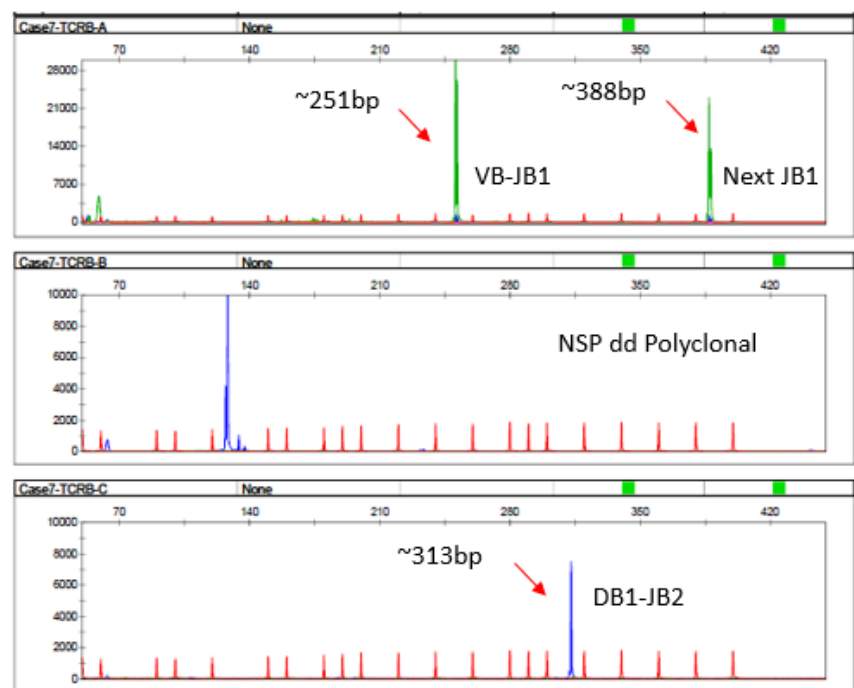
TRB Locus > 4 klonale pieken kan = 1 kloon

Finale moleculaire interpretatie: biallelisch versus biklonaal

- klonaal (...nt)

- klonaliteit detecteerbaar

- klonaliteit detecteerbaar (biallelische producten)
- klonaliteit detecteerbaar (biklonaliteit)
- klonaliteit detecteerbaar (zwak klonaal product)
- klonaliteit detecteerbaar (geïsoleerd klonaal product)
- klonaliteit detecteerbaar (terughoudendheid vereist, met advies voor follow-up analyse / nieuw monster)
- klonaliteit detecteerbaar met B- / T-cel achtergrond



TRB locus: clonal, biallelic

Allele 1 = TRBV4-TRBJ1.1 (HEX, ~251bp), next JB1.2 (HEX ~388bp)

Allele 2 = TRBD1-TRBJ2.7 (FAM, ~313bp)

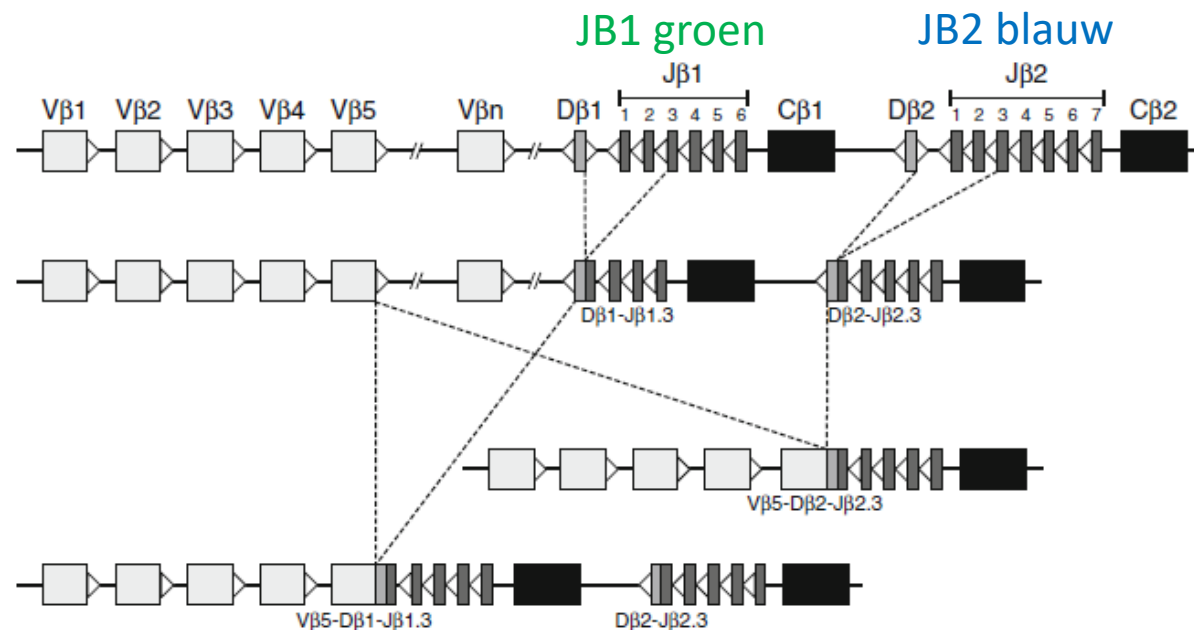
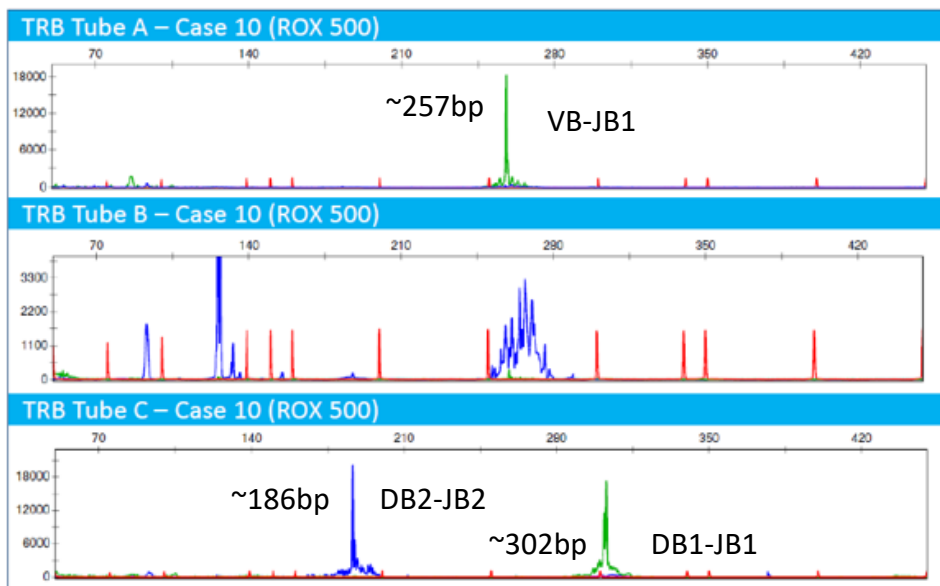
Germline afstand tussen JB1.1 en JB1.2 = 137bp (388-251 = 137bp)

Finale moleculaire interpretatie: biallelisch versus biklonaal

- klonaal (...nt)

- klonaliteit detecteerbaar

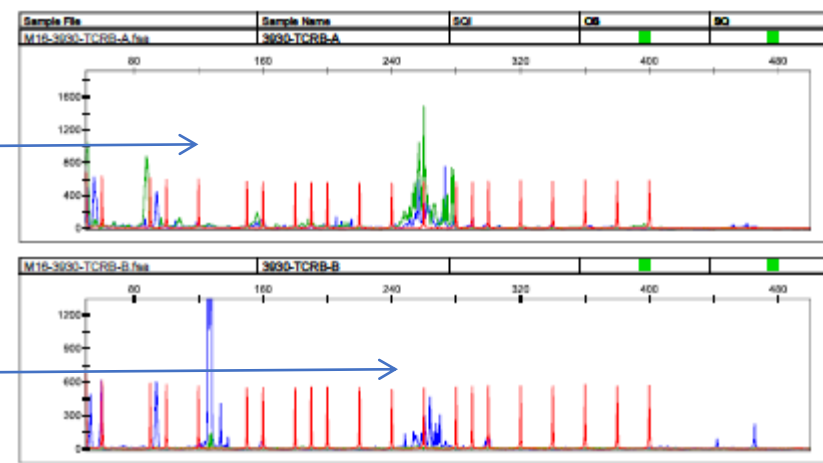
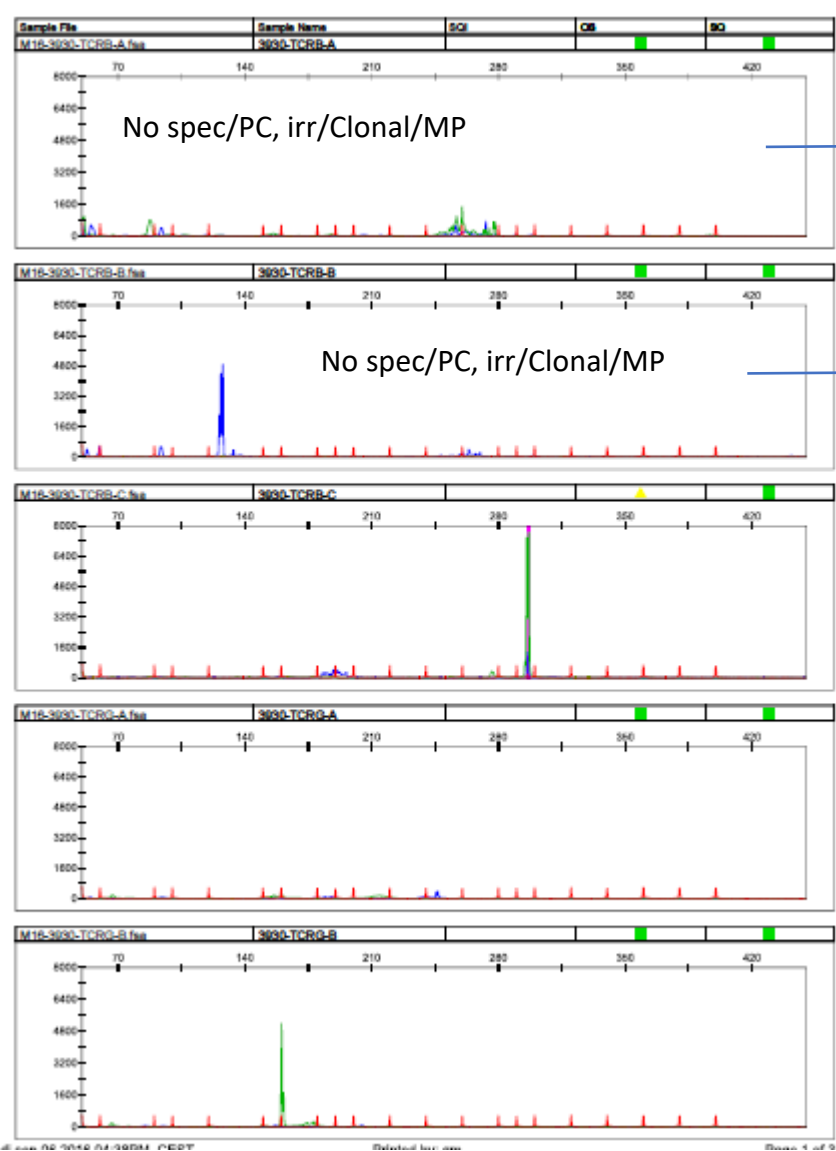
- klonaliteit detecteerbaar (biallelische producten)
- klonaliteit detecteerbaar (biklonaliteit)
- klonaliteit detecteerbaar (zwak klonaal product)
- klonaliteit detecteerbaar (geïsoleerd klonaal product)
- klonaliteit detecteerbaar (terughoudendheid vereist, met advies voor follow-up analyse / nieuw monster)
- klonaliteit detecteerbaar met B- / T-cel achtergrond



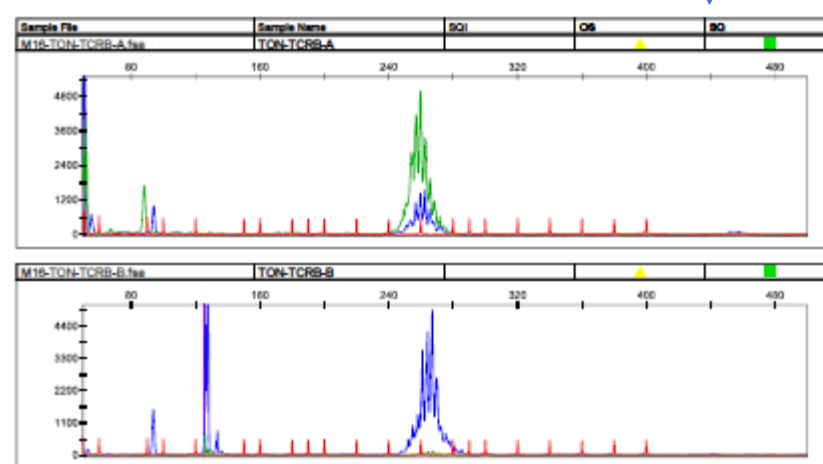
TRB locus: clonal, biallelic

Allele 1 = VB-JB1 (HEX, ~257bp) + DB2-JB2 (FAM ~186bp)
 Allele 2 = DB1-JB1 (HEX, ~302bp)

Finale moleculaire interpretatie: NIET overinterpreteren!



Very few 'normal' T-cells left as compared to normal PC pattern

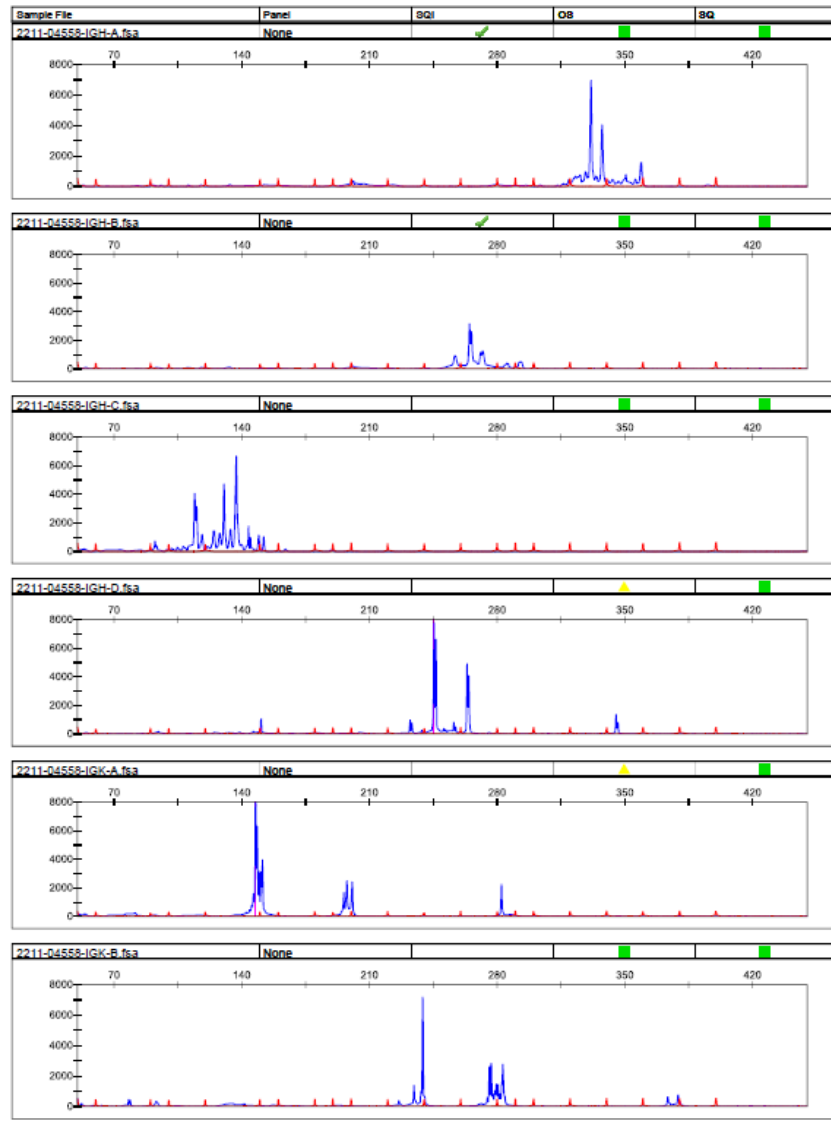


Finale moleculaire interpretatie: Oligoklonaliteit

- meerdere reproduceerbare producten ($n \geq 3$)^b

- oligoklonaliteit / meerdere klonen detecteerbaar

- dominante kloon in oligo/polyklonale achtergrond



IGH Locus > 3 x VDJ en 2x DJ
IGH Locus > minstens 3 klonen, tot 5

Oligoklonaal

Immuunactivatie

IGK Locus > 8-tal pieken > meer dan 2 klonen

Voorwaarden voor goede interpretatie van klonaliteitsanalyses

- Goede kennis van de genetische opbouw van de IG en TR genherschikkingen
- Goede kennis van de setup van de verschillende PCR-reacties en de mogelijke technische pitfalls:
 - effect van staalkwaliteit
 - effect van analyse settings
 - specifieke pieken
 - effect van somatische hypermutatie bij IGH
 - verschillende pieken van zelfde herschikking
 - Cross-annealing van primers
- Goede kennis van het normale B- of T-cel repertoire in verschillende weefsels

THANK YOU!

