Verifizierung des IdentiClone® IGL Gene Clonality Assay für die Fragmentanalyse in der Molekulardiagnostik

Renate, Trachsel, BMA 22-25

Bildungsgang Biomedizinische Analytik HF

Inselgruppe AG, Clinical Genomics Lab, Molekularpathologie

1. Zusammenfassung

Die Genumlagerungen (Rearrangements) der Immunglobulin (IG) Schwer- und Leichtketten im Knochenmark (KM) ist ein physiologischer Prozess in der Entwicklung des B-Lymphozyts. Eine klonale Expansion von B-Zellen mit identischem Rearrangement kann als Hinweis auf eine lymphatische Malignität dienen [1]. Im Clinical Genomics Lab (CGL) werden bereits die Klonalitätsanalysen der IG-Schwerketten (IGH) und IG-Kappa Leichtketten (IGK) durchgeführt. Da nicht konklusive Resultate auftreten können, wurde in dieser Diplomarbeit die IG Lambda-Leichtketten (IGL)-Analyse mittels IdentiClone® IGL Gene Clonality Assay verifiziert. Getestet wurde mittels Polymerase Kettenreaktion (PCR) amplifizierte Desoxyribonukleinsäure (DNA) aus in Formalin fixiertem in Paraffin eingebettetem (FFPE) Lymphgewebe oder Knochenmark. Die Interpretation der Ergebnisse erfolgte im Zusammenhang mit den bestehenden IGH- und IGK-Resultaten. Die Ergebnisse zeigten, dass die zusätzliche Klonalitätsanalyse die Anzahl der nicht konklusiven Resultate reduzieren kann.

2. Einleitung

Von B-Lymphozyten produzierte Immunglobuline bestehen aus schweren und leichten Ketten, wobei die Leichtketten in Kappa- und Lambda-Typen unterteilt werden. Die Genumlagerung im Knochenmark ermöglicht die spezifische Antigenbindung: Zunächst werden die schweren, dann die leichten Ketten umgelagert, indem variable (V)-, diversitäs (D)- und verknüpfende (J)-Elemente zusammengefügt und dazwischenliegende Sequenzen deletiert werden [1]. Abbildung 1 zeigt dies am Beispiel von IGH und IGK.

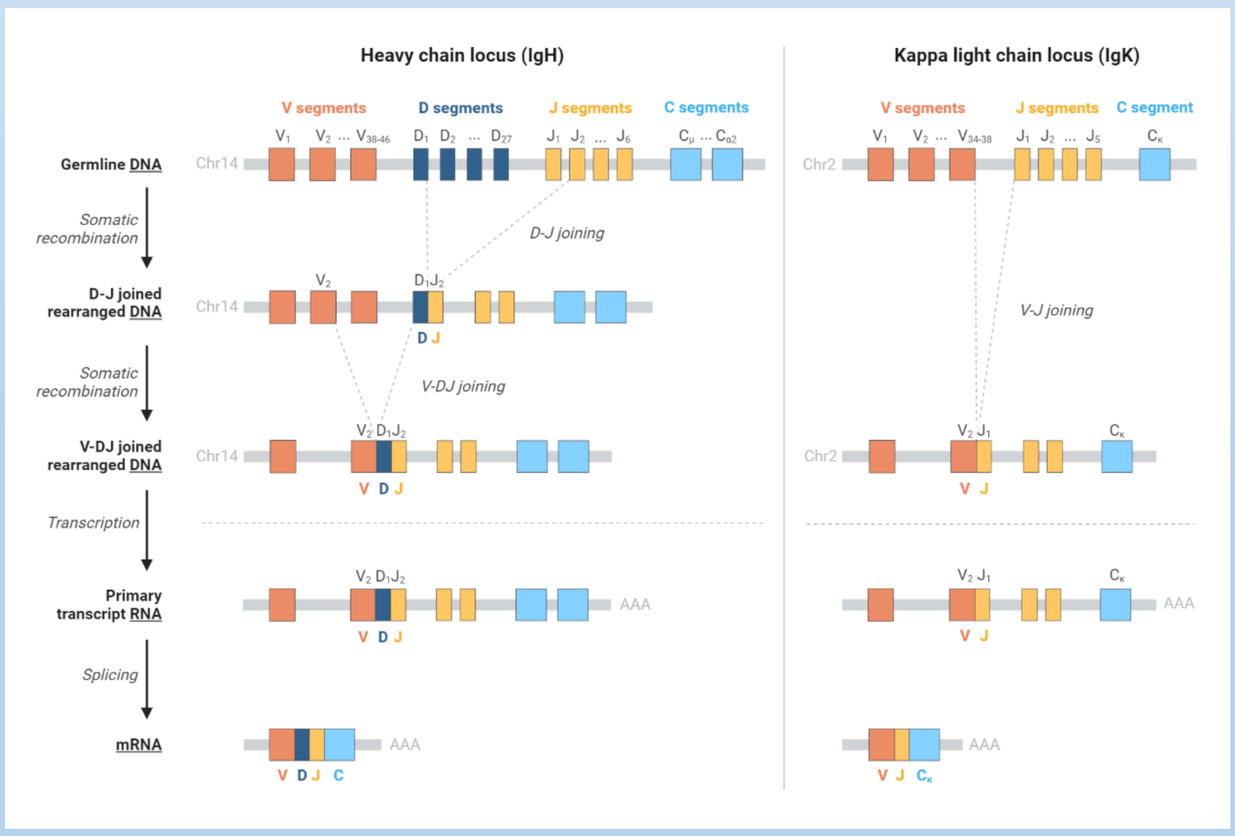


Abb. 1: Schematische Darstellung der IG Schwer- und Leichtketten Rearrangements (Maritan, 2024)

Für den Klonalitätsnachweis genügt die IGH-Analyse. Durch somatische Hypermutation (SHM) im Rahmen des IG-Klassenwechsels kann sie unzuverlässig werden, sodass eine Leichtkettenanalyse erforderlich ist [1]. IGH- und IGK-Analysen erfordern längere DNA-Fragmente (mind. 300 Basenpaare) und mehrere MasterMixe, was die Interpretation erschwert. IGL-Klonalitäten sind dagegen in kürzeren Fragmenten nachweisbar und benötigen nur einen MasterMix [2].

3. Ziele und Fragestellungen

In der Diplomarbeit wurden mehrere Ziele und Fragestellungen formuliert. In diesem Poster wird auf die Kernfrage eingegangen.

Ziel 1: Verifizierung des IdentiClone® IGL Gene Clonality Assay als zusätzliche Klonalitätsanalyse zu IGH und IGK.

Fragestellung: Ist bei IGH- und IGK-Resultaten, bei denen in der Befundung keine Aussage möglich war, durch die zusätzliche Klonalitätsanalyse IGL eine Aussage möglich?

4. Material, Methodik, Vorgehen

Für die Beantwortung der Fragestellung diente ein Probenkollektiv mit 15 DNA-Proben aus FFPE-Lymphgewebe oder FFPE-Knochenmark, bei denen die IGH- und IGK-Analyse bereits durchgeführt wurde. Weitere 5 Proben stammten aus einem IGH-/IGK-Ringversuch. Zehn der Proben lieferten in der IGH- oder IGK-Analyse keine Aussage. Der MasterMix wurde jeweils gemäss einem Protokoll pipettiert und stets im selben Thermocycler amplifiziert. Die Detektion erfolgte mittels Kapillarelektrophorese am ABI3500.

5. Ergebnisse, Resultate

Tabelle 1 zeigt Proben mit unklarer IGH/IGK-Klonalität und deren Ergebnisse der IGL-Analyse. Polyklonale Resultate wurden mit dem ○-Symbol und monoklonale Resultate mit dem ●-Symbol dargestellt. Nicht interpretierbare Ergebnisse wurden mit n/v gekennzeichnet. Bei 50 % der Proben ermöglichte IGL eine Klonalitätsaussage. Diese Ergebnisse wurden in der Kommentarspalte mittels grüner Markierung hervorgehoben.

Tabelle 1: Ermittlung der Aussagekraft im Befund bei unklarer GH/IGK-Klonalität (Trachsel, 2025)

Probe	DNA-Fragmentlänge (bp)	Befundaussage IGH (Mix 1, 2, 3)	Befundaussage IGK (Mix A, B)	Resultat IGL	Kommentar
Fall 1	200	1+2: ● 3: ○	A: ● B: n/v	○	Detektion in kürzeren DNA-Fragmenten führt zu eindeutigem Befund
Fall 3	200	1: n/v 2+3: ○	A: n/v B: n/v	○	Detektion in kürzeren DNA-Fragmenten führt zu eindeutigem Befund
Fall 6	300	1+2: n/v 3: ●	A: ● B: ●	●	IGL konsistent mit IGH und IGK
Fall 7	200 (schwaches Signal)	1+2: n/v 3: ○	A: ● B: ●	○	SHM-Verdacht, starke DNA-Fragmentierung, Immunhistochemie: Lambda-Klonalitätsnachweis
Fall 9	200	1+2: n/v 3: n/v	A: n/v B: ●	●	Verdacht auf SHM und starke DNA-Fragmentierung. IGL erzeugt eindeutiges Resultat
Fall 10	200 (schwaches Signal)	1+2: n/v 3: ●	A: n/v B: n/v	○	starke DNA-Fragmentierung, Klonalität nicht ausgeschlossen
Fall 11	300	1-3: ● vor polyklonalem Hintergrund	A: n/v B: ●	○	Klonalität nicht ausgeschlossen
Fall 12	300	1+3: ○ 2: ●	A: n/v B: ●	○	Schwaches Signal im IGL-Assay, Klonalität nicht ausgeschlossen
Fall 13	200	1+2: n/v 3: ●	A: n/v B: n/v	●	Detektion in kürzeren DNA-Fragmenten führt zu eindeutigem Befund
Fall 15	300	1+3: ● 2: n/v	A: n/v B: n/v	●	Verdacht auf SHM, IGL erzeugt eindeutiges Resultat

6. Diskussion

Der Hauptvorteil des IGL-Assays liegt in der Detektion von Amplifikaten im niedrigen Fragmentlängenbereich ohne von einer SHM beeinflusst zu werden. Der diagnostische Mehrwert für den Befund wurde bestätigt. Limitationen bestehen bei polyklonalem Hintergrund und schwachen Signalen durch DNA-Fragmentierung. Besonders auffällig war Fall 7, da trotz monoklonalem IGK-Resultat ein monoklonales IGL-Resultat ausblieb. Die reduzierte Sensitivität beruht vermutlich auf zu wenigen ausreichend langen Fragmenten.

Referenzen

[1] Van Dongen, J. J. M. et al. (2003). Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphopoliferations: Report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. *Leukemia*, 17(*12*), 2257–2317. https://doi.org/10.1038/sj.leu.2403202

[2] Invivoscribe Inc. (2023*). IdentiClone IGL Gene Clonality Assay, Gebrauchsanweisung*. https://invivoscribe.com/uploads/products/instructionsForUse/280528.pdf

Abbildungen

Abb. 1 Maritan, M., (2024). *VDJ-Recombination*. Webseite. Abgerufen am 17.04.2025 von https://app.biorender.com/biorender-templates/details/t66741920e35cb7501c88c9fd-vdj recombination/?source=gallery

Tabellen

Tabelle 1 Trachsel, R., (2025). *Ermittlung der Aussagekraft im Befund bei unklarer IGH/IGK-Klonalität.* medi.