

# Klonaliteits bepaling in B-cel non-Hodgkin lymfoom aan de hand van Next generation sequencing data van de Immunoglobuline genen.

Ryanne Rutkens (s1103041)  
Amsterdam UMC, locatie Vumc.  
Tumor genome analysis core, afdeling pathologie

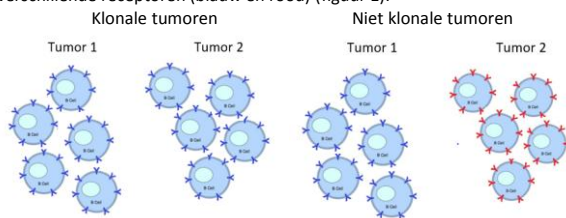
## Introductie

### Primary central nervous system en primary testicular lymphoma

Primary central nervous system lymphoma (PCNSL) en primary testicular lymphoma (PTL) zijn zeer zeldzame vormen van B-cel non-Hodgkin lymfoom. Patienten met deze lymfomen hebben een grote kans op terugkeer van een tumor. Het is belangrijk om te weten of de tweede tumor een uitzaaiing is van de eerste tumor zodat de behandeling hierop aangepast kan worden. Bij een uitzaaiing van de tumor heeft de eerste behandeling niet goed gewerkt en moet dus een andere behandeling worden toegepast. Als de tweede tumor geen uitzaaiing is kan de eerste behandeling nog een keer herhaald worden. Er is een sample set van 10 PCNSL en PTL tumor paartjes (twee tumoren van dezelfde patiënt) aanwezig waarvan de klonaliteit bepaald moet worden.

### Klonaliteit

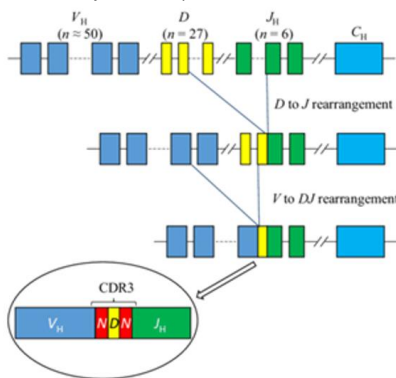
Om te bepalen of de tweede tumor een uitzaaiing is van de eerste kan er een klonaliteitstest gedaan worden op de receptoren van de B-cel. Als de receptoren hetzelfde zijn tussen twee tumoren zijn de tumoren 'klonaal', en is er sprake van een uitzaaiing. Als de receptoren verschillen tussen de twee tumoren zijn deze niet klonaal en zijn de tumoren afzonderlijk van elkaar ontstaan. De klonale tumoren bevatten dezelfde receptoren (blauw) en de niet klonale tumoren bevatten verschillende receptoren (blauw en rood) (figuur 1).



Figuur 1. B-cel receptoren tussen klonale tumoren zijn hetzelfde. B-cel receptoren tussen niet klonale tumoren verschillen van elkaar.

### VDJ recombinitie

De B-cel receptoren zijn opgebouwd uit de Immunoglobuline genen. De genen zijn opgebouwd uit verschillende segmenten: variable (V), diversity (D) en joining (J). Bij het vormen van de B-cel receptor worden drie van deze segmenten samengevoegd tot één V(D)J recombinitie. In figuur 2 is de V(D)J recombinitie van de Immunoglobuline genen weergegeven. Door naar de V(D)J recombinitie van twee tumoren te kijken kan bepaald worden of de tumoren klonaal zijn of niet.



Figuur 2. V(D)J recombinitie van de B cel. Eén V segment, één D segment en één J segment worden aan elkaar gekoppeld om de uiteindelijke VDJ recombinitie te vormen.

### Data

De tumoren worden in het lab gesequenced met Illumina Next generation sequencing. Hierbij worden ook de Immunoglobuline genen gesequenced. De data wordt hierna verwerkt tot een gealigned Bam bestand.

## Onderzoeksvraag

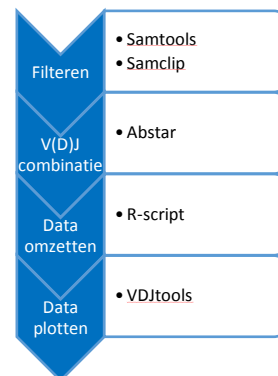
Het doel van het project is om de volgende twee onderzoeksvragen te beantwoorden.

- Is het mogelijk om de V(D)J recombinitie van de Immunoglobuline genen uit de NGS data te halen om de klonaliteit te bepalen?
- Zijn de 10 gepaarde PCNSL en PTL samples klonaal?

### Bronnen:

van Dongen JMM, Langerak AW, Kroese FGM. Vorming en expressie van antigeenreceptoren op T- en B-lymfocyten. Immunologie. Houten: Bohn Stafleu van Loghum; 2009

Dunn-Walters D, Thiede C, Alpen B, Spencer J. Somatic hypermutation and B-cell lymphoma. Philosophical transactions of the royal society B. January 2001;356(1405).



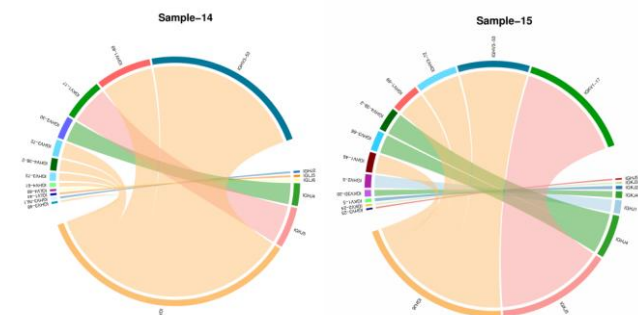
Figuur 3. De verschillende stappen van de pipeline zijn weergegeven.

## Materiaal en Methode

Om de onderzoeksvragen te beantwoorden is er een pipeline gebouwd die de V(D)J recombinitie uit de NGS data kan halen. In figuur 3 zijn de verschillende stappen van de pipeline te zien. Als eerst wordt de data gefilterd. Het filteren van de data versnelt de analyse en zorgt voor minder ruis in de data. Hierna wordt de V(D)J recombinitie bepaald met het programma abstar. De data wordt vervolgens omgezet met behulp van een R-script zodat het ingelezen kan worden in het programma VDJtools. Dit programma plote de data zodat deze op een grafische manier weergegeven kan worden.

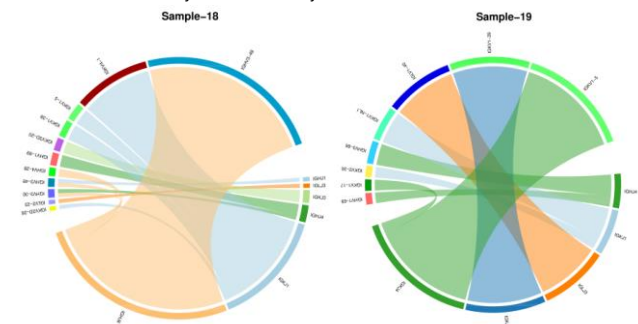
## Resultaten

Op basis van de plots die geproduceerd worden door VDJtools is de klonaliteit van de samples bepaald. In figuur 4 en figuur 5 zijn plots te zien van vier verschillende samples. In de plotjes is aan de onderkant het J-segment weergegeven en aan de bovenkant het V-segment. De lijnen tussen de J- en V segmenten laten zien welke combinatie aanwezig is in het sample. Als de combinatie hetzelfde is tussen de samples is het sample klonaal. In figuur 4 zijn twee klonale samples te zien. De grootste combinaties (oranje naar blauw en roze naar groen) zijn hetzelfde in beide samples.



Figuur 4. Voorbeeld van twee klonale samples

In figuur 5 zijn twee samples te zien die niet klonaal zijn aan elkaar. De combinaties die in het ene sample voorkomen, zijn niet aanwezig in het andere sample en vice versa. Deze tumoren zijn dus afzonderlijk van elkaar ontstaan.



Figuur 5. Voorbeeld van twee niet klonale samples

## Conclusie

Het doel van het project was het bouwen van een pipeline die de V(D)J recombinitie uit de data kan halen. Dit is mogelijk door het combineren van verschillende programma's in de stappen van de pipeline. Op basis van de output die de pipeline geeft kan de klonaliteit van de tumorsamples bepaald worden. Van de tien gepaarde PCNSL en PTL samples zijn er 6 klonaal, 2 niet klonaal en 2 van de samples hadden te weinig reads met een V(D)J recombinitie om de klonaliteit te bepalen. Om de analyse nog verder te verbeteren zou de output van de pipeline nog vergeleken kunnen worden met als bestaande klonaliteitsbepalings methoden.

Birney B, Burton DR. Massively scalable genetic analysis of antibody repertoires. *bioRxiv*. October 2018.

Shugay M. VDJtools: a framework for post-analysis of repertoire sequencing data. *vdjtools-doc.readthedocs.io*. 2015. Available at: <https://vdjtools-doc.readthedocs.io/en/master/>.