

## RNA sequencing analyse bij hematologische maligniteiten

Met Next Generation Sequencing (NGS) worden met het **PanCancer\_v1** RNAseq panel fusietranscripten opgespoord die relevant zijn bij patiënten met acute lymfoblastaire leukemie (ALL), acute myeloïde leukemie (AML) of hypereosinofilie (HES). Dit panel bevat probes gericht tegen 171 genen en wordt naast de hematologische toepassingen ook gebruikt voor de detectie van fusietranscripten bij solide maligniteiten.

### Uitvoering en data-analyse

De analyse maakt gebruik van een custom capture-gebaseerd panel (TWIST Bioscience), waarbij zowel gekende als nieuwe fusiepartners kunnen opgespoord worden van de genen van interesse. Na aanrijking gebeurt de sequencerijng op een NextSeq2000 of NovaSeq6000 (Illumina) toestel. Vervolgens worden de bekomen sequenties gealigneerd met het menselijk genoom (GRCh38/hg38) en worden de fusietranscripten geïdentificeerd met behulp van de nf-core rnafusion pipeline. De library preparation, sequencerijng, primaire en secundaire data-analyse wordt uitgevoerd door het platform Moleculaire Diagnostiek UZ Gent (MDG) (<https://www.cmgg.be/nl/zorgverlener/labguide/platform-moleculaire-diagnostiek-uz-gent-mdg>).

**Overzicht van de genen en exonen die geanalyseerd worden met het PanCancer\_v1 RNAseq panel en de gebruikte referentiesequenties. Voorlopig worden enkel de gedetecteerde fusies gerapporteerd. Voor sommige genen worden regio's uit meerdere transcripten getarget. Deze staan steeds op verschillende lijnen voor dit gen.**

Gen	Transcript ID (hg38 e110)	Regio
ABL1	NM_005157.6	ex1-5
ABL2	NM_005158	ex2-8
AFF2	NM_002025.4	ex4-10
ALK	NM_004304.5	alle exonen + intron 19
BCL11B	NM_138576	alle exonen
BCOR	NM_001123385.2 NM_017745.6	alle exonen ex8
BCR	NM_004327	alle exonen
BRAF	NM_004333.6	alle exonen
CAMTA1	NM_015215.4	ex3 + ex8-10
CBFA2T3	NM_005187	ex10-12
CBFB	NM_022845	ex4-5
CD28	NM_006139	alle exonen
CIC	NM_015125.5	ex12 + ex14-21
COL6A3	NM_004369.4	ex1-15 + ex40-44
CREBBP	NM_004380	ex2-7 + ex15-16
CRLF2	NM_022148	ex1 + ex3
CSF1	NM_000757.6 NM_172212.3	ex2-7 ex8-9
CSF1R	NM_005211	ex9-14
CTNNA1	NM_001904.4	ex2-4 + ex7-8
DEK	NM_003472	ex2-3 + ex9
DUX4	NM_001293798	ex1
EBF1	NM_024007	ex10-15
EGFR	NM_005228.5	ex1 + ex3 + ex7-9 + ex12 + ex15-21 + ex24-25

Gen	Transcript ID (hg38 e110)	Regio
EPC1	NM_025209.5	ex6-7 + ex9-11
EPOR	NM_000121	ex8
ERBB2	NM_004448.4	ex4-5 + ex8 + ex11-27
ERG	NM_004449.4	alle exons
ESR1	NM_000125.4	alle exons
ETV5	NM_004454.3	ex2-3 + ex7-9
ETV6	NM_001987.5	ex1-7
EWSR1	NM_005243.4	ex4-14
FGFR1	NM_023110.3	alle exons
FGFR2	NM_000141.5	alle exons
FGFR3	NM_000142.5	alle exons + intron 17
FIP1L1	NM_030917.4	ex9-18
FLT3	NM_004119	ex14-19
FN1	NM_212482.4	ex11-42
FOS	NM_005252.4	ex4
FOSB	NM_006732.3	ex1-2
FOXO1	NM_002015.4	alle exons
FOXR2	NM_198451.4	alle exons
FRK	NM_002031.3	ex1-6
FUS	NM_004960.4	alle exons
GLI1	NM_005269.3	ex4-7
GLIS2	NM_032575	ex4
GREB1	NM_014668.4	ex3-10
GRM1	NM_001278064.2	alle exons
HLF	NM_002126	ex4
HMGA2	NM_003483.6	alle exons
HOXA10	NM_018951	ex2
HOXA11	NM_005523	ex2
HOXA9	NM_152739	ex2
IKZF1	NM_006060	ex1-3 + ex7-8
IL2RB	NM_000878.3	ex2
JAK2	NM_004972	ex6-13 + ex15-20
JAZF1	NM_175061.4	ex2-4
KDM2B	NM_032590.5	ex10-23
KMT2A	NM_005933	ex2-35
KRAS	NM_004985.5	ex2-4
LYL1	NM_005583	ex4
LYN	NM_002350	ex8-9
MAML2	NM_032427.4	ex1-3
MAML3	NM_018717.5	ex1-3
MAP3K3	NM_002401.5	alle exons
MAP3K8	NM_005204.4	alle exons
MDM2	NM_002392.6	alle exons
MEAF6	NM_001270875.3	ex4-5
MECOM	NM_001105077	ex1-4

Gen	Transcript ID (hg38 e110)	Regio
MEF2D	NM_005920	ex5-9
MET	NM_000245.4	ex2 + ex4-6 + ex13-21 + intron13-14
MITF	NM_001354604.2	alle exons
MLLT10	NM_004641	ex2-18
MLLT4	NM_001040000	ex2
MN1	NM_002430.3	alle exons
MRTF	NM_001308142.2	ex11-13
MRTFA	NM_020831	ex5
MSANTD3	NM_080655.3	alle exons
MYB	NM_001130173.2	ex7-16
MYBL1	NM_001080416.4	ex8-16
MYC	NM_002467.6	alle exons
MYH11	NM_002474	ex28-33
MYOD1	NM_002478.5	ex1
NCOA1	NM_147223.3	ex11-15 + intron14
NCOA2	NM_006540.4	ex11-16 + ex22 + intron14
NOTCH1	NM_017617.5	ex26-30
NOTCH2	NM_024408.4	ex26-30
NOTCH3	NM_000435.3	ex26-30
NPM1	NM_002520	ex6
NR1D1	NM_021724.5	alle exons
NR4A2	NM_006186.4	alle exons
NR4A3	NM_006981.4	alle exons
NRG1	NM_001159996.3	ex1 + ex3
	NM_013956.5	ex10
	NM_013959.4	ex1 + ex3
	NM_013962.3	ex1
	NM_013964.5	alle exons
NTRK1	NM_002529.4	alle exons
NTRK2	NM_006180.6	alle exons
NTRK3	NM_001007156.3	ex15-16
	NM_001012338.3	alle exons
	NM_002530	ex14-15
NUP214	NM_005085	ex17-19 + ex29-35
NUP98	NM_016320	ex8-17
NUTM1	NM_175741.3	alle exons
OGA	NM_012215.5	alle exons
P2RY8	NM_178129	ex1
PATZ1	NM_014323.3	ex1-2
PAX3	NM_181457.4	ex8
	NM_181458.4	alle exons
	NM_181459.4	ex9-10
PAX5	NM_016734	alle exons
PAX7	NM_001135254.2	ex5-8
PBX1	NM_002585	ex3 + ex5
PCM1	NM_006197	ex23-37

Gen	Transcript ID (hg38 e110)	Regio
PDGFB	NM_002608.4	ex2-3
PDGFRA	NM_006206	ex9-14
PDGFRB	NM_002609	ex8-14
PHF1	NM_024165.3	ex2_ + ex10-12
PICALM	NM_007166	ex16-19
PLAG1	NM_002655.3	ex4
PML	NM_002675	ex2-7
PPARG	NM_015869.5	ex1-3
PRDM10	NM_199437.2	ex10-16
PRDM16	NM_022114	ex1
PRKACA	NM_002730.4	ex2-4
PRKCA	NM_002737.3	alle exons
PRKCB	NM_002738.7	alle exons
PRKCD	NM_006254.4	alle exons
PRKD1	NM_002742.3	ex7-18
PRKD2	NM_016457.5	ex7-18
PRKD3	NM_005813.6	ex7-19
PTEN	NM_000314.8	ex5-8
PTK2B	NM_173174	ex7
RAD51B	NM_133510.4	alle exons
RAF1	NM_002880.4	ex4-12
RARA	NM_000964	ex2-5
RARB	NM_000965	ex1-2
RARG	NM_000966	ex1-5
RASGRF1	NM_001145648.3	ex7-16
RBM15	NM_022768	ex1
RELA	NM_021975.4	ex1-6
RET	NM_020975.6	ex2 + ex4 + ex6-14
ROS1	NM_002944.3	ex2 + ex4 + ex7 + ex29-37
RSPO2	NM_178565.5	ex2-4
RSPO3	NM_032784.5	ex1-3
RUNX1	NM_001754	ex2-9
RUNX1T1	NM_001198679	ex2-3
SET	NM_001122821	ex7
SRF	NM_003131.4	alle exons
SS18	NM_001007559.3	alle exons
STAT6	NM_003153.5	ex2-7 + ex15-20
STIL	NM_003035	ex1-2
SUZ12	NM_015355.4	ex1-4
TAF15	NM_139215.3	ex5-10
TAL1	NM_001290404	ex2-6
TCF3	NM_003200	ex11-18
TCF12	NM_207037.2	ex4-6
TFCP2	NM_005653.5	ex1-3
TFE3	NM_006521.6	alle exons

Gen	Transcript ID (hg38 e110)	Regio
TFEB	NM_001271944.2	alle exons
TFG	NM_006070.6	alle exons
THADA	NM_022065.5	ex24-30 + ex36-37
TLX1	NM_005521	ex1
TLX3	NM_021025	ex1
TMPRSS2	NM_001135099.1 NM_005656.4	ex1 ex2-6
TRIM11	NM_145214.3	alle exons
TSLP	NM_033035.4	ex1
TYK2	NM_003331	ex18-19 + ex25
UBTF	NM_014233	ex17
USP6	NM_001304284.2 NM_004505.4	ex1-12 + promotor region ex2-4
VGLL2	NM_182645.3	alle exons + intron3
VGLL3	NM_016206.4	ex1-4
WT1	NM_000378	alle exons
YAP1	NM_001130145.3	alle exons
YWHAE	NM_006761.5	ex4-5
ZCCHC7	NM_032226	ex1-4
ZFTA	NM_001144936.2	ex1-5
ZNF362	NM_152493	ex3-5
ZNF384	NM_133476	ex2-8

### Detectielimiet en sensitiviteit/specificiteit

De analyse is enkel geschikt voor de analyse van diagnostische stalen. De detectielimiet is sterk afhankelijk van het type transcript en het percentage maligne cellen en kan dus niet bepaald worden.

Wanneer vergeleken wordt met de resultaten die bekomen werden met andere analyses vertoont het PanCancer\_v1 panel een sensitiviteit van 100 % en een specificiteit van 100 %.

### Rapportering

In de technische validatie worden de fusietranscripten geclassificeerd volgens biologische impact. Hierin worden drie biologische categorieën gebruikt:

- **Pathogene variant:** gekend pathogene fusietranscript; bvb. *BCR::ABL1*
- **Vermoedelijk pathogene variant:** fusietranscript dat met grote zekerheid als pathogeen mag aanzien worden, maar waarvan de pathogeniciteit nog niet sluitend aangetoond werd (bvb. bij een niet-eerder gerapporteerde fusie met ABL1)
- **Fusietranscript met ongekende betekenis (*Variant of unknown significance; VUS*):** fusietranscript waarvan de impact op het eiwit niet betrouwbaar kan ingeschat worden

Alle fusietranscripten worden in het rapport vermeld. De fusietranscripten met ongekende betekenis (VUS) worden afzonderlijk van de andere varianten gerapporteerd.

Voor de klinische interpretatie worden enkel de pathogene en vermoedelijk pathogene varianten beoordeeld, zonder onderscheid te maken tussen beide. Varianten met ongekende betekenis (VUS) worden niet opgenomen in de klinische interpretatie. De klinische interpretatie volgt zo goed mogelijk de meest recente

internationale richtlijnen en literatuur. Hierbij wordt zowel de diagnostische, prognostische als therapeutische impact ingeschat.

Daarnaast wordt de info over de gebruikte methode apart gerapporteerd.

### **Terugbetaling**

Het opsporen van fusietranscripten in AML, ALL of HES kan aangerekend worden onder de NGS conventie.

### **Accreditatie**

Deze analyse is BELAC geaccrediteerd.