

RNA sequencing analyse bij acute myeloïde leukemie

Met Next Generation Sequencing (NGS) worden met het FusionPlex Heme_v2 panel (ArcherDx; IDT) fusietranscripten opgespoord die relevant zijn bij patiënten met acute myeloïde leukemie (AML). Met deze methode kunnen in principe zowel fusietranscripten, varianten en expressieprofielen bepaald worden. Op dit moment is enkel de detectie van fusietranscripten gevalideerd en zal enkel dit gerapporteerd worden. In een verdere fase zal de detectie van varianten en het expressiepatroon verder gevalideerd worden.

Uitvoering en data-analyse

De analyse maakt gebruik van *anchored multiplex PCR* (AMP), waarbij zowel gekende als nieuwe fusiepartners kunnen opgespoord worden van de genen van interesse. Na aanrijking gebeurt de sequencerings op een MiSeq (Illumina) toestel. Vervolgens worden de bekomen sequenties gealigneerd met het menselijk genoom (versie GRCh37/hg19) en worden de fusietranscripten geïdentificeerd met behulp van de Archer Analysis software. De library preparation, sequencerings, 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 FusionPlex Heme_v2 panel en de gebruikte referentiesequenties.

Gen	Referentie sequentie	Exonen	Fusies	Hotspots	Expressie
<i>ABL1</i>	NM_005157	1-5	5'	Y253-E255, V299, T315-F317, M351-F359	ja
<i>ABL2</i>	NM_005158	2-8	5'	N/A	N/A
<i>ALK</i>	NM_004304	2, 4, 6, 10, 16-23	5'	N/A	N/A
<i>BCL11B</i>	NM_138576	2-4	5' en 3'	N/A	N/A
<i>BCL2</i>	NM_000633	2-3	5' en 3'	F104	ja
<i>BCL6</i>	NM_001706	2-3	5'	N/A	ja
<i>BCR</i>	NM_004327	1-3, 8, 12-16	3'	N/A	N/A
<i>BIRC3</i>	NM_001165	4-7	3'	Q547	N/A
<i>CBFB</i>	NM_022845	4-5	3'	N/A	N/A
<i>CCND1</i>	NM_053056	5	3'	E36, V42-C47	ja
<i>CCND2</i>	NM_001759	B	N/A	N/A	ja
<i>CCND3</i>	NM_001760	2	5'	N/A	ja
<i>CD274</i>	NM_014143	N/A	N/A	N/A	ja
<i>CDK6</i>	NM_001259	1-4	3'	N/A	
<i>CDKN2A</i>	NM_000077	N/A	N/A	N/A	ja
<i>CEBPA</i>	NM_004364	N/A	N/A	P23-H24, Q83, K304-L317	ja
<i>CEBPD</i>	NM_005195	N/A	N/A	N/A	ja
<i>CEBPE</i>	NM_001805	N/A	N/A	N/A	ja
<i>CEBPG</i>	NM_001806	N/A	N/A	N/A	ja
<i>CHD1</i>	NM_001270	1-2	5'	N/A	N/A
<i>CHIC2</i>	NM_012110	1-3	3'	N/A	N/A
<i>CIITA</i>	NM_000246	1-2	3'	N/A	N/A

Gen	Referentie sequentie	Exonen	Fusies	Hotspots	Expressie
<i>CREBBP</i>	NM_004380	2-6	5'	P1053, C1240, R1446, S1680- L1681	N/A
<i>CRLF2</i>	NM_022148	1	5'	F232	ja
<i>CSF1R</i>	NM_005211	9-14	5'	N/A	N/A
<i>CTLA4</i>	NM_005214	N/A	N/A	N/A	ja
<i>DEK</i>	NM_003472	2-3	3'	N/A	N/A
<i>DUSP22</i>	NM_020185	1-2	3'	N/A	N/A
<i>EBF1</i>	NM_024007	10-15	3'	N/A	N/A
<i>EPOR</i>	NM_000121	7-8	3'	N/A	N/A
<i>ERG</i>	NM_004449	7-11	5'	N/A	N/A
<i>ETV6</i>	NM_001987	1-6	5' en 3'	Y104-R105	N/A
<i>FGFR1</i>	NM_023110	2-11, 17	5' en 3'	N/A	N/A
<i>FOXP1</i>	NM_032682	N/A	N/A	N/A	ja
<i>GLIS2</i>	NM_032575	2-3	5'	N/A	N/A
<i>ID4</i>	NM_001546	N/A	N/A	N/A	ja
<i>IKZF1</i>	NM_006060	1-3, 7-8	5' en 3'	N/A	N/A
<i>IKZF2</i>	NM_016260	3-4	3'	N/A	N/A
<i>IKZF3</i>	NM_012481	2-7	3'	L162	N/A
<i>IRF4</i>	NM_002460	N/A	N/A	N/A	ja
<i>IRF8</i>	NM_002163	N/A	N/A	N/A	ja
<i>JAK2</i>	NM_004972	6-13, 15-20	5' en 3'	F537-F547, V617- C618, L681-R683, L855, V863, A880, V911, M929-R938, I960, R980-E985, D994	N/A
<i>KAT6A</i>	NM_006766	13-16	3'	N/A	N/A
<i>KLF2</i>	NM_016270	2-3	5'	N/A	N/A
<i>KMT2A</i>	NM_005933	2-35	3'	N/A	N/A
<i>MALT1</i>	NM_006785	9	3'	N/A	N/A
<i>MECOM</i>	NM_004991	1-4	5'	N/A	ja
<i>MKL1</i>	NM_020831	4-6	5'	N/A	N/A
<i>MLF1</i>	NM_022443	2-4	5'	N/A	N/A
<i>MLLT10</i>	NM_004641	2-18	5' en 3'	N/A	N/A
<i>MLLT4</i>	NM_001040000	2	5'	N/A	N/A
<i>MUC1</i>	NM_002456	N/A	N/A	N/A	ja
<i>MYC</i>	NM_002467	1-2	5'	N/A	ja
<i>MYH11</i>	NM_002474	7-11, 14-16	5'	N/A	ja
<i>NF1</i>	NM_000267	14, 36	5' en 3'	N/A	N/A
<i>NFKB2</i>	NM_002502	14-21	3'	N/A	N/A

Gen	Referentie sequentie	Exonen	Fusies	Hotspots	Expressie
<i>NOTCH1</i>	NM_017617	24-29	5' en 3'	L1574, V1578, L1585, F1592- L1593, R1598- L1600, L1678- L1680, P2514- E2515, P2525	N/A
<i>NTRK3</i>	NM_002530	13-15	5' en 3'	N/A	N/A
<i>NUP214</i>	NM_005085	17-19	5'	N/A	N/A
<i>NUP98</i>	NM_016320	8-17	5' en 3'	N/A	N/A
<i>P2RY8</i>	NM_178129	1	3'	N/A	N/A
<i>PAG1</i>	NM_018440	2	5'	N/A	N/A
<i>PAX5</i>	NM_016734	1, 4-8	5' en 3'	P80	N/A
<i>PDCD1</i>	NM_005018	N/A	N/A	N/A	ja
<i>PDCD1LG2</i>	NM_025239	1-3, 5-6	5' en 3'	N/A	ja
<i>PDGFRA</i>	NM_006206	9-14	5'	T674	N/A
<i>PDGFRB</i>	NM_002609	8-14	5'	N/A	N/A
<i>PICALM</i>	NM_007166	16-19	3'	N/A	N/A
<i>PML</i>	NM_002675	2-7	5' en 3'	C212-S220	N/A
<i>PRDM16</i>	NM_022114	1-4	5'	N/A	N/A
<i>PTK2B</i>	NM_173176	2-8	5'	N/A	N/A
<i>RARA</i>	NM_000964	2-5	5'	E197, R272, T283- M284, L290-M297, R394, Q411	ja
<i>RBM15</i>	NM_022768	1	3'	N/A	N/A
<i>ROS1</i>	NM_002944	31-36	5'	N/A	ja
<i>RUNX1</i>	NM_001754	2-9	5' en 3'	N/A	ja
<i>RUNX1T1</i>	NM_001198679	2-3	5'	N/A	ja
<i>SEMA6A</i>	NM_020796	1-2	3'	N/A	N/A
<i>SETD2</i>	NM_014159	1-12	3'	N/A	N/A
<i>STIL</i>	NM_003035	1-2	3'	N/A	N/A
<i>TAL1</i>	NM_001290404	2-4	5'	N/A	ja
<i>TCF3</i>	NM_003200	11-18	3'	N/A	N/A
<i>TFG</i>	NM_006070	2-4	3'	N/A	N/A
<i>TP63</i>	NM_003722	3-5	5'	N/A	N/A
<i>TYK2</i>	NM_003331	16, 18	5'	W327	N/A
<i>ZCCHC7</i>	NM_032226	2-4	5' en 3'	N/A	N/A

Detectielimiet en sensitiviteit/specificiteit

De analyse is enkel geschikt voor de analyse van diagnostische stalen, niet voor follow-up. Er werd een detectielimiet van 1% aangetoond voor één transcript (BCR::ABL1). De detectielimiet is echter afhankelijk van het type transcript, aangezien een sterke variabiliteit bestaat in het expressieniveau.

Wanneer vergeleken wordt met de resultaten die bekomen werden met andere analyses op diagnostische stalen vertoont het FusionPlex Heme_v2 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 pathogeen 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 fusies en varianten beoordeeld, zonder onderscheid te maken tussen beide. Varianten/fusies 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. Voor een finale interpretatie dienen deze resultaten steeds gecorreleerd te worden met de andere analyses (flow cytometrie, karyotypering, CNVseq, IHC, ...).

Daarnaast wordt de info over de gebruikte methode apart gerapporteerd.

Terugbetaling

Het opsporen van fusietranscripten in AML kan sinds 1/7/23 aangerekend worden onder de NGS conventie (zie RIZIV website voor meer info).

Accreditatie

Deze analyse is BELAC geaccrediteerd.