

RNA sequencing analyse bij acute lymfoblastaire leukemie

Wijzigingen t.o.v. voorgaande versie worden geelgemarkeerd of doorstreept

Met Next Generation Sequencing (NGS) worden met het FusionPlex ALL panel (Archer; **IDT**) fusietranscripten opgespoord die relevant zijn bij patiënten met acute lymfoblastaire leukemie (ALL). Met deze methode kunnen in principe zowel fusietranscripten, varianten en expressieprofielen bepaald worden. Op dit moment is enkel de detectie van fusietranscripten **en varianten** gevalideerd en zal enkel dit **zullen deze** 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 sequencerij 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, sequencerij, primaire en secundaire data-analyse wordt uitgevoerd door het platform Moleculaire Diagnostiek UZ Gent (MDG) (<https://www.cmgg.be/nl/zorgverlener/labgide/platform-moleculaire-diagnostiek-uz-gent-mdg>).

Overzicht van de genen en exonen die geanalyseerd worden met het FusionPlex ALL panel en de gebruikte referentiesequenties. Voorlopig worden enkel de gedetecteerde fusies en de gerapporteerd.

Gen	Referentie sequentie	Exonen	Fusies	Hotspots varianten	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'		
<i>AICDA</i>	NM_020661				Ja
<i>BCL11B</i>	NM_138576	2-4	5' en 3'		
<i>BCL2</i>	NM_000633	2-3	5' en 3'	F104	ja
<i>BCL6</i>	NM_001706	2-3	5'		ja
<i>BCR</i>	NM_004327	1-3, 8, 12-16	3'		
<i>BLNK</i>	NM_013314				ja
<i>BRAF</i>	NM_004333			V600	
<i>CD274</i>	NM_014143				ja
<i>CHD1</i>	NM_001270	1-2	5'		
<i>CREBBP</i>	NM_004380	2-6	5'	P1053, C1240, R1446, S1680-L1681	
<i>CRLF2</i>	NM_022148	1	5'	F232	ja
<i>CSF1R</i>	NM_005211	9-14	5'		
<i>CTLA4</i>	NM_005214				ja
<i>DNM2</i>	NM_004945			V649, L789	
<i>DNTT</i>	NM_004088				ja
<i>EBF1</i>	NM_024007	10-15	3'		
<i>EPOR</i>	NM_000121	7-8	3'		
<i>ETV6</i>	NM_001987	1-6	5' en 3'	Y104-R105	
<i>EZH2</i>	NM_004456			Y602, Y646, R690	
<i>FBXW7</i>	NM_033632			R224-T226, R338-I347, T385, R465, R479, R505	
<i>FGFR1</i>	NM_023110	2-11, 17	5' en 3'		

Gen	Referentie sequentie	Exonen	Fusies	Hotspots varianten	Expressie
<i>FLT3</i>	NM_004119			F590-N609, D835-S838	ja
<i>HOXA10</i>	NM_018951				ja
<i>HOXA9</i>	NM_152739				ja
<i>IDH1</i>	NM_005896			R132	
<i>IDH2</i>	NM_002168			R140, R172	
<i>IKZF1</i>	NM_006060	1-3, 7-8	5' en 3'		
<i>IKZF2</i>	NM_016260	3-4	3'		
<i>IKZF3</i>	NM_012481	2-7	3'	L162	
<i>IL7R</i>	NM_002185			S185, P240-S246	
<i>IRF4</i>	NM_002460				ja
<i>IRF8</i>	NM_002163				ja
<i>JAK1</i>	NM_002227			V658, S703, R724	
<i>JAK2</i>	NM_004972	6-13, 15-17	5' en 3'	F537-F547, V617-C618, L681-R683, L855, V863, A880, V911, M929-R938, I960, R980-E985, D994	
<i>JAK3</i>	NM_000215			M511, A572-A573, R657, S789	
<i>KDM6A</i>	NM_021140			V1113	
<i>KLF2</i>	NM_016270	2-3	5'		
<i>KMT2A</i>	NM_005933	4-35	3'		
<i>KRAS</i>	NM_004985			G12-G13, Q61, A146	
<i>LMO1</i>	NM_002315				ja
<i>LYL1</i>	NM_005583				ja
<i>MLLT4</i>	NM_001040000	2	5'		
<i>MPL</i>	NM_005373			S505, W515	
<i>MYC</i>	NM_002467	1-2	5'		
<i>NF1</i>	NM_000267	14, 36	5' en 3'		
<i>NOTCH1</i>	NM_017617	24-29, 34	5' en 3'	L1574, V1578, L1585, F1592-L1593, R1598-L1600, L1678-I1680, P2514-E2515, P2525	
<i>NRAS</i>	NM_002524			G12-G13, G60-Q62	
<i>NT5C2</i>	NM_012229			R238, R367	
<i>NTRK3</i>	NM_002530	13-15	5'		
<i>NUP214</i>	NM_005085	17-19	5'		
<i>NUP98</i>	NM_016320	8-17	5' en 3'		
<i>P2RY8</i>	NM_178129	1	3'		
<i>PAG1</i>	NM_018440	2	5'		
<i>PAX5</i>	NM_016734	1, 4-8	5' en 3'	P80	
<i>PBX1</i>	NM_002585	1-9	5'		
<i>PDCD1</i>	NM_005018				ja
<i>PDCD1LG2</i>	NM_025239	1-6	5' en 3'		
<i>PDGFRA</i>	NM_006206	9-14	5'	T674	
<i>PDGFRB</i>	NM_002609	8-14	5'		
<i>PICALM</i>	NM_007166	16-19	3'		
<i>PTK2B</i>	NM_173176	2-8	5'		

Gen	Referentie sequentie	Exonen	Fusies	Hotspots varianten	Expressie
<i>PTPN11</i>	NM_002834			G60-D61, E69-T73, E76, S502-G503	
<i>RAG1</i>	NM_000448				ja
<i>RAG2</i>	NM_000536				ja
<i>RUNX1</i>	NM_001754	2-9	5' en 3'		ja
<i>SEMA6A</i>	NM_020796	1-2	3'		
<i>SETD2</i>	NM_014159	1-12	3'		
<i>SH2B3</i>	NM_005475			E208, D231-D234	
<i>SOX11</i>	NM_003108				ja
<i>STAT3</i>	NM_003150			Y640-N547, D661	
<i>STAT5B</i>	NM_012448			N642	
<i>STIL</i>	NM_003035	1-2	3'		
<i>TAL1</i>	NM_001290404	2-4	5'		Ja
<i>TCF3</i>	NM_003200	11-18	3'		
<i>TLX1</i>	NM_005521				ja
<i>TLX3</i>	NM_021025				ja
<i>TYK2</i>	NM_003331	16, 18	5'	W327	
<i>WT1</i>	NM_000378			R301-V303, R352-V354, P359-A365, R445-H448	ja
<i>ZCCHC7</i>	NM_032226	1-4	5' en 3'		

Detectielimiet en sensitiviteit/specificiteit

De analyse is enkel geschikt voor de analyse van diagnostische stalen. Er werd een detectielimiet van 1% aangetoond. De detectielimiet is echter afhankelijk van het type transcript.

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

Voor de varianten wordt een cut-off van 5% VAF gebruikt. Varianten kunnen echter enkel gedetecteerd worden indien het transcript tot expressie komt, waardoor sommige varianten die leiden tot *nonsense-mediated decay* (NMD) kunnen gemist worden met deze techniek.

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.

Deze methode wordt ook gebruikt voor de identificatie van *single nucleotide variants* (SNVs) en kleine inserties en deleties. Indien ook een analyse met het DNA NGS panel uitgevoerd wordt, worden enkel de varianten gerapporteerd die niet met het DNA panel gedetecteerd worden. Indien geen DNA NGS uitgevoerd wordt, worden alle klinisch relevante varianten gerapporteerd (dus niet de VUS varianten).

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. 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 ALL kan aangerekend worden onder art. 33bis en art. 33ter.

Accreditatie

Deze analyse is ~~nog niet~~ BELAC geaccrediteerd sinds 1 maart 2021.