

## INFORMATIE UITSLAGEN HEMATO-ONCOLOGIE LAB - UNIT MOLECULAIRE DIAGNOSTIEK EMC – FUSIEGENEN (RNA) EN MUTATIES/SEQUENCING (DNA)

| Afwijking                       | Percentage                   | VAF#          | Bepaling                    |
|---------------------------------|------------------------------|---------------|-----------------------------|
|                                 | Maligne Cellen*              |               |                             |
| <i>RUNX1::RUNX1T1</i>           | 5%/ 0.01%                    |               | RT-PCR > LMA/ RQ-PCR1       |
| <i>CBFB::MYH11</i>              | 5%                           |               | RT-PCR > LMA                |
| <i>DEK::NUP214</i>              | 5%                           |               | RT-PCR > LMA                |
| <i>KMT2A::ELL</i>               | 5%                           |               | RT-PCR > LMA                |
| <i>KMT2A::MLLT3</i>             | 5%                           |               | RT-PCR > LMA                |
| <i>KMT2A::MLLT4</i>             | 5%                           |               | RT-PCR > LMA                |
| <i>NPM1::MLF1</i>               | 5%                           |               | RT-PCR > LMA                |
| <i>BCR::ABL</i> (breukpunt)     | 1%/ 5%                       |               | RT-PCR/ RT-PCR > LMA        |
| <i>BCR::ABL</i> (e13/e14-a2)    | 0.001%                       |               | RQ-PCR2                     |
| <i>BCR::ABL</i> mutatie         | >0.1% IS                     |               | RT-PCR > NGS                |
| <i>NUP214::ABL</i>              | 0.1%                         |               | RQ-PCR1                     |
| <i>FIP1L1::PDGFRA</i>           | 1%                           |               | RT-PCR                      |
| <i>PML::RARA</i>                | 1%/ 5%                       |               | RT-PCR/ RT-PCR > LMA        |
| <i>MLL::AF4</i>                 | 1%                           |               | RT-PCR                      |
| <i>FLT3</i> ITD                 | 10%                          | 0.05 (ratio)^ | PCR > LMA                   |
| <i>FLT3</i> TKD                 | 10%                          | 0.05 (ratio)^ | PCR > LMA                   |
| <i>ASXL1</i> mutatie            | 10%                          | 5%            | NGS1                        |
| <i>BCOR</i> mutatie             | 10%                          | 5%            | NGS1                        |
| <i>BCORL1</i> mutatie           | 10%                          | 5%            | NGS1                        |
| <i>BRAF</i> mutatie             | 10%                          | 5%            | NGS1                        |
| <i>CALR</i> mutatie             | 10%                          | 5%            | NGS1 of NGS4                |
| <i>CBL</i> mutatie              | 10%                          | 5%            | NGS1                        |
| <i>CEBPA</i> mutatie            | 10%                          | 5%            | NGS2                        |
| <i>CSF3R</i> mutatie            | 10%                          | 5%            | NGS1 en NGS2                |
| <i>DDX41</i> mutatie            | 10%                          | 5%            | NGS1                        |
| <i>DNMT3A</i> mutatie           | 10%                          | 5%            | NGS1                        |
| <i>ETNK1</i> mutatie            | 10%                          | 5%            | NGS1                        |
| <i>ETV6</i> mutatie             | 10%                          | 5%            | NGS1                        |
| <i>EZH2</i> mutatie             | 10%                          | 5%            | NGS1                        |
| <i>GATA2</i> mutatie            | 10%                          | 5%            | NGS1                        |
| <i>IDH1</i> mutatie [screening] | 5%                           | 1%            | allel-specifieke PCR        |
| <i>IDH1</i> mutatie             | 10%                          | 5%            | NGS1                        |
| <i>IDH2</i> mutatie [screening] | 5%                           | 1%            | allel-specifieke PCR        |
| <i>IDH2</i> mutatie             | 10%                          | 5%            | NGS1                        |
| <i>JAK2</i> V617F mutatie       | 0.1%                         | 2%            | RQ-PCR1/NGS4 of NGS1        |
| <i>JAK2</i> mutatie             | 10%                          | 5%            | NGS1 of NGS4                |
| <i>KIT</i> mutatie              | 10%                          | 5%            | NGS1                        |
| <i>MPL</i> mutatie              | 10%                          | 5%            | NGS1 of NGS4                |
| <i>MYD88</i> mutatie            | 10%                          | 5%            | NGS1                        |
| <i>NF1</i> mutatie              | 10%                          | 5%            | NGS1                        |
| <i>NPM1</i> mutatie [screening] | 5%                           | 1%            | locked nucleic acid LNA-PCR |
| <i>NPM1</i> mutatie             | 0.01% (RQ-PCR <sup>2</sup> ) | 1% (NGS)      | RQ-PCR1/NGS1                |
| <i>NRAS</i> mutatie             | 10%                          | 5%            | NGS1                        |
| <i>KRAS</i> mutatie             | 10%                          | 5%            | NGS1                        |
| <i>PHF6</i> mutatie             | 10%                          | 5%            | NGS1                        |
| <i>PPM1D</i> mutatie            | 10%                          | 5%            | NGS1                        |
| <i>PTPN11</i> mutatie           | 10%                          | 5%            | NGS1                        |
| <i>RUNX1</i> mutatie            | 10%                          | 5%            | NGS1                        |
| <i>SETBP1</i> mutatie           | 10%                          | 5%            | NGS1                        |
| <i>SF3B1</i> mutatie            | 10%                          | 5%            | NGS1                        |
| <i>SRSF2</i> mutatie            | 10%                          | 5%            | NGS1                        |
| <i>STAG2</i> mutatie            | 10%                          | 5%            | NGS1                        |
| <i>TET2</i> mutatie             | 10%                          | 5%            | NGS1                        |
| <i>TP53</i> mutatie             | 10%                          | 5%            | NGS1/NGS3                   |
| <i>U2AF1</i> mutatie            | 10%                          | 5%            | NGS1                        |
| <i>UBA1</i> mutatie             | 10%                          | 5%            | NGS5                        |
| <i>ZRSR2</i> mutatie            | 10%                          | 5%            | NGS1                        |
| Factor V Leiden                 | NA                           | NA            | RQ-PCR2                     |
| Protrombine                     | NA                           | NA            | RQ-PCR2                     |

\*De uitslag niet aantoonbaar bij AML is alleen betrouwbaar boven het aangegeven percentage maligne cellen of VAF; #VAF: variant allel frequentie (bijv. VAF 50% betekend dat alle cellen een heterozygote mutatie bevatten) – VAF lager dan het aangeven percentage worden ook gerapporteerd; \*De *FLT3* ITD en *FLT3* TKD mutatie resultaten worden gerapporteerd als ratio (*FLT3* ITD/ *FLT3* wild type of *FLT3* TKD/ *FLT3* wild type) volgens ELN 2017 [dus geen VAF]

\*NPM1 mutant type A, B en D

PCR: polymerase chain reaction / RT-PCR: reverse transcriptase – PCR

RT-PCR-LMA: polymerase ketting reactie > next generation sequencing *BCR::ABL1* (Biotype Mentype AMLplex)

PCR-LMA: polymerase ketting reactie > lengte mutatie analyse

RQ-PCR1: real-time quantitative – PCR (in-house test)

RQ-PCR2: real-time quantitative – PCR (Cepheid)

RT-PCR > NGS: reverse-transcriptase > next generation sequencing *BCR::ABL1*

NGS1: Next generation sequencing Pillar oncoReveal Myeloid Panel

NGS2: Next generation sequencing custom panel *CEBPA* en *CSF3R* (exon18-19)

NGS3: Next generation sequencing custom panel *TP53*

NGS4: Next generation sequencing custom panel *JAK2* V617F, *JAK2* exon 12, *CALR*, *MPL*

NGS5: Next generation sequencing custom panel *UBA1*

Hieronder staan de verschillende markers die bepaald worden binnen het Hemato-oncologie laboratorium unit Moleculaire Diagnostiek gerangschikt per ziektebeeld.

Disclaimer next generation sequencing:

Neutrale polymorfismen, silent mutaties, waarschijnlijk niet-pathogene varianten en varianten, die we op dit moment niet nader kunnen duiden, worden niet gerapporteerd. De methode is beperkt in staat om mutaties met een allelfrequentie kleiner dan 5% en (grotere) deleties, inserties en indels aan te tonen en/of uit te sluiten. Sommige delen van genen zijn lastiger te sequencen waardoor mutaties gemist kunnen worden.

## Markers Hemato-oncologie laboratorium unit Moleculaire Diagnostiek gerangschikt per ziektebeeld

### AML

**RUNX1::RUNX1T1**  
**CBFB::MYH11**  
**DEK::NUP214**  
**KMT2A::ELL**  
**KMT2A::MLLT3**  
**KMT2A::MLLT4**  
**NPM1::MLF1**  
**BCR::ABL1**  
**PML::RARA**  
**ASXL1 mutatie**  
**BCOR mutatie**  
**CALR mutatie**  
**CEBPA mutatie (inclusief aan-/afwezigheid in frame bZIP mutatie)**  
**DDX41 mutatie**  
**EZH2 mutatie**  
**FLT3-ITD**  
**FLT3-TKD**  
**GATA2 mutatie**  
**IDH1 mutatie**  
**IDH2 mutatie**  
**JAK2 mutatie**  
**KIT mutatie**  
**KRAS mutatie**  
**MPL mutatie**  
**NPM1 mutatie**  
**NRAS mutatie**  
**RUNX1 mutatie**  
**SF3B1 mutatie**  
**SRSF2 mutatie**  
**STAG2 mutatie**  
**TET2 mutatie**  
**TP53 mutatie**  
**U2AF1 mutatie**  
**ZRSR2 mutatie**

NPM1 mutatie (follow up)

### Type mutaties/ regio

NM\_015338.6: exon12 (exon13 gedeeltelijk)  
 NM\_001123385.2: exons3-14  
 NM\_004343.4: exon9  
 NM\_004364.5: exon1  
 NM\_016222.4: exons1,3,5,6,8,10,11,14,15  
 NM\_004456.5: exons2-19 (exon20 gedeeltelijk)  
 NM\_004119.3: exon14 en exon15  
 NM\_004119.3: exon20 (D835)  
 NM\_032638.5: exons3-5 (exon2, 6 gedeeltelijk)  
 NM\_005896.4: exon4 (R132)  
 NM\_002168.4: exons4,6 (R140 en R172)  
 NM\_004972.4: exons12-15  
 NM\_000222.3: exon2,8,9,10,11,13,14,15,17,18  
 NM\_004985.5: exon2-4  
 NM\_005373.3: exon10 (W515)  
 NM\_002520.7: exon11 (gedeeltelijk)  
 NM\_002524.5: exons3, 4 (exon2 gedeeltelijk)  
 NM\_001754.5: exons2-8 (exon9 gedeeltelijk)  
 NM\_012433.4: exon13-16 (K700)  
 NM\_001195427.2: exon1 (gedeeltelijk)  
 NM\_001042750.2: exons4-34 (exons3, 35 gedeeltelijk)  
 NM\_001127208.3: exon4-10 (exon3, 11 gedeeltelijk)  
 NM\_000546.6: exon2-10 (exon11 gedeeltelijk)  
 NM\_006758.3: exon2-6 (exon1, 8 gedeeltelijk)  
 NM\_005089.4: exon1-11

Mutatie type A, B en D

### MDS (IPSS-M)

**ASXL1 mutatie**  
**BCOR mutatie**  
**BCORL1 mutatie**  
**CALR mutatie**  
**CBL mutatie**  
**CEBPA mutatie (inclusief aan-/afwezigheid in frame bZIP mutatie)**  
**CSF3R mutatie**  
**DDX41 mutatie**  
**DNMT3A mutatie**  
**ETNK1 mutatie**  
**ETV6 mutatie**  
**EZH2 mutatie**  
**FLT3-ITD**  
**FLT3-TKD**  
**GATA2 mutatie**  
**IDH1 mutatie**  
**IDH2 mutatie**  
**JAK2 mutatie**  
**KIT mutatie**  
**KRAS mutatie**  
**NF1 mutatie**  
**NPM1 mutatie**  
**NRAS mutatie**  
**MPL mutatie**  
**PHF6 mutatie**  
**RUNX1 mutatie**  
**PPM1D mutatie**  
**PTPN11 mutatie**  
**SETBP1 mutatie**  
**SF3B1 mutatie**  
**SRSF2 mutatie**  
**STAG2 mutatie**  
**TET2 mutatie**  
**TP53 mutatie**  
**U2AF1 mutatie**  
**WT1 mutatie**  
**ZRSR2 mutatie**

NM\_015338.6: exon12 (exon13 gedeeltelijk)  
 NM\_001123385.2: exons3-14  
 NM\_001379451.1: exons3-13 (exons2,14 gedeeltelijk)  
 NM\_004343.4: exon9  
 NM\_005188.4: exons3,5,8,9,10,12,13 (exons1,2,16 gedeeltelijk)  
 NM\_004364.5: exon1  
 NM\_000760.4: exons14-18  
 NM\_016222.4: exons1,3,5,6,8,10,11,14,15  
 NM\_022552.5: exons3-22 (exons2, 23 gedeeltelijk)  
 NM\_018638.5: exon3  
 NM\_022552.5: exons2-7 (exons1, 8 gedeeltelijk)  
 NM\_004456.5: exons2-19 (exon20 gedeeltelijk)  
 NM\_004119.3: exon14 en exon15  
 NM\_004119.3: exon20 (D835)  
 NM\_032638.5: exons3-5 (exon2, 6 gedeeltelijk)  
 NM\_005896.4: exon4 (R132)  
 NM\_002168.4: exons4,6 (R140 en R172)  
 NM\_004972.4: exons12-15  
 NM\_000222.3: exon2,8,9,10,11,13,14,15,17,18  
 NM\_004985.5: exon2-4  
 NM\_001042492.3: exons2,3,6,12,30,41,45,49,52 (exons1,4,37,38,39,58 gedeeltelijk)  
 NM\_002520.7: exon11 (gedeeltelijk)  
 NM\_002524.5: exons3, 4 (exon2 gedeeltelijk)  
 NM\_005373.3: exon10 (W515)  
 NM\_001015877.2: exons3-10 (exon2 gedeeltelijk)  
 NM\_001754.5: exons2-8 (exon9 gedeeltelijk)  
 NM\_003620.4: exon6 (gedeeltelijk)  
 NM\_002834.5: exons3, 13  
 NM\_015559.3: exon4  
 NM\_012433.4: exon13-16 (K700)  
 NM\_001195427.2: exon1 (gedeeltelijk)  
 NM\_001042750.2: exons4-34 (exons3, 35 gedeeltelijk)  
 NM\_001127208.3: exon4-10 (exon3, 11 gedeeltelijk)  
 NM\_000546.6: exon2-10 (exon11 gedeeltelijk)  
 NM\_006758.3: exon2-6 (exon1, 8 gedeeltelijk)  
 NM\_024426.6: 2-9 (exons1, 10 gedeeltelijk)  
 NM\_005089.4: exon1-11

Disclaimer next generation sequencing:

Neutrale polymorfismen, silent mutaties, waarschijnlijk niet-pathogene varianten en varianten, die we op dit moment niet nader kunnen duiden, worden niet gerapporteerd. De methode is beperkt in staat om mutaties met een allelfrequentie kleiner dan 5% en (grotere) deleties, inserties en indels aan te tonen en/of uit te sluiten. Sommige delen van genen zijn lastiger te sequencen waardoor mutaties gemist kunnen worden.

#### MDS-MPN/ CMML/ CNL en atypische CML

|                                                                  |                                                                                  |
|------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------|
| ASXL1 mutatie                                                    | NM_015338.6: exon12 (exon13 gedeeltelijk)                                        |
| BCOR mutatie                                                     | NM_001123385.2: exons3-14                                                        |
| BCORL1 mutatie                                                   | NM_001379451.1: exons3-13 (exons2,14 gedeeltelijk)                               |
| CALR mutatie                                                     | NM_004343.4: exon9                                                               |
| CBL mutatie                                                      | NM_005188.4: exons3,5,8,9,10,12,13 (exons1,2,16 gedeeltelijk)                    |
| CEBPA mutatie (inclusief aan-/afwezigheid in frame bZIP mutatie) | NM_004364.5: exon1                                                               |
| CSF3R mutatie                                                    | NM_000760.4: exons14-18                                                          |
| DDX41 mutatie                                                    | NM_016222.4: exons1,3,5,6,8,10,11,14,15                                          |
| DNMT3A mutatie                                                   | NM_022552.5: exons3-22 (exons2, 23 gedeeltelijk)                                 |
| ETNK1 mutatie                                                    | NM_018638.5: exon3                                                               |
| ETV6 mutatie                                                     | NM_022552.5: exons2-7 (exons1, 8 gedeeltelijk)                                   |
| EZH2 mutatie                                                     | NM_004456.5: exons2-19 (exon20 gedeeltelijk)                                     |
| GATA2 mutatie                                                    | NM_032638.5: exons3-5 (exon2, 6 gedeeltelijk)                                    |
| IDH1 mutatie                                                     | NM_005896.4: exon4 (incl. R132)                                                  |
| IDH2 mutatie                                                     | NM_002168.4: exons4,6 (incl. R140 en R172)                                       |
| JAK2 mutatie                                                     | NM_004972.4: exons12-15                                                          |
| KIT mutatie                                                      | NM_000222.3: exon2,8,9,10,11,13,14,15,17,18                                      |
| KRAS mutatie                                                     | NM_004985.5: exon2-4                                                             |
| NF1 mutatie                                                      | NM_001042492.3: exons2,3,6,12,30,41,45,49,52 (exons1,4,37,38,39,58 gedeeltelijk) |
| NPM1 mutatie                                                     | NM_002520.7: exon11 (gedeeltelijk)                                               |
| NRAS mutatie                                                     | NM_002524.5: exons3, 4 (exon2 gedeeltelijk)                                      |
| MPL mutatie                                                      | NM_005373.3: exon10 (incl. W515)                                                 |
| PHF6 mutatie                                                     | NM_001015877.2: exons3-10 (exon2 gedeeltelijk)                                   |
| RUNX1 mutatie                                                    | NM_001754.5: exons2-8 (exon9 gedeeltelijk)                                       |
| PPM1D mutatie                                                    | NM_003620.4: exon6 (gedeeltelijk)                                                |
| PTPN11 mutatie                                                   | NM_002834.5: exons3, 13                                                          |
| SETBP1 mutatie                                                   | NM_015559.3: exon4                                                               |
| SF3B1 mutatie                                                    | NM_012433.4: exon13-16 (incl. K700)                                              |
| SRSF2 mutatie                                                    | NM_001195427.2: exon1 (gedeeltelijk)                                             |
| STAG2 mutatie                                                    | NM_001042750.2: exons4-34 (exons3, 35 gedeeltelijk)                              |
| TET2 mutatie                                                     | NM_001127208.3: exon4-10 (exon3, 11 gedeeltelijk)                                |
| TP53 mutatie                                                     | NM_000546.6: exon2-10 (exon11 gedeeltelijk)                                      |
| U2AF1 mutatie                                                    | NM_006758.3: exon2-6 (exon1, 8 gedeeltelijk)                                     |
| WT1 mutatie                                                      | NM_024426.6: 2-9 (exons1, 10 gedeeltelijk)                                       |
| ZRSR2 mutatie                                                    | NM_005089.4: exon1-11                                                            |

#### MDS-RS

|               |                                     |
|---------------|-------------------------------------|
| SF3B1 mutatie | NM_012433.4: exon13-16 (incl. K700) |
|---------------|-------------------------------------|

#### MPN

|              |                                  |
|--------------|----------------------------------|
| CALR mutatie | NM_004343.4: exon9               |
| JAK2 mutatie | NM_004972.4: exons12-15          |
| MPL mutatie  | NM_005373.3: exon10 (incl. W515) |

#### PMF (MIPSS70)

|               |                                              |
|---------------|----------------------------------------------|
| ASXL1 mutatie | NM_015338.6: exon12 (exon13 gedeeltelijk)    |
| CALR mutatie  | NM_004343.4: exon9                           |
| EZH2 mutatie  | NM_004456.5: exons2-19 (exon20 gedeeltelijk) |
| IDH1 mutatie  | NM_005896.4: exon4 (incl. R132)              |
| IDH2 mutatie  | NM_002168.4: exons4,6 (incl. R140 en R172)   |
| JAK2 mutatie  | NM_004972.4: exons12-15                      |
| MPL mutatie   | NM_005373.3: exon10 (incl. W515)             |
| RUNX1 mutatie | NM_001754.5: exons2-8 (exon9 gedeeltelijk)   |
| SF3B1 mutatie | NM_012433.4: exon13-16 (incl. K700)          |
| SRSF2 mutatie | NM_001195427.2: exon1 (gedeeltelijk)         |
| TP53 mutatie  | NM_000546.6: exon2-10 (exon11 gedeeltelijk)  |
| U2AF1 mutatie | NM_006758.3: exon2-6 (exon1, 8 gedeeltelijk) |

#### CLL

|              |                       |
|--------------|-----------------------|
| TP53 mutatie | NM_000546.6: exon2-11 |
|--------------|-----------------------|

#### Hairy cell leukemie

|              |                                       |
|--------------|---------------------------------------|
| BRAF mutatie | NM_004333.6: exons11, 15 (incl. V600) |
|--------------|---------------------------------------|

#### Mastocytose

|             |                                             |
|-------------|---------------------------------------------|
| KIT mutatie | NM_000222.3: exon2,8,9,10,11,13,14,15,17,18 |
|-------------|---------------------------------------------|

#### Agressieve mastocytose

|               |                                                   |
|---------------|---------------------------------------------------|
| ASXL1 mutatie | NM_015338.6: exon12 (exon13 gedeeltelijk)         |
| EZH2 mutatie  | NM_004456.5: exons2-19 (exon20 gedeeltelijk)      |
| RUNX1 mutatie | NM_001754.5: exons2-8 (exon9 gedeeltelijk)        |
| SRSF2 mutatie | NM_001195427.2: exon1 (gedeeltelijk)              |
| TET2 mutatie  | NM_001127208.3: exon4-10 (exon3, 11 gedeeltelijk) |

#### M. Waldenström

|               |                                   |
|---------------|-----------------------------------|
| MYD88 mutatie | NM_002468.5: exon3-5 (incl. L265) |
|---------------|-----------------------------------|

#### VEXAS

|              |                            |
|--------------|----------------------------|
| UBA1 mutatie | NM_003334.4: exon3, 14, 16 |
|--------------|----------------------------|

#### APL

|                                   |                |
|-----------------------------------|----------------|
| PML::RARA (diagnose en follow up) | BCR1-2 en BCR3 |
|-----------------------------------|----------------|

Disclaimer next generation sequencing:

Neutrale polymorfismen, silent mutaties, waarschijnlijk niet-pathogene varianten en varianten, die we op dit moment niet nader kunnen duiden, worden niet gerapporteerd. De methode is beperkt in staat om mutaties met een allelfrequentie kleiner dan 5% en (grotere) deleties, inserties en indels aan te tonen en/of uit te sluiten. Sommige delen van genen zijn lastiger te sequencen waardoor mutaties gemist kunnen worden.

**CML**

BCR::ABL1

alle BCR::ABL1 breukpunten (diagnosis)

BCR::ABL1 e1a2, e13a2, e14a2, e18a2 en e19a2 (follow up)

BCR::ABL1 mutaties (aminozuur ~30-540aa (NP\_005148.2))

**ALL**

BCR::ABL1

BCR::ABL1 e1a2, e13a2, e14a2, e18a2 en e19a2 (follow up)

BCR::ABL1 mutaties (aminozuur ~30-540aa (NP\_005148.2))

B-ALL: RNASeq analyses (see below)

Predispositie genpanel (uitsluitend na overleg)

informatie: <https://hema13.erasmusmc.nl/diagnostiek.html>
**Testbeschrijving NGS (DNA)**

De varianten in de bovenstaande genen worden bepaald met behulp van Next Generation Sequencing (NGS) op DNA, waarbij gebruik wordt gemaakt van het Pillar Myeloid Panel of custom gen panels op het Illumina MiSeq platform<sup>1</sup>. De coverage van alle target genen is ten minste 500x. Van de exon-intron overgangen worden 5 basenparen (bp) geanalyseerd.

Op basis van deze NGS data (paired-end reads) worden varianten geïdentificeerd met een in-house ontwikkelde bio-informatica pipeline. Deze pipeline start met de alignment van de reads tegen het referentiegenoom met behulp van de tool BMap<sup>2</sup>. Per patiënt worden uitsluitend de regio's geanalyseerd die de opgegeven genen omvatten. Hiervoor wordt een in-house ontwikkelde tool gebruikt die reads buiten deze regio's filtert of trimt, en tegelijkertijd adapters verwijdert. Voor het detecteren van single nucleotide variants (SNVs), inserties en deleties (indels) worden de variant callers Mutect<sup>3</sup>, Mutect2<sup>4</sup>, VarDict<sup>5</sup> en Strelka2<sup>6</sup> gebruikt. Voor de detectie van grotere indels, zoals FLT3-ITD's en varianten in het gen CEBPA, wordt aanvullend gebruikgemaakt van de tool Pindel<sup>7</sup>. De varianten worden geannoteerd met behulp van de tools ANNOVAR<sup>8</sup>, SNPEff<sup>9</sup> en een interne tool voor het bepalen van coverage en variant allele frequency (VAF). Het resultaat is een lijst met geannoteerde varianten per patiënt.

Alle analyses worden uitgevoerd op twee onafhankelijke DNA monsters. Alleen varianten die in beide monsters aanwezig zijn, worden gerapporteerd. Indien varianten worden aangetoond in DNA afkomstig uit beenmerg of bloed ten tijde van een maligniteit, worden deze bevestigd met een analyse op DNA verkregen uit speeksel.

Voor de beoordeling van de mogelijke pathogeniciteit van de varianten worden verschillende in silico-voorspellingsprogramma's gebruikt, waaronder SIFT<sup>10</sup>, PolyPhen<sup>11</sup>, MutationTaster<sup>12</sup>, Franklin (<https://franklin.genoox.com>) en de Genome Aggregation Database (gnomAD).

De genomische regio's aangegeven in de onderstaande tabel zijn lastiger te sequencen waardoor mutaties met een lage variant allel frequentie (<5%) gemist zouden kunnen worden.

|                          | Onderdeel van gen |
|--------------------------|-------------------|
| chr21:36265116-36265292  | RUNX1             |
| chrX:123184867-123185039 | STAG2             |
| chrX:123195585-123195750 | STAG2             |
| chrX:123197732-123197921 | STAG2             |
| chrX:123199965-123200094 | STAG2             |
| chrX:123204971-123205146 | STAG2             |
| chrX:123215319-123215488 | STAG2             |
| chrX:123217200-123217378 | STAG2             |
| chrX:133511947-133512112 | PHF6              |
| chrX:133527566-133527744 | PHF6              |

**Referenties**

- <https://emea.illumina.com/>.
- BMap short-read aligner, and other bioinformatics tools (<http://sourceforge.net/projects/bmap/>).
- Cibulskis K, Lawrence MS, Carter SL, et al. Sensitive detection of somatic point mutations in impure and heterogeneous cancer samples. Nat Biotechnol 2013;31:213-9.
- <https://gatk.broadinstitute.org/hc/en-us/articles/360037593851-Mutect2>
- Lai, Z., Markovets, A., Ahdesmaki, M., Chapman, B., Hofmann, O., McEwen, R., Johnson, J., Dougherty, B., Barrett, J. C., & Dry, J. R. (2016). VarDict: a novel and versatile variant caller for next-generation sequencing in cancer research. Nucleic acids research, 44(11), e108. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw227>
- Kim, S., Scheffler, K., Halpern, A. L., Bekritsky, M. A., Noh, E., Källberg, M., Chen, X., Kim, Y., Beyter, D., Krusche, P., & Saunders, C. T. (2018). Strelka2: fast and accurate calling of germline and somatic variants. Nature Methods, 15(8), 591–594. <https://doi.org/10.1038/s41592-018-0051-x>
- <https://gmt.genome.wustl.edu/packages/pindel/>
- <https://annovar.openbioinformatics.org/en/latest/>
- <https://pilingola.github.io/SnpEff/>
- Ng PC, Henikoff S. SIFT: Predicting amino acid changes that affect protein function. Nucleic Acids Res. 2003;31(13):3812-4.
- Adzhubei I, Jordan DM, Sunyaev SR. Predicting functional effect of human missense mutations using PolyPhen-2. Curr Protoc Hum Genet. 2013;Chapter 7:Unit7.20.
- <http://www.mutationtaster.org/>.

**Disclaimer next generation sequencing:**

Neutrale polymorfismen, silent mutaties, waarschijnlijk niet-pathogene varianten en varianten, die we op dit moment niet nader kunnen duiden, worden niet gerapporteerd. De methode is beperkt in staat om mutaties met een allelfrequentie kleiner dan 5% en (grotere) deleties, inserties en indels aan te tonen en/of uit te sluiten. Sommige delen van genen zijn lastiger te sequencen waardoor mutaties gemist kunnen worden.

## INFORMATIE UITSLAGEN HEMATO-ONCOLOGIE LAB - UNIT MOLECULAIRE DIAGNOSTIEK EMC – SEQUENCING (RNA)

### RNASeq analyses bij acute lymfocyttaire leukemie (ALL)

Deze RNASeq bepaling is nog niet opgenomen in de ISO15189 (M138) scope.

| Afwijking                                                                                              | Bepaling |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------|
| <i>ETV6::RUNX1</i>                                                                                     | RNASeq*  |
| Hoge hyperdiploidie (51-67 chr)                                                                        | RNASeq*  |
| <i>ZNF384</i> fusiegenen                                                                               | RNASeq*  |
| <i>BCR::ABL1</i>                                                                                       | RNASeq*  |
| <i>ABL</i> -klasse fusiegenen (bijv. <i>ABL1</i> , <i>ABL2</i> , <i>CSF1R</i> en <i>PDGFRB</i> fusies) | RNASeq*  |
| Lage hypodiploidie (30-39 chr)                                                                         | RNASeq*  |
| <i>TP53</i> mutatie (homozygoot-heterozygoot)                                                          | RNASeq   |
| <i>FLT3</i> ITD                                                                                        | RNASeq   |
| <i>KMT2A::AFF1</i>                                                                                     | RNASeq*  |
| <i>KMT2A</i> fusiegenen                                                                                | RNASeq*  |
| Bijna triploidie (60-78 chr)                                                                           | RNASeq*  |
| <i>CRLF2</i> - of <i>JAK2</i> -gerelateerde fusiegenen                                                 | RNASeq*  |
| <i>JAK</i> mutaties                                                                                    | RNASeq   |
| <i>iAMP21</i>                                                                                          | RNASeq*  |
| Complex karyotype (≥5)                                                                                 | RNASeq*  |
| <i>CDKN2A/B</i> deletie                                                                                | RNASeq*  |
| <i>PAX5</i> deletie                                                                                    | RNASeq#  |
| <i>PAR1</i> deletie                                                                                    | RNASeq#  |
| <i>ERG</i> deletie                                                                                     | RNASeq#  |
| <i>IKZF1</i> deletie                                                                                   | RNASeq#  |

Percentage maligne cellen: >10%

\*: in combinatie met cytogenetica

#: in combinatie met array CGH

### Testbeschrijving NGS (RNA)

De varianten zoals hierboven aangegeven worden gedetecteerd door next generation sequencing op RNA met behulp van de KAPA RNA Hyper+RiboErase HMR (24rxn) (8098131702) reactie kit, gevolgd door analyses met onze interne pipeline. Onze pipeline voor uitgebreide profilering van RNA-seq gegevens is geïmplementeerd in Nextflow<sup>1</sup> voor robuuste reproduceerbaarheid en schaalbare uitvoering in diverse computationele omgevingen. Kort gezegd, RNA-seq reads worden bijgesneden met TrimGalore (0.6.10)<sup>2</sup> en aligned met het GRCh38 menselijke referentiegenoom met behulp van STAR (2.7.11a)<sup>3</sup>. Vervolgens worden ze verwerkt met een interne pipeline die gedeeltelijk is gebaseerd op de GATK, gericht op het corrigeren van mogelijke bronnen van artefacten<sup>4</sup>. Puntmutaties en kleine inserties of deleties worden vastgesteld met een ensemble van tools, namelijk Mutect2<sup>5</sup>, VarDict<sup>6</sup> en Pindel<sup>7</sup>. Fusiegenen worden gedetecteerd met FusionCatcher (v1.3)<sup>8</sup>, Arriba (v2.2.21)<sup>9</sup> en STAR-Fusion<sup>10</sup>, en kopie aantal veranderingen met SuperFreq (v1.3.2)<sup>11</sup>. Andere structurele varianten, zoals grote deleties, worden geïdentificeerd door een interne algoritme dat abnormale splicing junctions extraheren die afwezig zijn in de Ensembl-database (v104)<sup>12</sup>.

### Referenties

- Di Tommaso P, Chatzou M, Floden EW, Barja PP, Palumbo E, Notredame C. Nextflow enables reproducible computational workflows. Nat Biotechnol 2017 Apr 11; 35(4): 316-319.
- Martin M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. EMBnetjournal 2011; 17(1).
- Dobin A, Davis CA, Schlesinger F, Drenkow J, Zaleski C, Jha S, et al. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. Bioinformatics 2013 Jan 1; 29(1): 15-21.
- Van der Auwera GA, Carneiro MO, Hartl C, Poplin R, Del Angel G, Levy-Moonshine A, et al. From FastQ data to high confidence variant calls: the Genome Analysis Toolkit best practices pipeline. Curr Protoc Bioinformatics 2013; 43(1110): 11 10 11-11 10 33.
- McKenna A, Hanna M, Banks E, Sivachenko A, Cibulskis K, Kernytzky A, et al. The Genome Analysis Toolkit: a MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. Genome Res 2010 Sep; 20(9): 1297-1303.
- Lai Z, Markovets A, Ahdesmaki M, Chapman B, Hofmann O, McEwen R, et al. VarDict: a novel and versatile variant caller for next-generation sequencing in cancer research. Nucleic Acids Res 2016 Jun 20; 44(11): e108.
- Ye K, Schulz MH, Long Q, Apweiler R, Ning Z, Pindel: a pattern growth approach to detect break points of large deletions and medium sized insertions from paired-end short reads. Bioinformatics 2009 Nov 1; 25(21): 2865-2871.
- Nicorici D, Şatalan M, Edgren H, Kangaspeka S, Murumägi A, Kallioniemi O, et al. FusionCatcher – a tool for finding somatic fusion genes in paired-end RNA-sequencing data. bioRxiv 2014: 011650.
- Uhrig S, Ellermann J, Walther T, Burkhardt P, Frohlich M, Hutter B, et al. Accurate and efficient detection of gene fusions from RNA sequencing data. Genome Res 2021 Mar; 31(3): 448-460.
- Haas BJ, Dobin A, Li B, Stransky N, Pochet N, Regev A. Accuracy assessment of fusion transcript detection via read-mapping and de novo fusion transcript assembly-based methods. Genome Biol 2019 Oct 21; 20(1): 213.
- Flensburg C, Oshlack A, Majewski IJ. Detecting copy number alterations in RNA-Seq using SuperFreq. Bioinformatics 2021 Nov 18; 37(22): 4023-4032.
- Frankish A, Carbonell-Sala S, Diekhans M, Jungreis I, Loveland JE, Mudge JM, et al. GENCODE: reference annotation for the human and mouse genomes in 2023. Nucleic Acids Res 2023 Jan 6; 51(D1): D942-D949.

Disclaimer next generation sequencing:

Neutrale polymorfismen, silent mutaties, waarschijnlijk niet-pathogene varianten en varianten, die we op dit moment niet nader kunnen duiden, worden niet gerapporteerd. De methode is beperkt in staat om mutaties met een allelfrequentie kleiner dan 5% en (grotere) deleties, inserties en indels aan te tonen en/of uit te sluiten. Sommige delen van genen zijn lastiger te sequencen waardoor mutaties gemist kunnen worden.