

INFORMATIE UITSLAGEN HEMATO-ONCOLOGIE LAB - UNIT MOLECULAIRE DIAGNOSTIEK EMC

Afwijking	Percentage Maligne Cellen*	VAF#	Bepaling
<i>RUNX1-RUNX1T1</i>	1%		RQ-PCR1
<i>CBFB-MYH11</i>	10%		RQ-PCR1/RT-PCR
<i>BCR-ABL</i> (breukpunt)	1%		RT-PCR
<i>BCR-ABL</i> (e13/e14-a2)	0.001%		RQ-PCR2
<i>BCR-ABL</i> mutatie	>0.01% IS		Sanger sequencing
<i>NUP214-ABL</i>	0.1%		RQ-PCR1
<i>FIP1L1-PDGFR4</i>	1%		RT-PCR
<i>PML-RARA</i>	1%		RT-PCR
<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%	NGS4
<i>CBL</i> mutatie	10%	5%	NGS1
<i>CEBPA</i> mutatie	10%	5%	NGS2
<i>CSF3R</i> mutatie	10%	5%	NGS1
<i>DNMT3A</i> mutatie	10%	5%	NGS1
<i>EZH2</i> mutatie	10%	5%	NGS1
<i>GATA2</i> mutatie	10%	5%	NGS1
<i>IDH1</i> mutatie	10%	5%	NGS1
<i>IDH2</i> mutatie	10%	5%	NGS1
<i>JAK2</i> V617F mutatie	0.1%	2%	RQ-PCR1/NGS4
<i>JAK2</i> exon12 mutatie	10%	5%	NGS4
<i>KIT</i> mutatie	10%	5%	NGS1
<i>MPL</i> mutatie	10%	5%	NGS4
<i>MYD88</i> mutatie	10%	5%	NGS1
<i>NPM1</i> mutatie	0.01% (RQ-PCR [‡])	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>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

*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 aangegeven 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 ketting reactie

RT-PCR: reverse transcriptase – PCR

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

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

LMA: lengte mutatie analyse

NGS1: Next generation sequencing Illumina TruSight Myeloid panel

NGS2: Next generation sequencing custom panel *CEBPA*

NGS3: Next generation sequencing custom panel *TP53*

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

NGS4: Next generation sequencing custom panel *UBA1*

Op de volgende pagina 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

	Type mutaties/ regio
<i>RUNX1-RUNX1T1</i>	
<i>CBFB-MYH11</i>	
<i>ASXL1</i> mutatie	exon12
<i>BCOR</i> mutatie	gehele gen
<i>CEBPA</i> mutatie (inclusief aan-/afwezigheid bZIP mutatie)	gehele gen
<i>EZH2</i> mutatie	gehele gen
<i>FLT3-ITD</i>	exon14 en exon15
<i>FLT3-TKD</i>	D835/ exon20
<i>GATA2</i> mutatie	exon2-6
<i>IDH1</i> mutatie	R132/ exon4
<i>IDH2</i> mutatie	R140 en R172/ exon4
<i>KIT</i> mutatie	exon2,8-11,13,17
<i>NPM1</i> mutatie	4bp insertie/ exon12
<i>RUNX1</i> mutatie	gehele gen
<i>SF3B1</i> mutatie	K700/ exon13-16
<i>SRSF2</i> mutatie	exon1
<i>STAG2</i> mutatie	gehele gen
<i>TP53</i> mutatie	exon2-11
<i>U2AF1</i> mutatie	exon2 en exon6
<i>ZRSR2</i> mutatie	gehele gen

MDS (IPSS-M)

<i>ASXL1</i> mutatie	exon12
<i>BCOR</i> mutatie	gehele gen
<i>BCORL1</i> mutatie	gehele gen
<i>CBL</i> mutatie	exon8 en exon9
<i>CSF3R</i> mutatie	exon14-17
<i>DNMT3A</i> mutatie	gehele gen
<i>ETV6</i> mutatie	gehele gen
<i>EZH2</i> mutatie	gehele gen
<i>FLT3-ITD</i>	exon14 en exon15
<i>FLT3-TKD</i>	D835/ exon20
<i>GATA2</i> mutatie	exon2-6
<i>IDH1</i> mutatie	R132/ exon4
<i>IDH2</i> mutatie	R140 en R172/ exon4
<i>KIT</i> mutatie	exon2,8-11,13,17
<i>KRAS</i> mutatie	codons 12,13 en 61/ exon2 en exon3
<i>NPM1</i> mutatie	4bp insertie/ exon12
<i>NRAS</i> mutatie	codons 12,13 en 61/ exon2 en exon3
<i>PHF6</i> mutatie	gehele gen
<i>RUNX1</i> mutatie	gehele gen
<i>PTPN11</i> mutatie	exon3 en exon13
<i>SETBP1</i> mutatie	(deel) exon4
<i>SF3B1</i> mutatie	K700/ exon13-16
<i>SRSF2</i> mutatie	exon1
<i>STAG2</i> mutatie	gehele gen
<i>TP53</i> mutatie	exon2-11
<i>U2AF1</i> mutatie	exon2 en exon6
<i>WT1</i> mutatie	exon7 en exon9
<i>ZRSR2</i> mutatie	gehele gen

MDS-MPN/ CMML/ CNL en atypische CML

<i>ASXL1</i> mutatie	exon12
<i>BCOR</i> mutatie	gehele gen
<i>BCORL1</i> mutatie	gehele gen
<i>CBL</i> mutatie	exon8 en exon9
<i>CSF3R</i> mutatie	exon14-17
<i>DNMT3A</i> mutatie	gehele gen
<i>ETV6</i> mutatie	gehele gen
<i>EZH2</i> mutatie	gehele gen
<i>GATA2</i> mutatie	exon2-6
<i>IDH1</i> mutatie	R132/ exon4
<i>IDH2</i> mutatie	R140 en R172/ exon4
<i>KIT</i> mutatie	exon2,8-11,13,17
<i>KRAS</i> mutatie	codons 12,13 en 61/ exon2 en exon3
<i>NPM1</i> mutatie	4bp insertie/ exon12
<i>NRAS</i> mutatie	codons 12,13 en 61/ exon2 en exon3
<i>PHF6</i> mutatie	gehele gen

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.

<i>RUNX1</i> mutatie	gehele gen
<i>PTPN11</i> mutatie	exon3 en exon13
<i>SETBP1</i> mutatie	(deel) exon4
<i>SF3B1</i> mutatie	K700/ exon13-16
<i>SRSF2</i> mutatie	exon1
<i>STAG2</i> mutatie	gehele gen
<i>TP53</i> mutatie	exon2-11
<i>U2AF1</i> mutatie	exon2 en exon6
<i>WT1</i> mutatie	exon7 en exon9
<i>ZRSR2</i> mutatie	gehele gen
MDS-RS	
<i>SF3B1</i> mutatie	K700/ exon13-16
MPN	
<i>CALR</i> mutatie	exon9
<i>JAK2</i> mutatie	V617F en exon12
<i>MPL</i> mutatie	W515/ exon10
PMF (MIPSS70)	
<i>ASXL1</i> mutatie	exon12
<i>EZH2</i> mutatie	gehele gen
<i>IDH1</i> mutatie	R132/ exon4
<i>IDH2</i> mutatie	R140 en R172/ exon4
<i>RUNX1</i> mutatie	gehele gen
<i>SF3B1</i> mutatie	K700/ exon13-16
<i>SRSF2</i> mutatie	exon1
<i>TP53</i> mutatie	exon2-11
<i>U2AF1</i> mutatie	exon2 en exon6
CLL	
<i>TP53</i> mutatie	exon2-11
Hairy cell leukemie	
<i>BRAF</i> mutatie	V600/ exon15
Mastocytose	
<i>KIT</i> mutatie	exon2,8-11,13,17
Agressieve mastocytose	
<i>ASXL1</i> mutatie	exon12
<i>EZH2</i> mutatie	gehele gen
<i>RUNX1</i> mutatie	gehele gen
<i>SRSF2</i> mutatie	exon1
<i>TET2</i> mutatie	exon3-11
M. Waldenström	
<i>MYD88</i> mutatie	L265/ exon3-5
VEXAS	
<i>UBA1</i> mutatie	exon3
Predispositie genpanel (uitsluitend na overleg)	informatie: https://hema13.erasmusmc.nl/diagnostiek.html

Testbeschrijving

De varianten in de bovenstaande genen worden bepaald met behulp van next generation sequencing gebruik makend van de Illumina TruSight Myeloid targeted panel (TSCA design (probe hybridisatie, extensie-ligatie en PCR)) of custom genpanels (nested PCR) op de Illumina MiSeq¹. De coverage van alle target gene is ten minste 500x. Van de exon-intron overgangen worden 5bp geanalyseerd. De varianten worden vervolgens geïdentificeerd met in-huis ontwikkelde software pipeline. In deze software wordt 'read alignment' uitgevoerd met BMAP² en SAMtools³ en 'variant calling' met MuTect⁴, GATK⁵, VarScan⁶, Indelocator⁷ en Pindel⁵. Alle analyses worden op twee onafhankelijke DNA monsters uitgevoerd. Alleen varianten aanwezig in beide DNA monsters worden gerapporteerd. Indien varianten aangetoond zijn in DNA afkomstig uit beenmerg of bloed ten tijde van een maligniteit worden deze bevestigd door de analyse DNA afkomstig uit speeksel. Om de pathogeniciteit van de varianten te bepalen worden *in silico* programma's gebruikt zoals SIFT⁸, Polyphen⁹ en Mutation Taster¹⁰, Franklin [<https://franklin.genoox.com>] en de Genome Aggregation Database (gnomAD).

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.

Genomische regio's met minder goede/geen coverage	Onderdeel van gen
chr1:115256418-115256622	<i>NRAS</i>
chr1:36932117-36932335	<i>CSF3R</i>
chr2:25475058-25475230	<i>DNMT3A</i>
chr3:128200640-128200861	<i>GATA2</i>
chr3:128204781-128204979	<i>GATA2</i>
chr21:36259341-36259561	<i>RUNX1</i>
chrX:39933717-39933893	<i>BCOR</i>
chrX:129147754-129147931	<i>BCORL1</i>
chrX:129162779-129162975	<i>BCORL1</i>
chrX:129168429-129168651	<i>BCORL1</i>
chrX:123171376-123171473	<i>STAG2</i>

Referenties

1. <https://emea.illumina.com/>.
2. BBMap short-read aligner, and other bioinformatics tools (<http://sourceforge.net/projects/bbmap/>).
3. Li H, Handsaker B, Wysoker A, et al. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics* 2009;25:2078-9.
4. 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.
5. DePristo MA, Banks E, Poplin R, et al. A framework for variation discovery and genotyping using next-generation DNA sequencing data. *Nat Genet* 2011;43:491-8.
6. Koboldt DC, Zhang Q, Larson DE, et al. VarScan 2: somatic mutation and copy number alteration discovery in cancer by exome sequencing. *Genome Res* 2012;22:568-76.
7. Indelocator. at <http://www.broadinstitute.org/cancer/cga/indelocator>.
8. Ng PC, Henikoff S. SIFT: Predicting amino acid changes that affect protein function. *Nucleic Acids Res.* 2003;31(13):3812-4.
9. 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.
10. <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.