

Testbeschrijving

Whole Exome Sequencing (WES) is een next-generation sequencing test waarbij gebruik wordt gemaakt van een hybrid capture-gebaseerde techniek voor het gehele exoom, uitgebreid met niet-exonische regio's die van belang zijn voor somatische en kiembaanvraagstellingen in de oncologie. Deze test wordt uitgevoerd op tumorweefsel zonder gepaard normaal materiaal en omvat meer dan 99% van de coderende genen in de databases RefSeq, Gencode en CCDS. De test is geschikt voor detectie van mutaties, copy number variaties (CNVs; amplificaties en hele exon- of gendeleties), microsatelliet instabiliteit (MSI), tumor mutational burden (TMB), een genomische instabiliteitsscore (GIS) en geselecteerde single base substitution (SBS) signatures.

Beknopte methode

Exoom sequencing wordt verricht met een Illumina NovaSeq X Plus, na verrijking van het exoom met de Twist Exome 2.0.1 plus Comprehensive Exome probes voor exonische regio's, uitgebreid met probes voor niet-exonische regio's die van belang zijn voor somatische en kiembaanvraagstellingen in de oncologie. 'Read alignment' wordt gedaan met BWA^(a), en 'variant calling' met Mutect2^(b) (puntmutaties en indels) en de Radboud OncoCNV caller (CNVs). Unieke coverage wordt bepaald met Mosdepth^(c), waarbij wordt gecorrigeerd voor duplicate reads en overlappende read mates. Varianten worden geannoteerd en gefilterd met een in het Radboudumc ontwikkelde pijplijn. MSI wordt bepaald op een set van 127 mononucleotide repeat markers met mSINGS^(d). De TMB wordt bepaald op basis van somatische varianten met een allelfrequentie $\geq 5\%$ in regio's met een dekking van $\geq 50\times$. De GIS, bestaande uit large-scale state transitions (LSTs), telomeric allelic imbalances (TAIs) en regions with loss of heterozygosity (gLOHs), is berekend op basis van allel-specifieke copy number analyse met PureCN^(e). De GIS is een maat voor homologe recombinatie deficiëntie (HRD), waarbij een GIS-waarde ≥ 42 een kernmerk is voor HRD. Mutational signature analysis wordt uitgevoerd met R-package signature.tools.lib^(f) op basis van de dataset RefSig v2 voor signatures gerelateerd aan tabaksrook (SBS4), UV-straling (SBS7a en SBS7c), POLE-mutatie (SBS10a) en MSI (SBS6, SBS14, SBS15, SBS20, SBS26, SBS44 en SBS97). Er wordt een opmerking toegevoegd aan de uitslag wanneer de behaalde sensitiviteit mogelijk onvoldoende is om de onderzoeksvraag volledig te beantwoorden.

Minimaal percentage neoplastische cellen voor betrouwbare analyse

- 10% voor puntmutaties en indels
- 20% voor tumor mutational burden
- 30% voor microsatelliet instabiliteit
- 30% voor genomische instabiliteitsscore
- 50% voor aanwijzingen voor hele exon- en gendeleties (betrouwbaarheid afhankelijk van gen en casus)
- Variabel percentage voor amplificaties, omdat dit afhankelijk is van het aantal kopieën

Virtuele genenpanels

Voor verschillende indicaties is een virtueel panel gedefinieerd waarin genen relevant voor differentiaaldiagnose en/of therapiekeuze voor de betreffende indicatie zijn opgenomen. Deze panels worden in overleg met pathologen en behandelend artsen vastgesteld. Gedetecteerde mutaties en CNVs worden alleen voor deze genen gerapporteerd. Nieuwe virtuele genenpanels kunnen op verzoek worden gegenereerd en specifieke genen kunnen op verzoek worden geanalyseerd.

Bij de vraagstelling PTO worden de genen in het actionable targets panel in detail geanalyseerd.

Daarnaast worden evident pathogene mutaties en CNVs gerapporteerd voor ~400 additionele tumor-gerelateerde genen, inclusief de genen in alle onderstaande panels.

a) Li *et al.* (2013), b) Cibulskis *et al.* (2013), c) Pedersen & Quinlan (2017),
d) Salipante *et al.* (2014), e) Riester *et al.* (2016), f) Degasperis *et al.* (2022)

Voor toepassing binnen de Pathologie zijn de volgende panels in gebruik:

Actionable targets		Long	Prostaat-research	Prostaat-diagnostiek	Lymfoom	Myeloid	Huid d.d.	Neuro	Hepato d.d.	
v3		v4	v1	v2	v3	v2	v1	v1	v1	
AKT1	JAK1	BRAF	AKT1	AKT1	BCL2	ASXL1	AKT1	ATRX	ACVR2A	
AKT2	JAK2	CDK4	AKT2	AR	BCL10	ATRX	ALPK1	BRAF	AGO2	
AKT3	KDR	CDK6	AKT3	ATM	BCL6	BCOR	APC	CDK4	ALB	
ALK	KIT	EGFR	AR	BRAF	BIRC3	BCORL1	ARID1A	CDK6	APOB	
AR	KRAS	ERBB2	ATM	BRCA1	BRAF	BRAF	ARID2	CDKN2A	ARID1A	
ATM	MAP2K1	FGFR1	ATR	BRCA2	BTG1	CALR	ATM	CTNNB1	ARID1B	
ATR	MAP2K2	FGFR2	BARD1	CDK12	BTK	CBL	BAP1	EGFR	ARID2	
B2M	MAP2K4	FGFR3	BRAF	MAP3K1	CARD11	CDKN2A	BCL2	FGFR1	ATM	
BARD1	MAP3K1	FGFR4	BRCA1	PALB2	CD79A	CEBPA	BCOR	FGFR2	AXIN1	
BRAF	MET	KEAP1	BRCA2	PIK3CA	CD79B	CSF3R	BRAF	FGFR3	CCND1	
BRCA1	MLH1	KRAS	BRIP1	PPP2R2A	CDKN2A	CUX1	CCND1	GNA11	CDKN2A	
BRCA2	MRE11	MET	CCND1	PTEN	CREBBP	DDX41	CDK4	GNAQ	CTNNB1	
BRIP1	MSH2	MTAP	CDK12		CXCR4	DNMT3A	CDKN2A	H3-3A	FGF19	
CCND1	MSH6	NFE2L2	CDK4		DNMT3A	EP300	CTNNB1	H3-3B	FRK	
CCND2	MST1R	RB1	CDK6		EP300	ETNK1	CYLD	IDH1	GNAS	
CCND3	MTAP	STK11	CDKN2A		EZH2	ETV6	CYSLTR2	IDH2	HNF1A	
CDK12	NBN	TP53	CHEK1		IDH2	EZH2	DNMT3A	KRAS	HRAS	
CDK4	NF1		CHEK2		IRF4	FLT3	EGFR	MAP2K1	IL6ST	
CDK6	NOTCH1		ERCC2		MAP2K1	GATA2	EIF1AX	MDM2	INHBE	
CDKN2A	NOTCH2		FANCA		MYD88	GNB1	ERBB2	MET	JAK1	
CHEK1	NOTCH3		FANCL		NOTCH1	IDH1	FOXA1*	MLH1	KEAP1	
CHEK2	NOTCH4		MAP2K1		NOTCH2	IDH2	GNA11	MSH2	KMT2A	
CSF1R	NRAS		MAP2K2		PIM1	JAK2	GNAQ	MSH6	KMT2C	
EGFR	PALB2		MAP2K4		PLCG2	KDM6A	GNAS	NF1	KMT2D	
ERBB2	PDGFRA		MAP3K1		RHOA	KIT	HRAS	NRAS	KRAS	
ERBB4	PDGFRB		MLH1		SF3B1	KMT2A	IDH1	PDGFRA	MYC	
FANCA	PIK3CA		MRE11		STAT3	KMT2C	IDH2	PIK3CA	NFE2L2	
FANCC	PIK3R1		MSH2		STAT5B	KRAS	JAK1	PMS2	NRAS	
FANCD2	PIK3R2		MSH6		STAT6	MAP2K1	JAK2	PTEN	PTK2	
FANCF	POLD1		NBN		TET2	MPL	KIT	SMARCA4	RB1	
FANCL	POLE		PALB2		TNFAIP3	MYC	KRAS	SMARCB1	RIT1	
FGFR1	PPP2R2A		PIK3CA		TNFRSF14	NF1	MAP2K1	TERT	RPS6KA3	
FGFR2	PTCH1		PIK3CB		TP53	NFE2	MAP2K2	TP53	STAT3	
FGFR3	PTEN		PIK3R1				NPM1	MDM2		TERT
FGFR4	RAD50		PMS2				NRAS	MDM4		TP53
FLT1	RAD51		POLE				PAX5	MET		TSC1
FLT3	RAD51B		PPP2R2A				PHF6	MYB		TSC2
FLT4	RAD51C		PTEN	PPM1D			MYC	VEGFA		
GNA11	RAD51D		RAD51B	PRPF8			NF1			
GNAQ	RAD54L		RAD51C	PTEN			NOTCH1			
GNAS	RET		RAD51D	PTPN11			NOTCH2			
HRAS	TP53		RAD54L	RAD21			NOTCH3			
IDH1	TSC1	RB1	RUNX1	NRAS						
IDH2	TSC2	RAF1	SETBP1	PIK3CA						
		SPOP	SF3B1	PIK3R1						
		TP53	SMC1A	PLCB4						
			SMC3	PRKAR1A						
			SRSF2	PTCH1						
			STAG1	PTEN						
			STAG2	RAC1						
			TET2	RB1						
			TP53	RREB1						
			U2AF1	SF3B1						
			UBA1	SMO						
			WT1	SUFU						
			ZRSR2	TERT						
				TP53						
				YAP1						

*de promotor van FOXA1 is onvoldoende gedekt voor sensitieve mutatie-analyse

Ingebruikname test:

22-01-2024 (datasheet versie 1)

Updates datasheet:

Versie 2 (14-03-2024)

Toevoeging GIS. Deze test wordt ook gebruikt voor de tumor first analyse bij ovariumkanker. Hierbij worden zowel de detectie van pathogene kiembaanvarianten ten behoeve van genetische predispositie als de mutatiedetectie en GIS ten behoeve van therapieselectie geborgd.

Versie 3 (12-09-2024)

Aanpassing van de set mononucleotide repeat markers die wordt gebruikt voor bepaling van MSI. Tot en met 5 september 2024 waren dit 52 markers. Dit is aangepast naar 127 andere markers.

Versie 4 (12-02-2025)

Aanpassing van het algoritme voor coverage- en sensitiviteitsbepaling. In uitslagen vanaf dit moment worden overlappende sequenties van read pairs en duplicate reads (op basis van start- en eindpositie) niet meegeteld bij de bepaling van de sensitiviteit en de mediane coverage. Er wordt daarom de *unieke* mediane coverage gerapporteerd.

Versie 5 (01-04-2025)

Toevoeging dat bij deze test enkel tumorweefsel wordt geanalyseerd, zonder gepaard normaal sample.
Toevoeging mutational signature analyse.

Versie 6 (03-07-2025)

Wijziging sequencing op NovaSeq X Plus ipv -6000
Toevoeging panels 'Huid differentiaaldiagnose' en 'Neuro'
Details over coverage-bepaling toegevoegd
Details alle panels toegevoegd

Versie 7 (15-09-2025)

Opmerking coverage op promoter *FOXA1* toegevoegd
Toevoeging panel 'Hepato dd'