

## Whole Exome Sequencing (WES)

### 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 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 deleties), microsatelliet instabiliteit (MSI) en de tumor mutational burden (TMB).

### Beknopte methode

Exoom sequencing wordt verricht met een Illumina NovaSeq 6000, 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, en 'variant calling' met Mutect2 (SNVs) en de Radboud OncoCNV caller (CNVs). Daarna worden de varianten geannoteerd en gefilterd met een in het Radboudumc ontwikkelde pijplijn. MSI wordt bepaald op een set van 52 mononucleotide repeat markers met mSINGS. De TMB wordt bepaald op basis van somatische varianten met een allelfrequentie  $\geq 5\%$  in regio's met een dekking van  $\geq 50x$ . De mediane coverage opgenomen in de uitslag betreft alle sequencing reads, inclusief duplicaten. Duplicate reads worden niet gebruikt voor variant calling. Er wordt een opmerking toegevoegd aan de uitslag wanneer de behaalde sensitiviteit mogelijk onvoldoende is om de onderzoeksvraag volledige te beantwoorden.

### Minimaal percentage neoplastische cellen voor betrouwbare analyse

- 10% voor mutaties
- 20% voor tumor mutational burden
- 30% voor microsatelliet instabiliteit
- 50% voor aanwijzingen voor deleties (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. Gedetecteerde mutaties en CNVs worden alleen voor deze genen gerapporteerd. Deze panels worden in overleg met pathologen en behandelend artsen vastgesteld.

Voorbeelden van panels zijn:

- Actionable targets (bevat o.a. genen relevant voor inclusie in de DRUP trial)
- Prostaatkanker
- Longkanker
- Ovariumkanker
- Lymfoom
- Myeloïde maligniteiten

Deze virtuele genenpanels kunnen op basis van nieuwe inzichten veranderen. In de uitslag wordt vermeld welk virtueel panel en welke genen (volledige coderende gebieden) zijn geanalyseerd. Nieuwe virtuele genenpanels kunnen op verzoek worden gegenereerd en specifieke genen kunnen op verzoek worden geanalyseerd.