

2013•2014
FACULTEIT INDUSTRIËLE INGENIEURSWETENSCHAPPEN
master in de industriële wetenschappen: biochemie

Masterproef

Gebruik van MLPA bij de diagnostische work-up van B-cel precursor acute lymfoblastische leukemie

Promotor :
ing. Adele PEETERS

Promotor :
dr. Apr. ELS LIERMAN
Prof. dr. PETER VANDENBERGHE

Natasja Cordie

Proefschrift ingediend tot het behalen van de graad van master in de industriële wetenschappen: biochemie

Gezamenlijke opleiding Universiteit Hasselt en KU Leuven

Woord vooraf

Deze masterproef behoort tot de laatste fase van mijn master in de industriële wetenschappen optie biochemie. De masterproef is gekoppeld aan een stageperiode van 10 weken die plaatsvond bij het Centrum Menselijke Erfelijkheid in UZ Leuven (CME). Toen ik de lijst met mogelijke stageplaatsen ontving, ging mijn interesse onmiddellijk uit naar het CME. Met veel enthousiasme begon ik aan mijn stageperiode, wat voor mij een zeer boeiende en leerrijke periode geweest is. Zowel op theoretisch als op praktisch vlak heb ik gedurende deze stage veel bijgeleerd.

In de eerste plaats wil ik het CME bedanken voor de mogelijkheid die zij hebben geboden om bij hen stage te lopen. Vooral wil ik graag mijn bedrijfspromotoren Prof. Dr. Peter Vandenberghe en dr. Apr. Lierman Els bedanken voor de goede begeleiding bij zowel de praktische uitvoering als het schrijven van mijn masterproef. Bij hen kon ik ook steeds terecht met mijn vragen en problemen.

Daarnaast wil ik mijn interne promotor mevr. Peeters Adèle bedanken voor haar goed advies en hulp bij het schrijven van mijn masterproef. Verder wil ik de docent communicatie, dr. Jeroen Lievens, bedanken voor de hulp bij het communicatieve aspect van mijn masterproef.

Ook wil ik het voltallige team van laboranten bedanken voor de goede ontvangst en hulp bij de praktische uitvoering. Tot slot wil ik mijn ouders en vriend Stijn bedanken voor de onvoorwaardelijke steun tijdens deze periode.

Inhoud

Woord vooraf	1
Lijst van tabellen	5
Lijst van figuren	7
Abstract	11
Abstract in English	13
<u>1 Inleiding</u>	<u>15</u>
1.1 Situering	15
1.2 Probleemstelling	15
1.3 Doelstellingen	16
1.4 Materiaal & methode	17
<u>2 Literatuurstudie</u>	<u>19</u>
2.1 Leukemie	19
2.1.1 Inleiding	19
2.1.2 Genetische afwijkingen	20
2.1.3 Classificatie	21
2.2 Acute lymfoblastische leukemie	21
2.2.1 Inleiding	21
2.2.2 Risicofactoren	22
2.2.3 Diagnose en classificatie	23
2.3 B-cel precursor acute lymfoblastische leukemie	28
2.3.1 Inleiding	28
2.3.2 Chromosoomafwijkingen	29
2.3.3 Submicroscopische DNA copy-number afwijkingen	34
<u>3 Materiaal & methode</u>	<u>41</u>
3.1 MLPA-assay	41
3.1.1 Principe	41
3.1.2 Materialen	46
3.1.3 Methode	49
3.2 Real-time PCR	54
3.2.1 Principe	54
3.2.2 Materialen	55
3.2.3 Methode	55

<u>4</u>	<u>Resultaten.....</u>	<u>57</u>
4.1	Optimalisatie	57
4.1.1	Keuze van de analysemethode.....	57
4.1.2	DLD1-celijn als referentiestaal.....	59
4.1.3	Optimale DNA hoeveelheid	59
4.1.4	Getolereerde standaardafwijking	61
4.1.5	Besluit optimalisatie	63
4.2	Testen van patiëntenstalen	63
4.2.1	Testpopulatie	63
4.2.2	Overzicht resultaten.....	63
4.3	Validatie	71
4.3.1	Juistheid.....	71
4.3.2	Intra-run variatie	73
4.3.3	Inter-run variatie	74
4.3.4	Robuustheid.....	77
4.3.5	Besluit validatie	78
<u>5</u>	<u>Discussie</u>	<u>79</u>
<u>6</u>	<u>Besluit</u>	<u>81</u>
	Literatuurlijst.....	83
	Bijlagen	93

Lijst van tabellen

Tabel 1: Verschil tussen acute en chronische leukemie	21
Tabel 2: FAB-classificatie van acute lymfoblastische leukemie	23
Tabel 3: WHO-classificatie van B-cel acute lymfoblastische leukemie	24
Tabel 4: Subtypes van B-ALL	25
Tabel 5: Goede, intermediaire en slechte risicogroepen	33
Tabel 6: Frequentie van de verschillende CNA's binnen elke cytogenetische groep	36
Tabel 7: Cut-off waarden voor de detectie van CNA's	46
Tabel 8: Inhoud van de SALSA MLPA EK1-FAM reagentia kit.....	47
Tabel 9: Controlefragmenten van probemix P335-B1	47
Tabel 10: Bereiding hybridisatie mastermix	50
Tabel 11: Bereiding ligatie mastermix	50
Tabel 12: Temperatuurprogramma van de ligatie reactie	50
Tabel 13: Bereiding polymerase mastermix.....	51
Tabel 14: Temperatuurprogramma van de PCR-reactie	51
Tabel 15: Resultaten van een patiënt geanalyseerd met interne controle normalisatie en populatie normalisatie.	58
Tabel 16: Standaardafwijking van alle probes binnen elke run bij de DLD1-celijn.....	60
Tabel 17: Standaardafwijking van referentieprobes bij patiënt GC bij een hoeveelheid DNA van 200 en 100 ng	60
Tabel 18: Resultaten van patiënt GC voor drie verschillende runs	62
Tabel 19: MLPA-resultaat van 12 BCP-ALL-patiënten	64
Tabel 20: Frequenties van de gevonden deleties in vergelijking met cijfers uit de literatuur..	65
Tabel 21: MLPA-ratio voor IKZF1 van patiënt GC	69
Tabel 22: MLPA-ratio van de PAR1-regio voor patiënt DLF	70
Tabel 23: Vergelijkende tabel van resultaat MLPA-assay en QPCR voor acht patiënten	72
Tabel 24: Resultaat van MLPA-assay en QPCR voor IKZF1 bij patiënt DCT	72

Lijst van figuren

Figuur 1: Frequentie van de chromosomale afwijkingen bij een populatie van kinderen met BCP-ALL	16
Figuur 2: Principe van de MLPA-assay	18
Figuur 3: De hematopoïese	19
Figuur 4: Kaplan-Meier analyse van de kans op overleving bij kinderen met ALL volgens de leeftijd waarop de diagnose werd gesteld	22
Figuur 5: Typische bloedbeeld van ALL	23
Figuur 6: Differentiatie van de lymfoïde lijn met de antigene markers	25
Figuur 7: Reciproke translocatie die voorkomt in B-ALL namelijk t(9;22)	26
Figuur 8: Incidentie van de verschillende chromosoomafwijkingen die voorkomen bij kinderen met ALL	27
Figuur 9: Incidentie van de verschillende chromosoomafwijkingen die voorkomen bij volwassenen met ALL	27
Figuur 10: Pathogenese van BCP-ALL	28
Figuur 11: Weergave van de prevalentie van cytogenetische groepen die voorkomen bij kinderen met BCP-ALL	29
Figuur 12: Weergave van de variatie van cytogenetische groepen met de leeftijd	29
Figuur 13: Locatie van de PAR1-regio op chromosoom X en Y	32
Figuur 14: Kaplan-Meier curve van de event-vrije overleving gegroepeerd per chromosomale afwijking bij kinderen	34
Figuur 15: Incidentie van 1363 deleties gedetecteerd bij 1427 kinderen met BCP-ALL	35
Figuur 16: Staafdiagram waarin de prevalentie van geen, één, twee, drie of meer CNA's weergegeven wordt	35
Figuur 17: Schematische weergave van het IKZF1 gen	36
Figuur 18: Ziektevrije overleving van patiënten met BCR-ABL1+ ALL met en zonder IKZF1 deleties die behandeld zijn op dezelfde manier	37
Figuur 19: Ziektevrije overleving van BCP-ALL-patiënten met en zonder PAX5 mutaties of deleties	38
Figuur 20: Hybridisatiestap van de MLPA-assay	42

Figuur 21: Ligatiestap van de MLPA-assay	42
Figuur 22: PCR-reactie van de MLPA-assay	43
Figuur 23: Voorstelling van PCR-primerset	43
Figuur 24: Quality control flowchart	44
Figuur 25: Weergave resultaten fragmentanalyse voor en na normalisatie	45
Figuur 26: Formule MLPA-ratio.....	46
Figuur 27: Manier waarop een geslaagde size calling wordt weergegeven.....	52
Figuur 28: Controlefragmenten zichtbaar bij een no-DNA controle	52
Figuur 29: Ratioplot die door GeneMarker wordt weergegeven.	53
Figuur 30: MLPA-dosage histogram van de controlefragmenten.....	53
Figuur 31: Werking SybrGreen.....	54
Figuur 32: Formule voor de ratio bij QPCR	55
Figuur 33: Gemiddelde waarde en standaardafwijking van alle probes voor drie referentiestalen (DLD1, NC1 en NC2)	59
Figuur 34: Weergave standaardafwijking tussen twee runs van de DLD1-celijn bij een hoeveelheid DNA van 200 en 100 ng	60
Figuur 35: MLPA-ratio's van patiënt GC bij een DNA hoeveelheid van 200 en 100 ng.....	61
Figuur 36: Weergave van het aantal deleties per patiënt	65
Figuur 37: MLPA resultaat van patiënt AE	66
Figuur 38: MLPA resultaat van patiënt BA	67
Figuur 39: MLPA resultaat van patiënt BS	67
Figuur 40: MLPA resultaat van patiënt CR	68
Figuur 41: MLPA resultaat van patiënt DCJ.....	68
Figuur 42: MLPA resultaat van patiënt DCT.....	69
Figuur 43: MLPA resultaat van patiënt DLF	70
Figuur 44: MLPA resultaat van patiënt GC	71
Figuur 45: Gemiddelde MLPA-ratio en standaardafwijking voor elke targetprobe van patiënt LA.....	73

Figuur 46: Gemiddelde MLPA-ratio en standaardafwijking voor elke targetprobe van patiënt VG	74
Figuur 47: Gemiddelde MLPA-ratio en standaardafwijking voor elke targetprobe van patiënt GC	74
Figuur 48: Gemiddelde MLPA-ratio en standaardafwijking voor elke targetprobe van DLD1-celijn.....	75
Figuur 49: Gemiddelde MLPA-ratio en standaardafwijking voor elke targetprobe van patiënt LA.....	75
Figuur 50: Gemiddelde MLPA-ratio en standaardafwijking voor elke targetprobe van patiënt GC	76
Figuur 51: Weergave van gemiddelde MLPA-ratio en standaardafwijking van de referentieprobes per run	76
Figuur 52: Robuustheid tussen verschillende toestellen voor patiënt GC	77
Figuur 53: Ratioplot van negatieve patiënt (manueel geëxtraheerd) genormaliseerd t.o.v. de DLD1-celijn (chemagen extractie).....	78

Abstract

B-cel precursor acute lymfoblastische leukemie (BCP-ALL) is een kwaadaardige hematologische aandoening waarbij de voorlopers van de B-lymfocyten overmatig prolifereren. Recent werd aangetoond dat verschillende submicroscopische DNA copy-number afwijkingen (CNA's) een belangrijke rol spelen in de prognose van BCP-ALL-patiënten. Daarom zoekt het Centrum Menselijke Erfelijkheid naar een diagnostische test voor de opsporing van deze afwijkingen.

De MLPA- (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification) assay is een betrouwbare, robuuste techniek waarmee gelijktijdig afwijkingen in meerdere targets opgespoord worden. In deze masterproef wordt de SALSA MLPA probemix P335-B1 ALL-IKZF1 van MRC Holland uitgetest voor de opsporing van CNA's bij BCP-ALL. Deze assay detecteert afwijkingen in *IKZF1*, *CDKN2A/B*, *PAX5*, *ETV6*, *BTG1*, *RBI* en genen van de *PARI*-regio (*CRLF2*, *CSF2RA*, *IL3RA*). Na de optimalisatie wordt de assay grondig gevalideerd op juistheid, robuustheid en betrouwbaarheid aan de hand van intra-run en inter-run variabiliteit.

De geteste MLPA-assay blijkt correct, robuust en betrouwbaar en levert zo nuttige informatie omtrent de prognose en kans op therapiefalen bij BCP-ALL. Op basis van deze gegevens wordt de test geïmplementeerd in de diagnostische work-up van deze patiënten.

Abstract in English

B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia (BCP-ALL) is a malignant hematological disorder, characterized by excessive proliferation of the B-lymphocyte precursor cells . It has recently been demonstrated that various submicroscopic DNA copy-number variations (CNV's) play an important role in the prognosis of patients with BCP-ALL. Therefore, the Centre for Human Genetics aims to find a new diagnostic test for detecting these variations.

The MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification) assay is a reliable and robust technique that can detect variations in multiple targets at the same time. In this master thesis, the SALSA MLPA probemix P335-B1 ALL-IKZF1 from MRC Holland is tested to identify CNV's in BCP-ALL. This assay is designed to pick-up variations in *IKZF1*, *CDKN2A/B*, *PAX5*, *ETV6*, *BTG1*, *RBI* and genes of the *PARI* region (*CRLF2*, *CSF2RA*, *IL3RA*). After optimisation, the assay is thoroughly validated by checking the accuracy, robustness and reliability using inter- and intra-run variability.

The tested MLPA assay robustly generates accurate results and thus provides useful information about the prognosis and the risk of treatment failure in BCP-ALL. Based on these data, the test can implemented in the diagnostic work-up of these patients.

1 Inleiding

1.1 Situering

Tijdens mijn masterjaar industriële wetenschappen optie biochemie aan de faculteit industriële ingenieurswetenschappen campus Diepenbeek werd mij de mogelijkheid geboden om mijn masterproef uit te voeren bij het Centrum Menselijke Erfelijkheid in UZ Leuven (CME).

Het opzet van deze masterproef is het op punt stellen van een nieuwe test voor de diagnose van BCP-ALL (B-cel precursor acute lymfoblastische leukemie). ALL is een kwaadaardige aandoening van de lymfoïde voorlopercellen, die zowel voorkomt bij kinderen als bij volwassenen. In driekwart van de gevallen gaat het om B-cel precursor ALL waarbij de voorlopers van de B-lymfocyten overmatig prolifereren. Deze voorlopercellen hebben niet meer het vermogen om te differentiëren tot rijpe lymfocyten waardoor er grote aantallen lymfoblasten in het bloed ontstaan. De ziekte heeft een hoge prevalentie bij 2- tot 5-jarigen. Hoewel het de meest voorkomende kanker is bij kinderen, geneest meer dan 80 %. Het gemiddelde overlevingspercentage bij volwassenen is slechts 45 %. [1], [2], [3]

ALL is een heterogene ziekte die gekenmerkt wordt door een grote verscheidenheid aan chromosomale afwijkingen. Deze afwijkingen zijn meestal al jaren voor het ontstaan van de leukemie aanwezig, wat er op wijst dat bijkomende afwijkingen nodig zijn om de leukemie te induceren. [4]

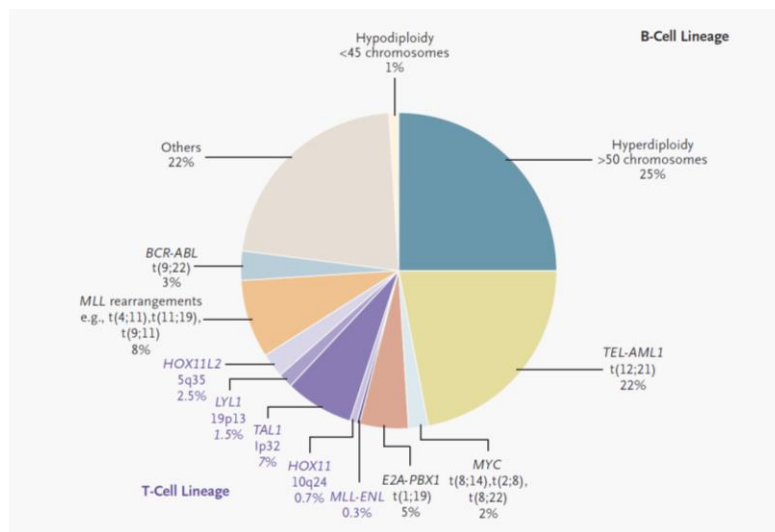
Door het gebruik van hoge resolutie genoombrede analyses werden verschillende nieuwe afwijkingen ontdekt die niet eerder in verband gebracht zijn met ALL. Het gaat over afwijkingen (puntmutaties, deleties, amplificaties en structurele herschikkingen) in genen die betrokken zijn bij de regulatie van de lymfoïde ontwikkeling en differentiatie. Deze nieuwe inzichten hebben geleid tot de differentiatie in verschillende ALL-subtypes op basis van structurele herschikkingen, submicroscopische DNA copy-number afwijkingen en verschillende mutaties. De identificatie van de verschillende chromosomale afwijkingen is niet enkel van belang voor het stellen van de diagnose maar ook voor het inschatten van de prognose en de kans op therapiefalen. Aan de hand van het subtype wordt een risicostratificatie voor de behandeling uitgevoerd. Deze risicostratificatie bepaalt op basis van de kans op therapiefalen welke behandelingsintensiteit nodig is. Daarnaast laat de indeling in verschillende subtypes de toepassing van meer doelgerichte behandelingen toe. [3], [5]

1.2 Probleemstelling

Op dit moment worden in het CME voor de diagnose en follow-up van BCP-ALL naast karyotypering verschillende moleculaire testen uitgevoerd.

Met behulp van een kwantitatieve real-time PCR (RQ-PCR) worden de fusietranscripten van vier verschillende translocaties opgespoord die in BCP-ALL worden teruggevonden. Het gaat hier over t(9;22) (BCR-ABL1), t(1;19) (TCF3-PBX1), t(12;21) (ETV6-RUNX1) en t(4;11) (MLL-AF4). Door deze (en andere) chromosomale translocaties worden de regulatoren of coderende regio's van verschillende transcriptiefactoren die een rol spelen in de bloedaanmaak herschikt. Het afwijkende genproduct kan dan interfereren met de normale groei, differentiatie

en overleving van de voorlopercellen. Zoals te zien is in onderstaande figuur omvatten deze translocaties naast aneuploidie de grootste groep chromosomale afwijkingen in BCP-ALL. [6]



Figuur 1: Frequentie van de chromosomale afwijkingen bij een populatie van kinderen met BCP-ALL [6]

Daarnaast wordt onderzoek gevoerd naar de Igκ- en IgH-genherschikkingen. Dit gebeurt met behulp van een PCR gevolgd door fragmentanalyse. Tijdens de vroege differentiatie van de B-cellen vinden verschillende herschikkingen plaats in de V- (variabele), D- (diversity) en J- (joining) genen in de immunoglobulinegenloci. Deze herschikkingen liggen aan de basis van de grote diversiteit in immunoglobulinen. In het geval van BCP-ALL worden hoofdzakelijk herschikkingen van het Igκ-gen teruggevonden. De reden hiervoor is dat de recombinatie van Igκ begint in de precursor B-cellen. Omdat er bij één derde van de patiënten met BCP-ALL ook TCR herschikkingen voorkomen, worden in de diagnostische work-up ook T-cel receptor herschikkingen geanalyseerd. Dit gebeurt eveneens met PCR gevolgd door fragmentanalyse. [7], [8]

Door de nieuwe inzichten omtrent de rol van de submicroscopische DNA copy-number afwijkingen in BCP-ALL is het nodig dat het CME een nieuwe test in gebruik neemt om deze afwijkingen op te sporen. De MLPA- (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplificatie) assay is een geschikte techniek voor de opsporing van de belangrijkste copy-number afwijkingen die voorkomen bij BCP-ALL. Met deze bijkomende informatie kan er een veel betere inschatting gemaakt worden over de prognose en risicostratificatie. Hierdoor kan de arts een betere keuze maken voor de behandeling, wat de kans op herval doet dalen. [3]

1.3 Doelstellingen

Het hoofddoel van deze masterproef is het uittesten van een MLPA-assay om de moleculaire diagnostische work-up van BCP-ALL te verbeteren.

Eerst en vooral wordt bekeken wat de meerwaarde is om de MLPA-assay te gebruiken als diagnostische test. Hierbij wordt nagegaan wat de voor- en nadelen zijn van deze test.

Ten tweede wordt gecontroleerd of het bestaande MLPA protocol nog geoptimaliseerd moet worden. Als vertrekpunt voor de uitvoering van de assay wordt het constitutionele protocol

gebruikt. In het CME wordt deze techniek namelijk al jaren gebruikt bij de moleculaire diagnostiek van aangeboren aandoeningen voor o.a. borstkanker en colonkanker.

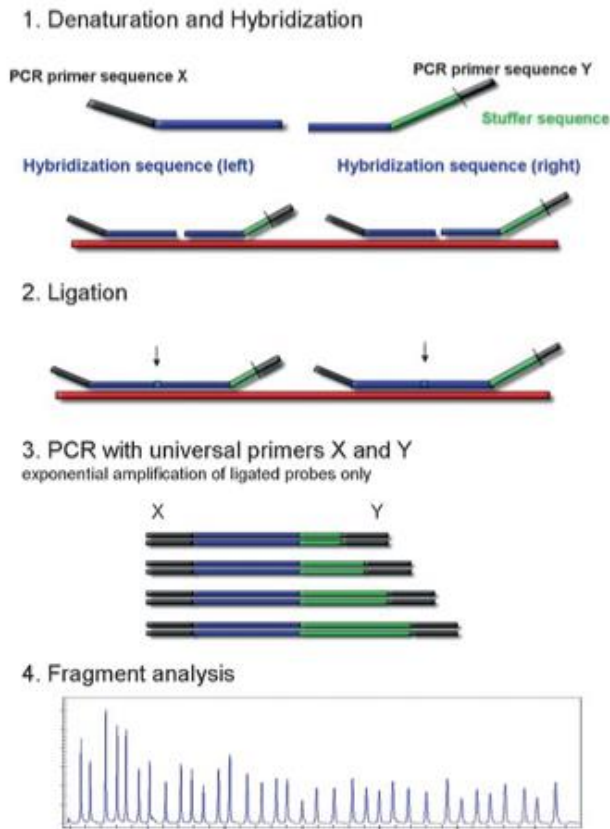
Vervolgens wordt een MLPA-kit uitgetest op een reeks BCP-ALL-patiënten en negatieve controles. Er wordt gekeken of er afwijkingen aanwezig zijn en wat de meerwaarde is om deze test uit te voeren als routinetest in de diagnostiek.

Tot slot vindt na de optimalisatie, de validatie van de MLPA-kit plaats. Een aandachtspunt hierbij is dat de gebruikte MLPA-kit niet CE-gelabeld is. Vermits het labo voor moleculaire diagnostiek van kwaadaardige aandoeningen een geaccrediteerd laboratorium is, is het van groot belang dat de kit aan een grondige validatie onderworpen wordt. Na een geslaagde validatie kan de implementatie in het laboratorium plaatsvinden.

1.4 Materiaal & methode

De MLPA-assay staat bekend als een robuuste techniek voor de detectie van verschillende copy-number afwijkingen met één enkele reactie. Het is een snelle multiplex amplificatie gebaseerd op PCR, waarbij met één enkele test 40 tot 50 verschillende targetsequenties gekwantificeerd kunnen worden. Het is zelfs mogelijk om op basis van één enkele nucleotide een onderscheid te maken tussen de verschillende sequenties. Voor de detectie van copy-number afwijkingen bij BCP-ALL zijn er verschillende commerciële kits beschikbaar bij MRC Holland. Onze keuze is uitgegaan naar de SALSA MLPA probemix P335-B1 ALL-IKZF1. De probemix is ontwikkeld om copy-number afwijkingen op te sporen die frequent voorkomen bij BCP-ALL en gerelateerd zijn met een slechte prognose. De genen waar de copy-number afwijkingen in opgespoord worden zijn *IKZF1*, *CDKN2A/B*, *PAX5*, *EBF1*, *ETV6*, *BTG1*, *RBI* en genen van de *PAR1*-regio (*CRLF2*, *CSF2RA*, *IL3RA*). [9], [10]

Van het begin tot het einde verloopt het protocol van de MLPA-assay in één tube (one-tube protocol). Het protocol van de MLPA-assay (zie figuur 2) kan onderverdeeld worden in drie stappen. De eerste stap omvat de denaturatie van het DNA en de hybridisatie van de MLPA-probes aan de complementaire doelwitsequentie. Elke MLPA-probe bestaat uit twee oligonucleotide probes die naast elkaar moeten hybridiseren om een succesvolle ligatie te verkrijgen. In de tweede stap worden de twee naast elkaar liggende gehybridiseerde probes geligeerd tot één enkele MLPA-probe. Het zijn dan deze geligeerde probes die geamplificeerd worden gedurende de derde stap waarin een PCR-reactie plaatsvindt met fluorescerende gelabelde primers. In tegenstelling tot de standaard multiplex PCR is maar één enkel PCR-primerpaar nodig. De fragmenten gevormd tijdens de PCR worden dan gescheiden volgens grootte met capillaire elektroforese. De hoeveelheid fragmenten die gevormd werden tijdens de PCR-reactie is afhankelijk van de hoeveelheid targetsequentie die aanwezig was in het DNA-staal. Tijdens de data-analyse gebeurt de kwantificatie van de verschillende fragmenten. De analyse van de resultaten gebeurt met behulp van de Genemarker software. De resultaten van de patiënten worden steeds vergeleken met een negatieve controle. Als negatieve controle wordt een DNA-staal gebruikt met een normaal copy-number voor de betrokken genen. Voor elke MLPA-probe wordt nagegaan of er een verschil is in piekoppervlakte tussen de negatieve controle en de patiënt. [10], [11]



Figuur 2: Principe van de MLPA-assay [11]

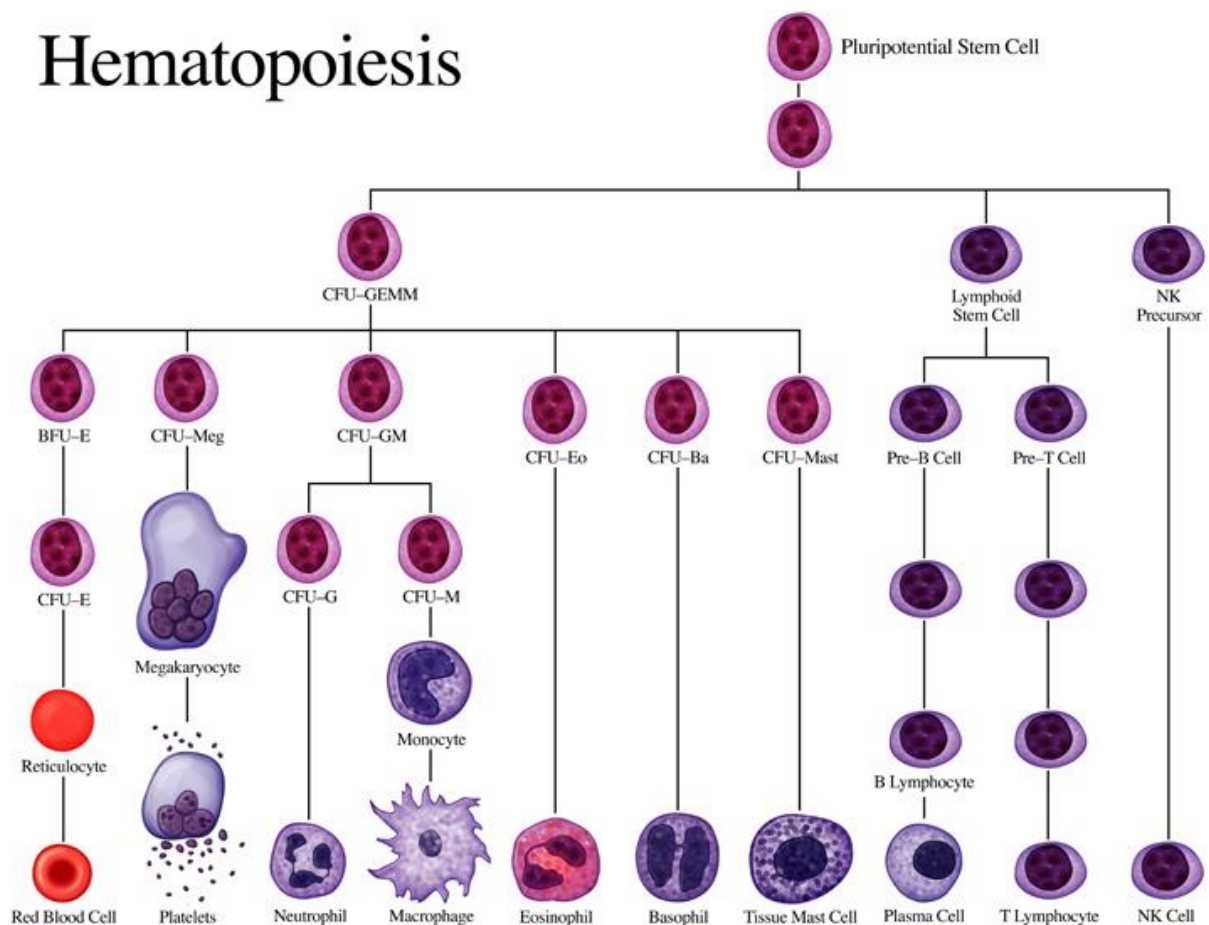
Nadat de literatuurstudie het belang van de opsporing van CNA's bij de diagnostiek van BCP-ALL heeft aangetoond wordt de MLPA-assay aan een optimalisatie en validatie onderworpen. Voor de MLPA-assay wordt gebruik gemaakt van DNA-stalen van patiënten geëxtraheerd uit bloed of beenmerg. Tijdens de optimalisatie wordt gezocht naar een geschikt protocol en analysemethode voor deze probemix. Daarnaast wordt de bruikbaarheid van verschillende patiënten en DLD1-celijn uitgetest als referentiestaal. Hiervoor worden patiënten gebruikt zonder afwijkingen in de onderzochte genregio's. Vervolgens wordt de validatie van de MLPA-assay uitgevoerd door de juistheid, robuustheid en betrouwbaarheid aan de hand van een inter-run en intra-run variatie na te gaan.

2 Literatuurstudie

2.1 Leukemie

2.1.1 Inleiding

De hematopoïese of bloedcelvorming begint in het beenmerg en staat in voor de aanmaak van witte bloedcellen, rode bloedcellen en bloedplaatjes. Alle bloedcellen worden gevormd uit pluripotente hematopoïetische stamcellen die zichzelf in stand kunnen houden door ongelimiteerde celdeling en daarnaast kunnen differentiëren tot de verschillende soorten rijpe bloedcellen. In de onderstaande figuur wordt een schematisch overzicht gegeven van de hematopoïese. [12]



Figuur 3: De hematopoïese [13]

Kanker ontstaat doordat een lichaamseigen cel ongecontroleerd begint te delen en zo aanleiding geeft tot een groep van identieke cellen. Leukemie is een vorm van kanker die gekenmerkt wordt door een ongecontroleerde groei van witte bloedcellen (WBC) die begint in het beenmerg en zich van daaruit verspreidt naar het bloed, de lymfoïde organen, lever en milt. Een kwaadaardige kanker is een kanker waarbij de kankercellen zich via het bloed uitspreiden over het lichaam. Hierdoor is leukemie per definitie kwaadaardig hoewel het verloop van een leukemie indolent tot zeer agressief kan zijn. [1]

De WBC worden onderverdeeld in drie groepen namelijk granulocyten, monocyt en lymfocyten. De granulocyten en monocyt zijn afkomstig van een gemeenschappelijke

myeloïde voorlopercel en behoren zo tot de myeloïde lijn. De monocyten vertonen in tegenstelling tot de granulocyten geen korrels in hun cytoplasma. De granulocyten worden op basis van de kleur van de korrels verder onderverdeeld in neutrofiele, eosinofiele en basofiele granulocyten. De derde groep WBC zijn de lymfocyten. Zij worden gevormd uit een lymfatische voorlopercel en behoren dus tot de lymfoïde lijn. In de lymfoïde lijn worden drie celtypes onderscheiden: natural killer-cellen en T- en B-lymfocyten. [12]

Leukemie ontstaat doordat de voorlopercellen van de WBC tijdens de celdelingen fouten in het DNA verwerven. Door deze fouten verandert de voorlopercel in een kwaadaardige kankercel, die overmatig gaat prolifereren en een verstoorde differentiatie vertoont. Dit leidt tot een toename in het aantal blasten in het beenmerg. Een normale blast differentieert verder tot een rijpe bloedcel en migreert naar de bloedbaan. Leukemische blasten stapelen op in het beenmerg wat zorgt voor een vertraging van de bloedaanmaak en een tekort aan RBC, WBC en bloedplaatjes. De respectievelijke gevolgen hiervan zijn het verminderde transport van zuurstof en voedingsstoffen, hogere gevoeligheid voor infecties en verstoring van de bloedstolling. Na verloop van tijd gaan de opgehoopte leukemische blasten zich begeven naar de bloedbaan en andere organen. [2]

2.1.2 Genetische afwijkingen

Gedurende de obligate replicatie van het DNA tijdens de celdeling maar ook onder invloed van endogene en exogene mutagenen ontstaan er afwijkingen (=mutaties) in het DNA. De verschillende soorten afwijkingen zijn structurele chromosomale afwijkingen (translocaties) die de expressie van een gen beïnvloeden of zorgen voor de vorming van een hybride fusiegen, numerieke chromosoomafwijkingen (hyper- of hypodiploidie) en mutaties zoals puntmutaties, inserties, deleties en amplificaties. [14]

Wanneer deze genetische afwijkingen plaats vinden in genen die instaan voor de proliferatie en differentiatie van de voorlopercellen, dan wordt de groei en maturatie van de cellen verstoord. Omdat er meerdere mutaties nodig zijn om een lichaamseigen cel te transformeren tot een leukemische cel, komt leukemie voornamelijk voor bij oudere personen. Leukemie kan ook voorkomen bij kinderen maar dan wordt er al een eerste genetische afwijking verworven in de uterus. [15] Alle cellen die uit een leukemiecél ontstaan hebben dezelfde DNA-afwijkingen. Een dergelijke populatie van identieke leukemische cellen wordt een kloon genoemd. [16], [17]

Bij de genen die instaan voor de proliferatie wordt een onderscheid gemaakt tussen oncogenen en tumorsuppressorgenen. Oncogenen coderen voor eiwitten die de groei van de cellen stimuleren. Tumorsuppressorgenen daarentegen zijn genen waarvan het product de groei van de cellen afremt. Op moleculair niveau is het grote verschil dat bij een oncogen een afwijking in één van beide allelen voldoende is om de eiwitfunctie te verstoren terwijl bij een tumorsuppressorgen beide allelen aangetast moeten zijn. Het gevolg van mutaties in deze genen is een ongecontroleerde proliferatie van de cel door een toegenomen groeistimulatie (oncogen) of een afgenomen groei-inhibitie (tumorsuppressorgen). [14]

2.1.3 Classificatie

In eerste instantie wordt een onderscheid gemaakt tussen acute en chronische leukemie. Bij een acute leukemie rijpen de leukemische cellen niet uit. Dit zorgt voor een ophoping van immature blasten in het beenmerg en een tekort aan rijpe witte bloedcellen in het bloed. Bij een chronische leukemie daarentegen behouden kwaadaardige cellen hun vermogen om te differentiëren tot mature bloedcellen. Een acuut leukemisch ziekteproces verloopt veel sneller dan een chronisch. In onderstaande tabel wordt een kort overzicht gegeven van het onderscheid tussen acute en chronische leukemie. [18]

Tabel 1: Verschil tussen acute en chronische leukemie [19]

	Acute leukemie	Chronische leukemie
Leeftijd	Alle leeftijden (ALL vnl. bij kinderen, AML vnl. bij volwassenen)	Volwassenen
Begin	Plots	Sluipend
Overleving (zonder behandeling)	< 6 maanden	2-6 jaar
Leukemische cellen	Immatuur	Matuur
Anemie	Mild tot ernstig	Mild
Trombopenie	Mild tot ernstig	Mild
WBC	Variabel	Verhoogd
Organomegalie	Mild	Prominent

Daarnaast wordt een onderscheid gemaakt op basis van het type witte bloedcel waaruit de leukemie ontstaat: als het gaat om een voorlopercel uit de myeloïde lijn spreekt men van een myeloïde leukemie; als het gaat om een cel uit de lymfoïde lijn spreekt men van lymfoïde leukemie. [20]

Op basis hiervan worden er vier grote leukemische groepen onderscheiden:

- 1) Acute lymfoblastische leukemie (ALL),
- 2) Chronische lymfoïde leukemie (CLL),
- 3) Acute myeloïde leukemie (AML),
- 4) Chronische myeloïde leukemie (CML).

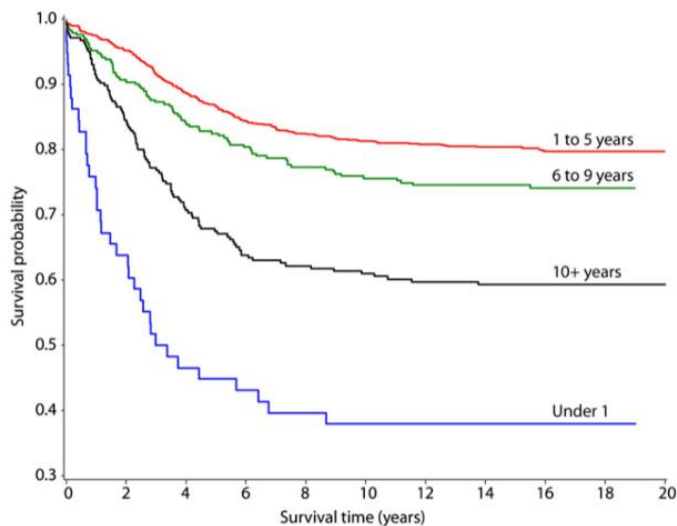
Deze worden elk nog verder onderverdeeld maar dit valt buiten de scope van dit werk. In deze masterproef wordt er enkel ingegaan op de acute lymfoblastische leukemiën (ALL), meer specifiek op B-cel precursor ALL.

2.2 Acute lymfoblastische leukemie

2.2.1 Inleiding

Acute lymfoblastische leukemie (ALL) is een kwaadaardige neoplasie van lymfocyten die net als alle andere leukemiën ontstaat uit één enkele cel en die gekenmerkt wordt door de accumulatie van immature lymfoïde cellen (lymfoblasten). Dit resulteert in de onderdrukking van de normale bloedaanmaak en de infiltratie van leukemische cellen in verschillende extramedullaire plaatsen. [21] De ALL cellen worden gezien als een kwaadaardige populatie van de normale voorlopercellen van de lymfoïde lijn. [15]

ALL is de meest voorkomende kanker bij kinderen maar bij adolescenten en volwassenen is het eerder zeldzaam. De laatste jaren is er een significante vooruitgang geboekt in de behandeling van ALL met meer doelgerichte therapieën en een risicostratificatie die de behandeling voorafgaat. Bij kinderen steeg zo de algemene overlevingsgraad tot 85 % hoewel de kans op overleving aanzienlijk afneemt bij toenemende leeftijd, met uitzondering van kinderen onder 1 jaar die een slechte prognose hebben (zie figuur 4). Ook de overleving bij volwassenen is verbeterd, maar met een lange termijn overleving van 45 % is deze nog beduidend lager dan bij kinderen. [22]



Figuur 4: Kaplan-Meier analyse van de kans op overleving bij kinderen met ALL volgens de leeftijd waarop de diagnose werd gesteld [23]

De symptomen worden veroorzaakt door de onderdrukking van de normale bloedaanmaak wat leidt tot anemie (tekort aan RBC), neutropenie (tekort aan neutrofielen) en trombocytopenie (tekort aan bloedplaatjes). Typische symptomen zijn vermoeidheid, gewichtsverlies, nachtzweeten, bleekheid, kortademigheid, botpijn, koorts en bloedingen. Daarnaast infiltreren de leukemische blasten in verschillende extramedullaire organen (lymfeklieren, milt, lever) wat aanleiding geeft tot lymfadenopathie, hepatomegalie of splenomegalie. In een klein aantal gevallen wordt ook het centraal zenuwstelsel aangetast met hoofdpijn, lethargie en craniale zenuwstoornissen tot gevolg. Jonge kinderen hebben het meestal moeilijk om te stappen door de bot- en gewrichtspijn veroorzaakt door de infiltratie van de lymfoblasten in de botten en gewrichten en de expansie van het beenmerg. [24], [25]

Er wordt een onderscheid gemaakt tussen ALL van T-cellen en ALL van B-cellen. De prevalentie van B-cel ALL ligt veel hoger dan T-cel ALL. De prevalentie van B-cel ALL is bij kinderen 85 % tegenover 75 % bij volwassenen. In het vervolg van dit werk wordt er enkel dieper ingegaan op B-cel ALL. [3]

2.2.2 Risicofactoren

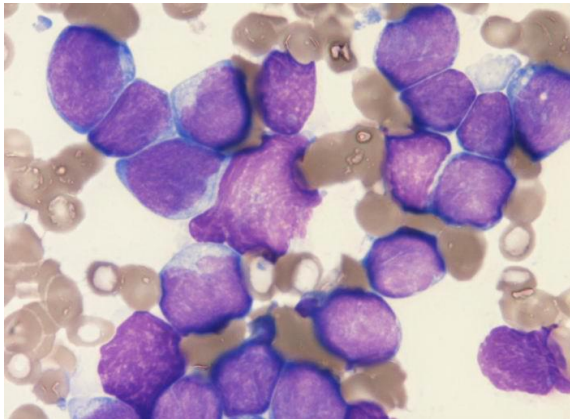
De precieze oorzaken die leiden tot de ontwikkeling van ALL zijn, net als voor de meerderheid van de leukemiën, slecht gekend. In minder dan 5 % van de gevallen is er een associatie met een erfelijk genetisch syndroom (o.a. het syndroom van Down en Bloom's syndroom) of met

blootstelling aan ioniserende straling of chemotherapeutica. Daarnaast zijn er tal van oorzaken die mogelijk een verhoogd risico op ALL tot gevolg hebben zoals de blootstelling aan pesticiden, solventen of magnetisch velden, hoog geboortegewicht, de voeding van de moeder, prenataal vitaminegebruik en het alcohol en tabak gebruik van de moeder. [2]

2.2.3 Diagnose en classificatie

Morfologie & cytochemie

De morfologische herkenning van de lymfoblasten in bloed en beenmerg is een belangrijk kenmerk om een onderscheid te maken tussen AML en ALL. Een lymfoblast heeft een diameter van 10 – 20 µm met een ronde-ovale kern die gekenmerkt is door een fijn chromatine patroon en 1-2 nucleoli. De N/C ratio is gelegen tussen 7:1 en 5:1. Dit wil zeggen dat bij een lymfoblast de nucleus 7 à 5 maal groter is dan het cytoplasma van de cel. Het cytoplasma heeft een smalle rand en is licht tot sterk basofiel in afwezigheid van korrels. In sommige gevallen zijn er verschillende vacuolen in het cytoplasma terug te vinden. Een typisch microscopisch bloedbeeld van ALL is hieronder weergegeven. [19]



Figuur 5: Typische bloedbeeld van ALL [19]

De French American British (FAB) classificatie maakt op basis van de uiterlijke kenmerken van de lymfoblasten een onderscheid tussen drie types B-ALL.

Tabel 2: FAB-classificatie van acute lymfoblastische leukemie [19]

FAB-classificatie	Kenmerken	Prevalentie
L1	Kleine cellen met regelmatige nucleaire vorm, homogeen chromatine, kleine of afwezige kern en schaars cytoplasma	25-30 % bij volwassenen met ALL 85 % bij kinderen met ALL
L2	Cellen met een grote en/of gevarieerde vorm met onregelmatige nucleaire vorm, heterogeen chromatine en een grote nucleolus	70 % bij volwassenen met ALL 14 % bij kinderen met ALL

L3	Grote cellen met vacuolen in het cytoplasma en liggend over de kern	Zeldzaam type (in 1-2 % van de gevallen)
----	---	--

Deze classificatie wordt momenteel nog maar weinig gebruikt en is vervangen door de WHO (World Health Organization)-classificatie. De redenen hiervoor zijn dat type 1 & 2 moeilijk te onderscheiden zijn van elkaar en dat ze niet gelinkt kunnen worden aan klinische symptomen, prognoses en genetische afwijkingen. De WHO-classificatie daarentegen is gebaseerd op morfologische, immunologische, cytogenetische en moleculaire analyses. Ze heeft dan ook geleid tot betere inzichten in de prognose en het therapeutische beleid van B-ALL. In onderstaande tabel wordt de WHO-classificatie van B-ALL weergegeven. [19]

Tabel 3: WHO-classificatie van B-cel acute lymfoblastische leukemie [26]

B lymphoblastic leukemia/lymphoma
B lymphoblastic leukemia/lymphoma, NOS
B lymphoblastic leukemia/lymphoma with recurrent genetic abnormalities
B lymphoblastic leukemia/lymphoma with t(9;22)(q34;q11.2);BCR-ABL 1
B lymphoblastic leukemia/lymphoma with t(v;11q23);MLL rearranged
B lymphoblastic leukemia/lymphoma with t(12;21)(p13;q22) TEL-AML1 (ETV6-RUNX1)
B lymphoblastic leukemia/lymphoma with hyperdiploidy
B lymphoblastic leukemia/lymphoma with hypodiploidy
B lymphoblastic leukemia/lymphoma with t(5;14)(q31;q32) IL3-IGH
B lymphoblastic leukemia/lymphoma with t(1;19)(q23;p13.3);TCF3-PBX1

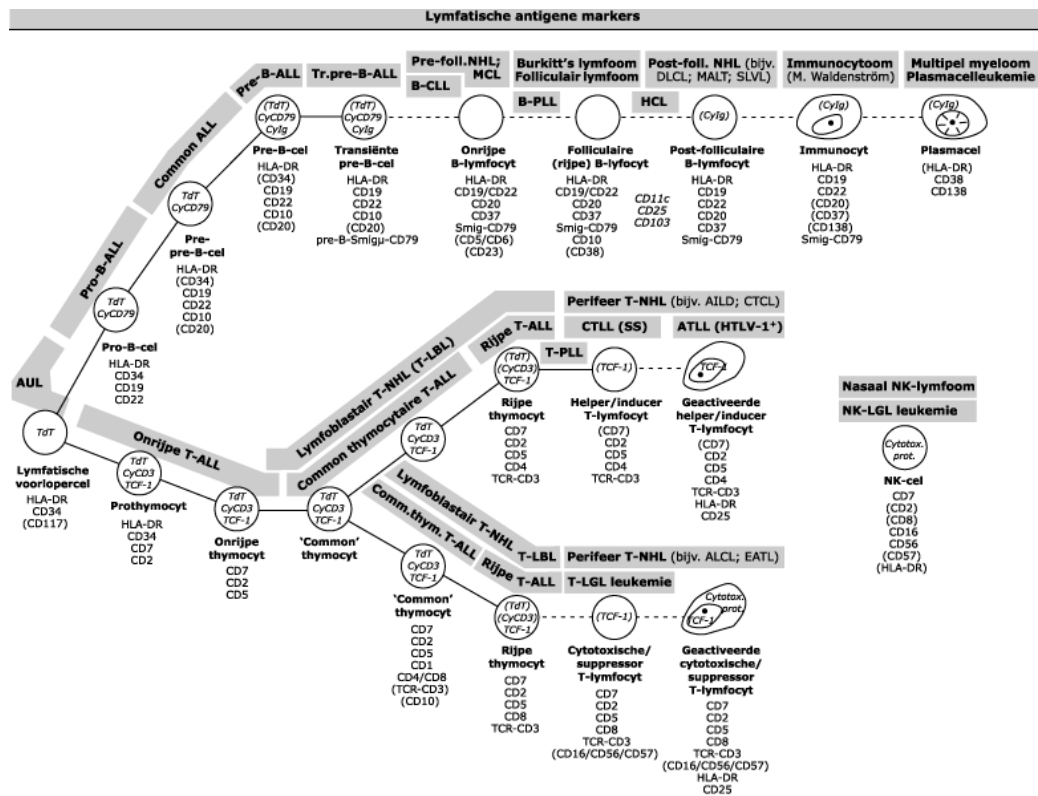
Voor de classificatie van leukemie spelen cytochemische kleuringen ook een rol. Cytochemische kleuringen zijn gebaseerd op de aanwezigheid van enzymen in de bloedcellen. Het principe is om met een substraat de aanwezigheid van specifieke enzymen aan te tonen m.b.v. een kleurreactie. Een veelgebruikte cytochemische kleuring is de myeloperoxidase (POX) kleuring. POX is een enzym dat enkel voorkomt in de cellen van de granulocyttaire en monocyttaire lijn. De cellen van de lymfoïde lijn zijn negatief voor POX. [25]

Immuunfenotypering

Bij immuunfenotypering worden bepaalde antigenstructuren op het celmembraan van de leukemische cel opgespoord met specifieke monoclonale antistoffen. De verschillende antistoffen worden ingedeeld in clusters volgens verwantschap: Cluster of Differentiation (CD). Elk cluster krijgt een volgnummer toegewezen. Het antigen dat reageert met een bepaalde antistof wordt het CD-antigen genoemd. De CD-antigenen kunnen geassocieerd worden met een bepaald celtipe, een differentiatiestadium of een functionele toestand. [12]

Op basis van de CD-antigenen kan er makkelijk een onderscheid gemaakt worden tussen AML en ALL. Specifieke antistoffen voor de myeloïde lijn zijn CD13, CD33 en cytoplasmatisch myeloperoxidase. Bij ALL kan er dan verder onderscheid gemaakt worden tussen de T- en B-cel lijn. Voor T-cellen zijn CD2, CD3 en CD7 specifieke merkers terwijl CD19, CD22 en CD79a specifiek zijn voor B-cellen.

In de onderstaande figuur wordt de differentiatie van de lymfoïde lijn tot rijpe lymfocyten samen met de aanwezige merkers weergegeven.



Figuur 6: Differentiatie van de lymfoïde lijn met de antigene markers [27]

De maturatie van de hematopoietische stamcel tot rijpe B-lymfocyten is onderverdeeld in verschillende stadia die gekenmerkt worden door de expressie van oppervlakteantigenen, het expressiepatroon van cellulair Ig proteïnen en de Ig genherschikkingen. In de onderstaande tabel wordt beknopt de immuunfenotypische classificatie van B-ALL weergegeven. Immuunfenotypering is zowel van belang bij het stellen van de diagnose als bij het opsporen van recidief na behandeling. [25], [28]

Tabel 4: Subtypes van B-ALL [28]

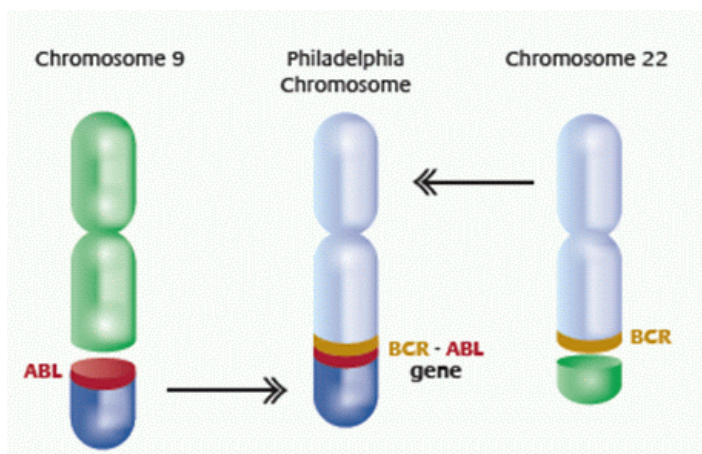
ALL	Subtype	CD19	CD22	cCD79a	CD10	cμ	Surface Ig
B-cell precursor	Pro-B	+	+	+	-	-	-
	Common B-ALL	+	+	+	+	-	-
	Pre-B	+	+	+	+/-	+	-
Mature B-cell (Burkitt's lymfoom)		+	+	+	+/-	+/-	+

Genetische analyse

Chromosoomafwijkingen zijn een algemeen kenmerk van acute lymfoblastische leukemie. Zowel afwijkingen in het aantal chromosomen als structurele afwijkingen zijn mogelijk. Deze afwijkingen spelen een belangrijke rol in de diagnose en behandeling van ALL. [12]

Bij afwijkingen in het aantal chromosomen komen er bepaalde chromosomen meer (hyperdiploidie) of minder (hypodiploidie) voor. Dit leidt tot te weinig of te veel genetische informatie. Vooral hyperdiploidie is een veelvoorkomende afwijking bij kinderen met B-ALL. Het opsporen van deze afwijkingen kan gebeuren m.b.v. cytogenetische technieken zoals karyotypering of fluorescente in situ hybridisatie (FISH). Bij karyotypering worden de cellen in mitose gebracht, de chromosomen vervolgens uitgespreid op een glaasje, gekleurd en microscopisch gefotografeerd. Elk chromosoom heeft een karakteristieke grootte, structuur en GC-bandenpatroon waardoor het mogelijk is om ze te rangschikken en afwijkingen in aantal en structuur vast te stellen. Met deze techniek wordt er enkel gekeken op het niveau van de chromosomen. De nadelen van deze techniek is dat hij zeer tijdrovend is en dat de resolutie slechts 5 Mb bedraagt. Bij FISH worden fluorescent gelabelde probes gebruikt die complementair zijn aan de regio van interesse. Bijgevolg is FISH een gevoeliger techniek dan karyotypering waarbij ook kleinere mutaties opgespoord kunnen worden. Onder een fluorescentiemicroscop worden dan de gebonden probes geanalyseerd. [25]

Daarnaast zijn er ook structurele chromosoomafwijkingen. Mogelijke afwijkingen zijn inversies, inserties, deleties, duplicaties en translocaties. Een inversie is een afwijking waarbij een stukje chromosoom wel op de juiste plaats zit maar 180° gedraaid werd en zo in de omgekeerde richting staat. Bij een insertie of een deletie wordt er een extra stukje DNA toegevoegd of verwijderd. Duplicaties zijn afwijkingen waarbij er een stukje chromosoom in de juiste oriëntatie verdubbeld wordt. Een reciproke translocatie ontstaat doordat er tijdens de celdeling breuken in het DNA optreden die foutief hersteld worden. Hierdoor worden twee stukken DNA van twee niet-homologe chromosomen met elkaar verwisseld wat de genen gelegen in deze chromosomale regio's beïnvloedt (zie figuur 7). [2]



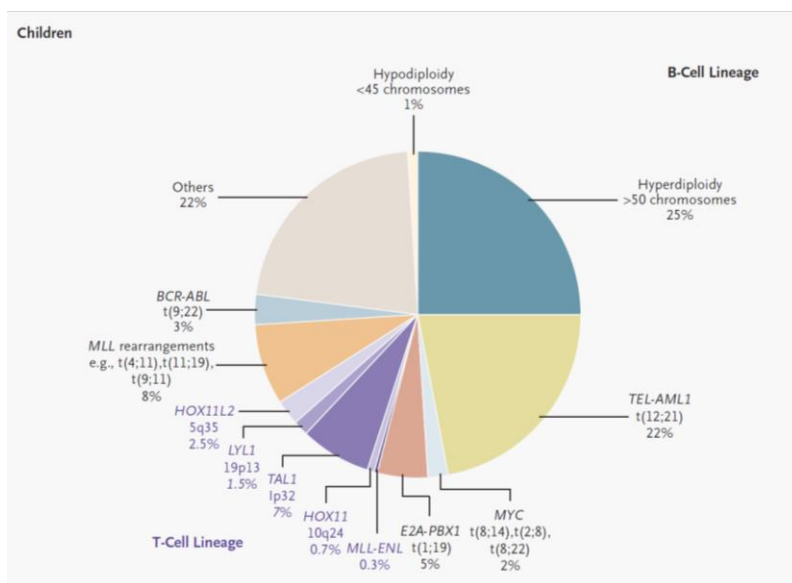
Figuur 7: Reciproke translocatie die voorkomt in B-ALL namelijk $t(9;22)$ [29]

Reciproke translocaties komen zeer frequent voor bij ALL en omvatten meestal genen die coderen voor transcriptiefactoren die een rol spelen bij de hematopoïese. Een transcriptiefactor is een eiwit dat de expressie van bepaalde genen beïnvloedt door binding aan de specifieke genpromotor. Afhankelijk van de soort factor (activator/repressor) wordt er gezorgd voor meer of minder transcriptie van dat gen. Een translocatie kan op twee manieren een transcriptiefactor beïnvloeden. Enerzijds kan de transcriptiefactor door een translocatie onder controle komen te staan van een enhancer element van een gen met een hoge transcriptie. Een andere manier is het ontstaan van een fusie tussen de transcriptiefactor en een ander gen waardoor een chimere transcriptiefactor met een andere functie ontstaat. [14]

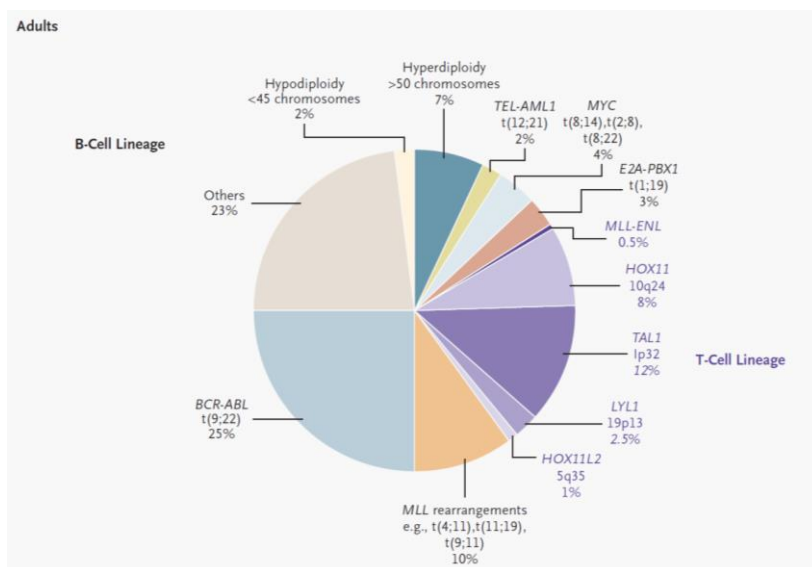
Met moleculaire technieken (o.a. real-time PCR) kunnen afwijkingen tot op het niveau van een individuele DNA base in beeld worden gebracht. Doordat kleine al dan niet structurele chromosomale veranderingen kunnen worden opgepikt is de gevoeligheid van deze technieken groter dan bij cytogenetische methoden.

In onderstaande figuren worden de meest voorkomende afwijkingen bij ALL weergegeven. Hierbij is duidelijk te zien dat de chromosoomafwijkingen sterk variëren met de leeftijd. Bij stijgende leeftijd is er een daling in prognostisch gunstige genetische afwijkingen (bv. hyperdiploidie) en een toename in prognostisch ongunstige afwijkingen (bv. BCR-ABL1 t(9;22)). Het overlevingspercentage bij volwassenen ligt dan ook lager dan bij kinderen. [3], [22]

De grote chromosoomafwijkingen worden vaak al jaren voor het ontstaan van de leukemie teruggevonden. Dit wijst erop dat bijkomende submicroscopisch DNA-afwijkingen nodig zijn om tezamen leukemie te veroorzaken. [22], [30]



Figuur 8: Incidentie van de verschillende chromosoomafwijkingen die voorkomen bij kinderen met ALL [6]



Figuur 9: Incidentie van de verschillende chromosoomafwijkingen die voorkomen bij volwassenen met ALL [6]

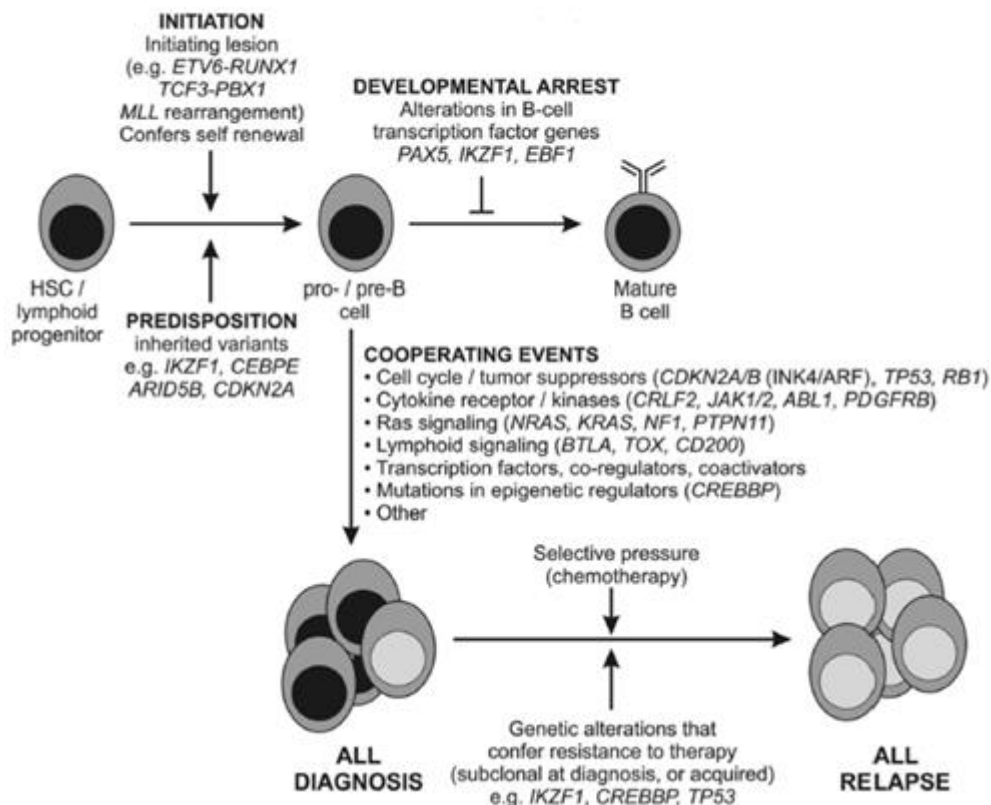
2.3 B-cel precursor acute lymfoblastische leukemie

2.3.1 Inleiding

B-cel precursor ALL (BCP-ALL) is het meest voorkomende type van ALL en treft vooral kinderen onder de 15 jaar. De laatste jaren is de overlevingsgraad van patiënten met BCP-ALL sterk toegenomen door de ontwikkeling van gerichte therapieën en de introductie van risicostratificatie waarbij de intensiteit van de behandeling wordt afgestemd op het risico op therapiefalen. De risicostratificatie voor de behandeling wordt gemaakt op basis van de leeftijd, het aantal witte bloedcellen, de cytogenetica en het antwoord op de behandeling. [2]

B-cel precursor ALL is een heterogene ziekte die gekenmerkt wordt door een brede waaier aan genetische afwijkingen zoals translocaties, DNA copy-number afwijkingen en mutaties. Bovendien zijn bepaalde genen betrokken in meerdere types van genetische veranderingen. [5], [21]

De meest voorkomende genetische afwijkingen in BCP-ALL zijn recurrente grote chromosoomafwijkingen. Daarnaast zijn ook submicroscopische DNA veranderingen die onder meer leiden tot copy-number afwijkingen frequent aanwezig. In onderstaand schema wordt de rol van deze genetische afwijkingen in het ontstaan van B-ALL weergegeven.

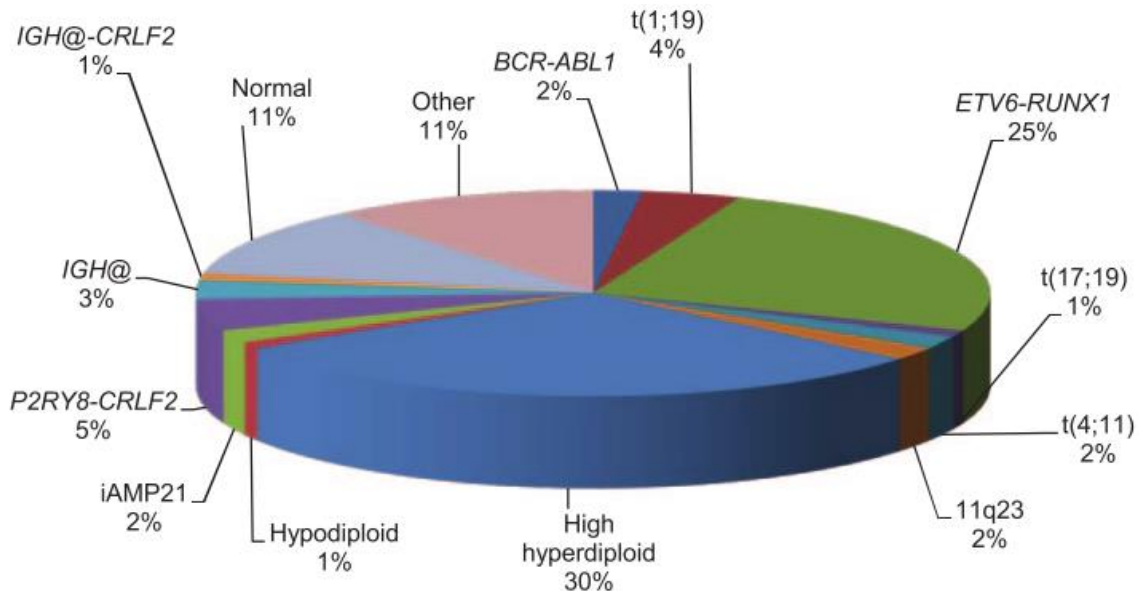


Figuur 10: Pathogenese van BCP-ALL [3]

2.3.2 Chromosoomafwijkingen

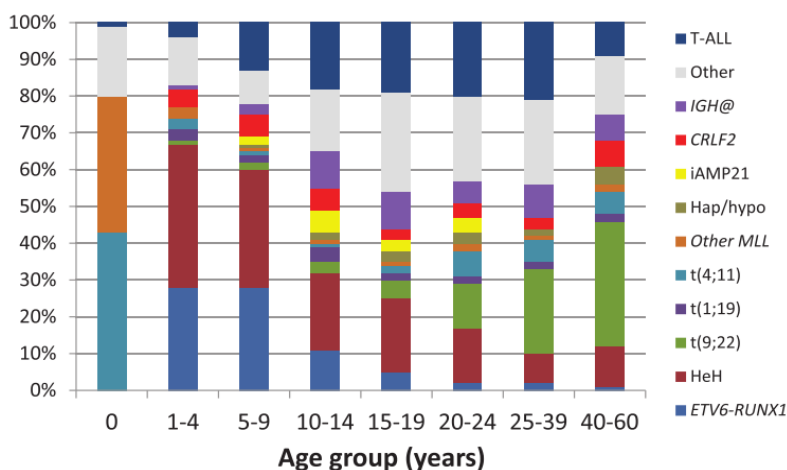
In 70 % van de kinderen en in 50 % van de volwassenen met BCP-ALL wordt een chromosoomafwijking gevonden die klinisch relevant is. [31]

Op basis van de aanwezige chromosoomafwijking worden de patiënten onderverdeeld in cytogenetische groepen. In onderstaande figuur wordt de prevalentie van de verschillende cytogenetische groepen bij kinderen met BCP-ALL weergegeven. [32]



Figuur 11: Weergave van de prevalentie van cytogenetische groepen die voorkomen bij kinderen met BCP-ALL [22]

In onderstaande figuur is te zien dat de prevalentie van de verschillende cytogenetische groepen sterk afhankelijk is van de leeftijd. Zo zal de prevalentie van t(9;22) toenemen bij stijgende leeftijd en de prevalentie van hoge hyperdiploidie en ETV6-RUNX1 dalen met stijgende leeftijd.



Figuur 12: Weergave van de variatie van cytogenetische groepen met de leeftijd [22]

In de volgende alinea's volgt een verdere toelichting van de negen meest voorkomende cytogenetische groepen.

Groep 1: hoge hyperdiploidie

Hoge hyperdiploidie is globaal de meest voorkomende chromosomale afwijking met een frequentie van 20-30 % bij kinderen en 10 % bij volwassenen. Bij deze groep wordt er met karyotypering of FISH een overmaat aan chromosomen (51-67 chromosomen) gedetecteerd. De meest voorkomende afwijkingen zijn trisomieën en tetrasomieën van chromosoom X, 4, 6, 8, 10, 14, 17, 18 en 21. Hyperdiploidie is meestal al aanwezig bij de geboorte, maar het duurt dan nog enkele jaren vooraleer de leukemie zich ontwikkelt onder invloed van bijkomende mutaties zoals amplificaties, microdeleties en puntmutaties. [33], [34]

Het pathologisch gevolg van een chromosomenexces is nog niet volledig begrepen, maar alles wijst erop dat doseringseffecten van genen gelegen op de extra chromosomen een belangrijke rol spelen. Patiënten met hyperdiploidie hebben een goede prognose. Slechts 20 % van de patiënten hervalt maar dit herval is wel geassocieerd met een slechte prognose. [35], [36]

Groep 2: hypodiploidie

De frequentie van hypodiploïde ALL is bij kinderen 1 % maar bij volwassenen stijgt de frequentie tot 30 %. Hypodiploïde ALL wordt gekenmerkt door het verlies van meerdere chromosomen wat opgespoord wordt met karyotypering of FISH. Er wordt een onderverdeling gemaakt in een bijna-haploïde groep met 24-31 chromosomen, een laag-hypodiploïde groep met 32-39 chromosomen en een hoog-hypodiploïde groep met 40-43 chromosomen. Het hypodiploïd genoom kan reduplicatie ondergaan waardoor een hyperdiploïd karyotype ontstaat. Dit wordt dan een gemaskeerde hypodiploïde BCP-ALL genoemd. De bijna-diploïde groep met 44-45 chromosomen hebben meestal dicentrische chromosomen of andere chromosomale herschikkingen (o.a. *ETV6-RUNX1*). Hypodiploidie heeft een extreem slechte prognose. De bijna-diploïde groep heeft een betere prognose in vergelijking met de hypodiploïde ALL. [37], [38], [39]

Groep 3: ETV6-RUNX1 (vroeger: TEL-AML1)

Het genetisch defect met de hoogste prevalentie bij kinderen is een translocatie tussen chromosoom 21q21 waar *ETV6* gelegen is en chromosoom 12p13 waar *RUNX1* gelegen is. Door deze translocatie ontstaat het fusiegen *ETV6-RUNX1* dat bij 25 % van de kinderen met BCP-ALL aanwezig is. Bij volwassenen is deze afwijking veel zeldzamer. Omdat dit een cytogenetisch cryptische translocatie is, voldoet karyotypering niet voor de opsporing van deze translocatie maar dient men PCR of FISH te gebruiken. [40]

Zowel *ETV6* en *RUNX1* zijn nodig voor de normale hematopoïese. Het *ETV6*-gen behoort tot de familie van de ETV-transcriptiefactoren die betrokken zijn bij de controle van de transcriptie tijdens de differentiatie en proliferatie van hematopoïetische cellen. *RUNX1* is ook een transcriptiefactor en een belangrijke component van het core binding factor complex (CBF) wat een centrale rol heeft in de normale hematopoïese. Door de fusie met *ETV6*, is de regulerende functie van *RUNX1* verstoord, en wordt *RUNX1* een transcriptionele repressor. Het bevordert de zelf-vernieuwing van de voorlopers van de B-cellen en verhindert de differentiatie tot rijpe B-cellen. [41]

In vergelijking met andere groepen komen er vaker submicroscopische genetische afwijkingen voor bij dit type van ALL. De meest voorkomende bijkomende afwijkingen zijn deleties van

transcriptiefactoren (o.a. *PAX5* en *EBF1*), en lymfoïde signaal moleculen (o.a. *BTLA* en *TOX*) en afwijkingen van de transcriptionele co-activators (o.a. *TBL1XR1*), de glucocorticoïd receptor *NR3C1* en het apoptose regulator gen *BTG1*. Deze groep heeft een 5-jaars ziektevrije overleving van +/- 83 % en wordt steeds geassocieerd met een goede prognose. [6], [42]

Groep 4: TCF3-PBX1

De translocatie t(1;19)(q23;p13) waarbij het *TCF3* (*E2A*) gen op chromosoom 19 fusioneert met het *PBX1* gen op chromosoom 1 heeft een prevalentie van 4-6 %. Deze afwijking komt vooral voor in pre-B-ALL en slechts sporadisch in pro-B-ALL of common-B-ALL. Deze translocatie kan opgespoord worden via karyotypering maar het wordt met een hogere gevoeligheid gedetecteerd m.b.v. FISH en PCR wat dan ook gebruikt wordt voor de follow-up.

Het ontstaan van het *TCF3-PBX1* fusiegen leidt tot de productie van een chimeer eiwit dat de normale hematopoïetische maturatie blokkeert. Het *TCF3* gen codeert voor de helix-loop-helix transcriptiefactor *E2A* die nodig is bij de B-celontwikkeling. Het fusie-eiwit bevat het transactivatiedomein van *TCF3* en het DNA-bindingsdomein van *PBX1*. [42]

Vroeger had deze groep een slechte prognose, maar door gebruik te maken van meer agressieve therapieën is de prognose aanzienlijk verbeterd. [43] Een variant is de translocatie t(17;19)(q22;p13) die leidt tot een *TCF3-HLF* fusiegen. Deze afwijking is eerder zeldzaam en wordt geassocieerd met een oudere leeftijd en een slechte prognose. Er treedt meestal al herval op tijdens de behandeling. [22]

Groep 5: BCR-ABL1

De t(9;22) is aanwezig bij meer dan 95 % van de patiënten met CML maar komt ook voor bij 20 – 30 % van de volwassenen met pre-B-ALL. Bij kinderen ligt de prevalentie een stuk lager. De opsporing kan gebeuren via karyotypering, FISH en PCR. Deze laatste 2 technieken zijn wel beduidend gevoeliger.

Het Philadelphia chromosoom ontstaat door een translocatie tussen chromosoom 9q34 en 22q11. Het resultaat is het *BCR-ABL1* fusiegen dat codeert voor een proteïne met een constitutieve tyrosine kinase activiteit dat verschillende signaalcascades beïnvloedt die bijdragen tot de tumorgroei en proliferatie. Er zijn verschillende fusietypes (o.a. p210, p190 en p230) mogelijk afhankelijk van de positie van de breukpunten in *BCR* en *ABL1*.

Vroeger was deze groep geassocieerd met een zeer slechte prognose maar door het gebruik van tyrosine kinase inhibitoren is de prognose van deze patiënten sterk verbeterd. Een veelvoorkomende bijkomende genetische afwijking zijn deleties in *IKZF1*. In aanwezigheid van *IKZF1* deleties is er een significant hoger risico op herval (69.1 %) dan in afwezigheid van *IKZF1* deleties (40,4 %). [44], [45]

Groep 6: MLL-herschikkingen

Het *MLL* (Mixed-lineage leukemia) gen is gelegen op chromosoom 11q23 en is regelmatig herschikt in BCP-ALL. Deze herschikkingen hebben een prevalentie van 70 % bij kinderen onder de leeftijd van 1 jaar. Bij andere leeftijdsgroepen zijn ze veel zeldzamer. De opsporing van *MLL*-herschikkingen kan gebeuren via karyotypering, FISH en PCR. [6]

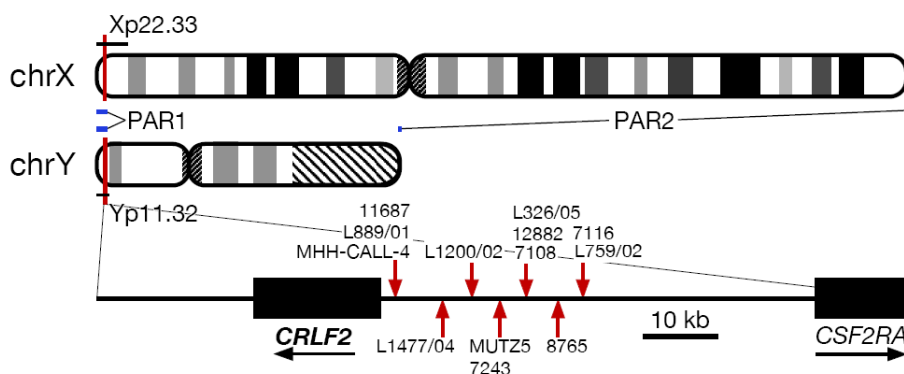
MLL activeert de *HOX* transcriptie en heeft zo een regulerende functie. Op dit moment zijn er 80 verschillende *MLL* fusiepartners gevonden. In 50 % van de gevallen gaat het over een translocatie t(4;11)(q21;q23)/MLL-AFF1 (AF4). Herschikkingen van *MLL* zorgen voor een overexpressie van de klasse I *HOX* genen (*HOXA5*, -A7, -A9 en *MEIS1*). In tegenstelling tot andere cytogenetische groepen zijn er weinig bijkomende genetische afwijkingen bij deze patiënten wat de meer agressieve aard van de *MLL*-herschikkingen aanduidt. *MLL*-herschikkingen zijn steeds geassocieerd met een slechte prognose. [46]

Groep 7: IGH@ translocaties en *CRLF2*-herschikkingen

Door translocaties ter hoogte van de IGH@ locus, kunnen genen die coderen voor transcriptiefactoren en cytokine receptoren naast de IGH@ enhancer elementen terecht komen en hierdoor beïnvloed worden. In BCP-ALL zijn er verschillende partners beschreven waaronder *CRLF2* (zie verder), CCAAT enhancer-binding proteïne familie van transcriptiefactoren, de DNA-bindende eiwit inhibitor ID4, de cytokine receptor voor erythropoetine en de micro RNAiR-125b. De hoogste prevalentie is te vinden bij jonge kinderen en adolescenten. [22], [42]

In 5-6 % van de BCP-ALL-patiënten met een IGH@ translocatie is *CRFL2* betrokken. Bij patiënten met het syndroom van Down bedraagt de prevalentie van *CRFL2*-herschikkingen zelfs 54 %. [22], [47]

CRFL2 is gelegen in de pseudoautosomale regio van de geslachtschromosomen (Xp22.3/Yp11.3) meer specifiek in de *PAR1*-regio (zie figuur 13). De pseudoautosomale regio (*PAR1* en *PAR2*) is een korte homologe regio die voorkomt op de beide geslachtschromosomen X en Y. *PAR1* omvat 2,6 Mb van de korte arm van zowel het X als het Y chromosoom. *CRLF2* codeert voor de cytokine receptor-like factor 2 (ook wel thymus stromale lymfopoïetine receptor (TSLPR) genoemd). [3], [22]



Figuur 13: Locatie van de *PAR1*-regio op chromosoom X en Y [48]

Herschikkingen van *CRLF2* treden op door de translocatie t(X;14)(p22;q32) of t(Y;14)(p11;q32) wat resulteert in IGH@*CRLF2*. De prevalentie hiervan bedraagt 0,8 %. Daarnaast kan er ook een deletie plaats vinden namelijk del(X)(p22.33p22.33) of del(Y)(p11.32p11.3). Deze deleties resulteren in de expressie van een P2RY8-*CRLF2* fusie-eiwit. De prevalentie van deze deletie bedraagt 4.2 %. [3], [48], [49]

Zowel bij de translocaties als de deleties komt de volledige coderende sequentie van *CRFL2* onder een andere transcriptionele controle: hetzij de IGH@ enhancer hetzij de *P2RY8* promotor. Beiden zorgen voor een ontregelde overexpressie van *CRFL2* op het celoppervlak van de lymfoblastische cellen wat kan worden gedetecteerd met immuunfenotypering. [50], [51]

CRLF2-herschikkingen zijn geassocieerd met een slechte prognose, zowel bij kinderen als volwassenen. Patiënten met *CRLF2*-herschikkingen behoren tot de intermediaire cytogenetische risicogroep. Het werd aangetoond dat bij deze patiënten een meer intensieve therapie leidt tot een betere prognose. [3], [22]

Groep 8: BCR-ABL1 like ALL

Dit is een specifieke groep BCP-ALL-patiënten waarvan het genexpressieprofiel sterk lijkt op dat van BCR-ABL1+ ALL. De frequentie van deze groep is zelfs hoger dan de frequentie van BCR-ABL1+ ALL. Kenmerkend voor deze groep zijn de genetische afwijkingen van een reeks kinasen en cytokine receptoren, bijvoorbeeld IGH@CRLF2. Naast *IKZF1* afwijkingen komt er in de helft van de gevallen *CRLF2* afwijkingen voor, net als mutaties in één van de *JAK* genen. Net als bij BCR-ABL1+ ALL heeft deze groep een hoog risico op herval en een slechte prognose. [37], [52], [53]

Groep 9: Intrachromosomale amplificatie van chromosoom 21

Intrachromosomale amplificatie van chromosoom 21 komt voor bij 2 % van de patiënten met BCP-ALL. Deze afwijking wordt opgespoord met FISH of karyotypering. Door een chromosomale instabiliteit van chromosoom 21 gebeurt er een amplificatie van *RUNX1* (tenminste drie kopieën) wat vaak gepaard gaat met een deletie van de subtelomere regio van chromosoom 21. Deze afwijking komt vaak voor met *P2RY8-CRLF2* en *RBI* deleties en wordt vooral teruggevonden bij oudere kinderen met een gemiddelde leeftijd van 9 jaar. Een intrachromosomale amplificatie van chromosoom 21 is geassocieerd met een slechte prognose. [54], [55], [56]

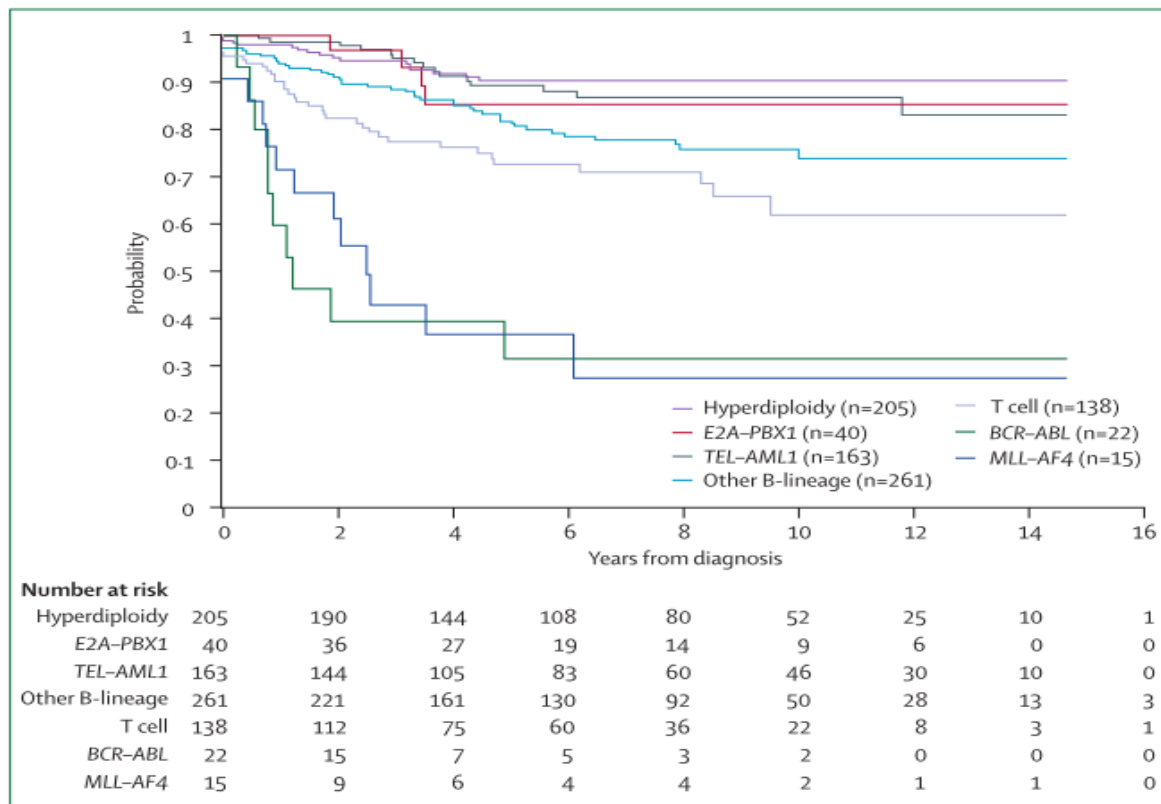
Omdat verschillende chromosomale afwijkingen een onafhankelijke prognostische waarde hebben, is het belangrijk om de patiënten in te delen volgens de aanwezige afwijking in verschillende risicogroepen (zie tabel 5). Daarnaast speelt bij de indeling in risicogroepen ook de leeftijd, het aantal witte bloedcellen bij diagnose en de snelheid waarmee de leukemiecellen dalen bij het begin van de behandeling een rol. [32]

Tabel 5: Goede, intermediaire en slechte risicogroepen [32]

Goede risicogroep	Hoge hyperdiploidie
	ETV6-RUNX1 B-ALL
Intermediaire risicogroep	TCF3-PBX1 B-ALL
	IGH@translocatie & <i>CRLF2</i> -herschikkingen
Slechte risicogroep	Hypodiploidie
	BCR-ABL1+ B-ALL
	BCR-ABL1 like B-ALL
	<i>MLL</i> -herschikkingen
	iAMP

Zoals te zien is in figuur 12 daalt de prevalentie van goede risicogroepen met stijgende leeftijd.

In onderstaande figuur wordt de event-vrije overleving in functie van de jaren na diagnose weergegeven per groep.

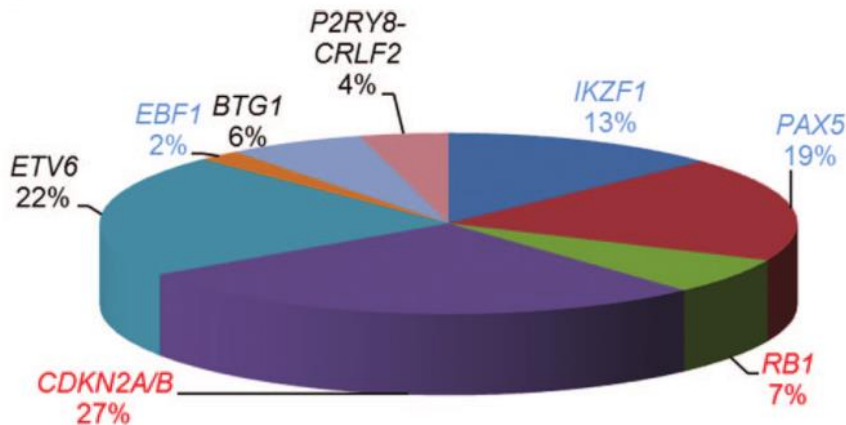


Figuur 14: Kaplan-Meier curve van de event-vrije overleving gegroepeerd per chromosomale afwijking bij kinderen [2]

2.3.3 Submicroscopische DNA copy-number afwijkingen

Door de ontwikkeling van nieuwe moleculaire technieken is de laatste jaren veel onderzoek gebeurd rond copy-number afwijkingen (CNA's) van het genoom. Hierbij werden verschillende nieuwe kleine afwijkingen ontdekt die een rol spelen in BCP-ALL. Op dit moment zijn er meer dan 50 verschillende deleties en amplificaties geïdentificeerd in verschillende genen. Deze submicroscopische afwijkingen werden opgenomen in de risico stratificatie en doelgerichte behandeling van patiënten met BCP-ALL. [3], [5], [57]

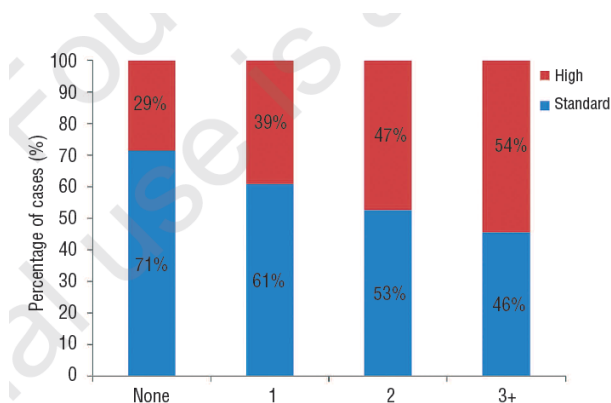
In onderstaande figuur is de incidentie van 1363 deleties bij 1427 kinderen met BCP-ALL te zien.



Figuur 15: Incidentie van 1363 deleties gedetecteerd bij 1427 kinderen met BCP-ALL. De genen betrokken bij de B-cel ontwikkeling wordt weergegeven in het blauw en deze betrokken bij de celcyclus regulatie worden weergegeven in het rood. De genen betrokken bij de transcriptionele regulatie en andere functies worden weergegeven in het zwart.[22]

Bij kinderen met BCP-ALL is aangetoond dat deleties en wijzigingen in *CDKN2A/B*, *IKZF1*, *PAX5*, *ETV6*, *RB1*, *BTG1* en *EBF1* genen frequent voorkomen, wat er op duidt dat ze een belangrijke rol spelen in het ontstaan van leukemie. De betrokken genen coderen voor eiwitten die een rol spelen bij de ontwikkeling en differentiatie van de B-lymfocyten, celcyclus controle en de transcriptionele regulaties. Deleties van *CDKN2A/B* en *ETV6* genen komen het meest frequent voor, terwijl *EBF1* deleties eerder zeldzaam zijn. [9], [57]

Bij 59 % van de patiënten worden er één of meer CNA's gedetecteerd: 30 % heeft 1 CNA, 18 % heeft 2 CNA's, 9 % heeft 3 CNA's en 2 % heeft 4 of meer CNA's. In onderstaand staafdiagram worden het aantal CNA's weergegeven in functie van de NCI (Nationaal Kanker Instituut) risicogroep. Uit deze figuur blijkt dat een aantal CNA's hoger is in de NCI hoge risicogroep. De hoge risicogroep omvat kinderen ouder dan 10 jaar met meer dan 50000 WBC/ μ l bloed. Deleties van *IKZF1* en *CDKN2A/B* komen frequent voor in deze groep. [9]



Figuur 16: Staafdiagram waarin de prevalentie van geen, één, twee, drie of meer CNA's weergegeven wordt [9]

Daarbij komt nog dat de frequentie van de CNA's afhankelijk is van de cytogenetische groep. Amplificaties zijn frequent bij de hoge hyperdiploidie subgroep en zeldzaam bij andere subgroepen. In de andere cytogenetische groepen zijn deleties veel frequenter. In sommige groepen (*ETV6*-*RUNX1* en hypodiploidie) kunnen tot 6 deleties per patiënt voorkomen (zie tabel 6) terwijl bij andere groepen (bv. *MLL*-herschikkingen) gemiddeld maar 1 deletie per patiënt voorkomt. [4]

Tabel 6: Frequentie van de verschillende CNA's binnen elke cytogenetische groep [4]

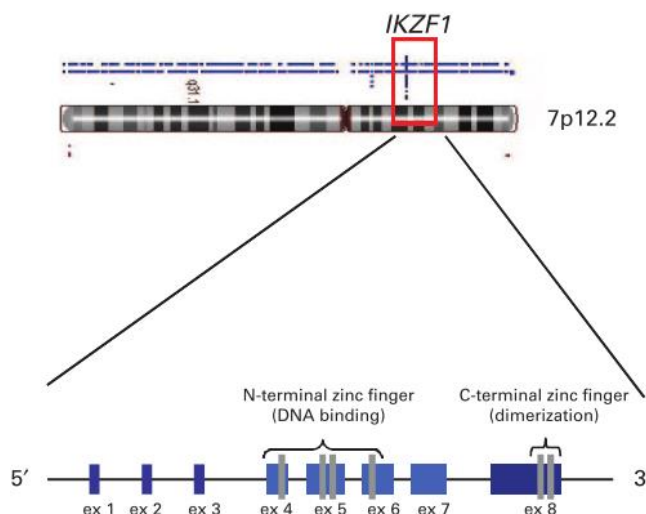
Group	Subtype	N	Amplifications (mean \pm s.d.)*	Deletions (mean \pm s.d.)*	All lesions (mean \pm s.d.)*
B-ALL	Hyperdiploidy with >50 chromosomes	39	9.56 \pm 3.59 (5-20)	1.59 \pm 2.49 (0-11)	11.13 \pm 5.0 (5-27)
B-ALL	<i>TCF3-PBX1</i>	17	1.59 \pm 0.62 (1-3)	2.12 \pm 1.17 (1-4)	3.7 \pm 1.53 (2-7)
B-ALL	<i>ETV6-RUNX1</i>	47	0.89 \pm 1.51 (0-8)	6.0 \pm 4.63 (1-21)	6.68 \pm 4.8 (0-21)
B-ALL	<i>MLL</i> rearranged	11	0.09 \pm 0.3 (0-1)	0.91 \pm 1.81 (0-6)	1 \pm 1.79 (0-6)
B-ALL	<i>BCR-ABL1</i>	9	4 \pm 5.3 (0-12)	4.2 \pm 4.15 (0-12)	6.8 \pm 4.52 (0-13)
B-ALL	Hyperdiploidy with 47-50 chromosomes	23	1.70 \pm 1.55 (0-7)	3.5 \pm 3.12 (0-12)	5.1 \pm 4.31 (0-15)
B-ALL	Hypodiploid	10	1.1 \pm 1.91 (0-6)	6.0 \pm 4.42 (3-18)	7.1 \pm 6.12 (3-24)
B-ALL	Other	36	1.06 \pm 3.21 (0-19)	4.64 \pm 5.14 (0-20)	5.58 \pm 6.57 (0-23)
B-ALL	Total	192	2.97 \pm 4.28 (0-20)	3.83 \pm 4.2 (0-21)	6.63 \pm 5.56 (0-27)
T-ALL		50	0.9 \pm 1.98 (0-9)	4.9 \pm 6.21 (0-30)	5.8 \pm 7.12 (0-39)
All cases		242	2.54 \pm 4.0 (0-20)	4.06 \pm 4.69 (0-38)	6.46 \pm 5.90 (0-39)

Hieronder wordt er verder ingegaan op de meest voorkomende CNA's. Eerst worden de CNA's in genen die betrokken zijn bij de B-cel differentiatie (*IKZF1*, *PAX5*, *EBF1*, *BTG1* en *ETV6*) besproken. Daarna de CNA's in genen die betrokken zijn bij de celcyclus controle (*RBI* en *CDKN2A/B*).

IKZF1 gen

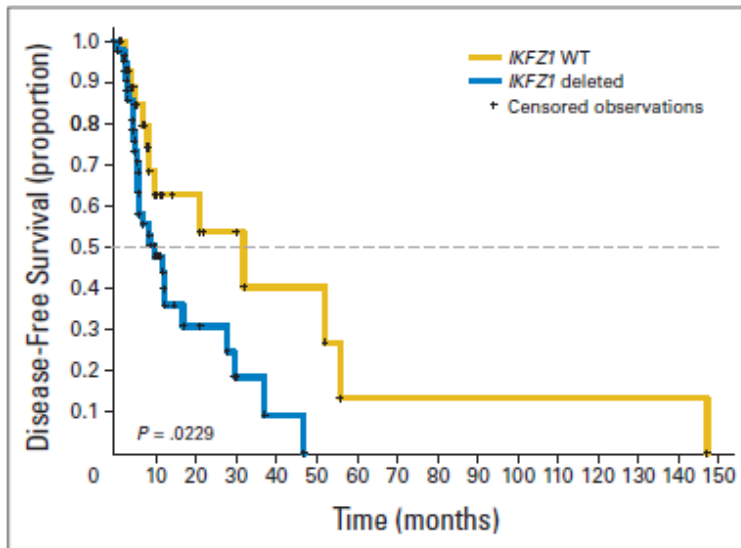
IKZF1 deleties worden in 84 % van de patiënten met BCR-ABL1+ ALL teruggevonden. Ze komen eerder zeldzaam voor in andere subgroepen. Het *IKZF1* gen is gelegen op chromosoom 7 positie p12.2 en codeert voor de lymfoïde transcriptiefactor IKAROS. IKAROS is een zinc finger transcriptiefactor die nodig is voor de ontwikkeling van de vroege B-cel voorlopers en in een later stadium voor de VDJ recombinatie en expressie van de celreceptoren. In figuur 17 wordt de structuur van het *IKZF1* gen weergegeven. Exon 4-6 coderen voor vier N-terminale zinc fingers die verantwoordelijk zijn voor de DNA-binding. Exon 7 codeert voor de C-terminale zinc fingers die verantwoordelijke zijn voor de homo- en heterodimerisatie. [44], [58], [59]

IKZF1 deleties variëren sterk in grootte. De deletie kan het volledige gen omvatten of intragenetisch zijn. De meeste intragenetische deleties vinden plaats in exon 4-7 en resulteren in een dominant negatieve IKAROS isovorm zonder DNA bindende domeinen. Minder frequent zijn intragenetische deleties die exon 2-3, 2-7 en 2-8 omvatten. [57], [60], [61]



Figuur 17: Schematische weergave van het *IKZF1* gen [62]

Deleties in *IKZF1* zijn klinisch van groot belang doordat ze geassocieerd worden met een slechte prognose. Bij kinderen en volwassenen die behoren tot de groep van BCR-ABL1+ ALL is het duidelijk dat *IKZF1* deleties een onafhankelijke prognostische waarde hebben (figuur 18). Bij de andere cytogenetische groepen worden ze als prognostische marker nog in vraag gesteld, hoewel ze in vele studies toch ook geassocieerd worden met een slechte prognose. [63], [64], [65]

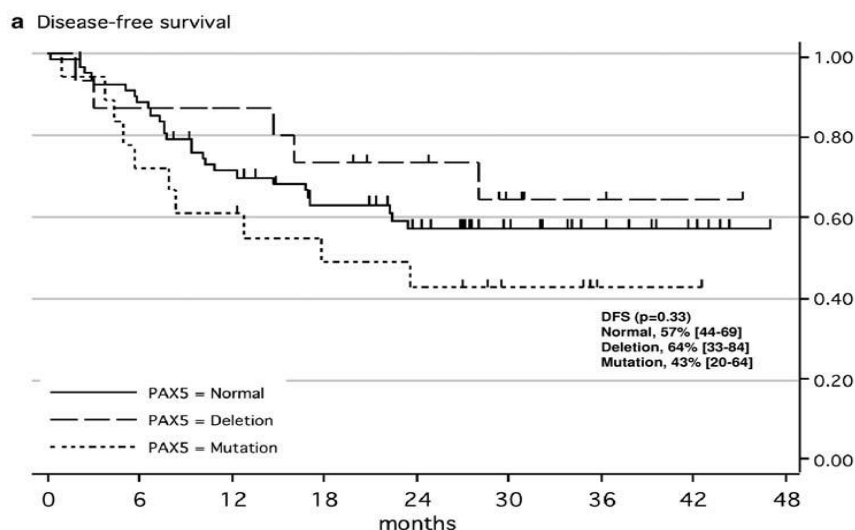


Figuur 18: Ziektevrije overleving van patiënten met BCR-ABL1+ ALL met en zonder *IKZF1* deleties die behandeld zijn op dezelfde manier [62]

PAX5 gen

In 19 % van de patiënten met BCP-ALL komt een deletie van het *PAX5* gen voor. De hoogste prevalentie is terug te vinden in de BCR-ABL1+ subgroep. Zelden wordt een intragenetische amplificatie van exon 2 of 5 teruggevonden. Het paired box 5 (*PAX5*) gen is gelegen op chromosoom 9p13.2. *PAX5* is een transcriptiefactor die instaat voor de ontwikkeling van B-cellen. De factor werkt stroomafwaarts van *EBF1* en zorgt voor de transcriptie van B-cel specifieke genen. Er is een grote verscheidenheid in *PAX5* CNA's. Het meest voorkomend zijn deleties in exon 1 van het gen. Daarnaast komen er ook frequent partiële deleties voor in de andere exons. Deleties van *PAX5* genen zijn vaak samen met deleties van *CDKN2A/B* genen terug te vinden. [66], [67], [68]

Bij kinderen zijn *PAX5* deleties geassocieerd met een lagere therapierespons en slechtere prognose. Bij volwassen daarentegen worden in de meeste studies afwijkingen in *PAX5* geassocieerd met een goede prognose, zeker in afwezigheid van *IKZF1* deleties. In figuur 19 is de ziektevrije overleving weergegeven van patiënten met en zonder *PAX5* mutaties/deleties. De frequentie ligt bij volwassen wel hoger in vergelijking met kinderen. [4], [63], [69]



Figuur 19: Ziektevrije overleving van BCP-ALL-patiënten met en zonder PAX5 mutaties (gedeeltelijke deletie PAX5 met behoud van exon 1, gedeeltelijk amplificatie PAX5, fusiegen of puntmutaties) of deleties (volledige deletie van PAX5 of de deletie van exon 1) [69]

EBF1 gen

Het *EBF1* gen gelegen op chromosoom 5p33.3 wordt in zeldzame gevallen (2 %) getroffen door een volledige of intragenetische deletie. De frequentie neemt echter toe (tot 25 %) bij patiënten waar herval optreedt. Early B cell factor (EBF) is één van de belangrijkste transcriptiefactoren voor de aanmaak van mature lymfocyten vertrekkende van een hematopoietische stamcel (HSC). Tijdens de B-cel differentiatie zorgt EBF1 samen met andere DNA-bindende eiwitten (o.a. PAX5) voor de differentiatie van de B-cellen. Net als IKZF1 deleties worden ze geassocieerd met een slechte prognose. [4], [51]

BTG1 gen

Deleties van het *BTG1* gen hebben een frequentie van 6 %. Het *BTG1* gen gelegen op chromosoom 12q22.33 behoort tot een familie van antiproliferatieve genen die een rol hebben in celgroei en -differentiatie. Tot dusver werden er enkel deleties teruggevonden in *BTG1*. Ze zijn sterk geassocieerd met ETV6-RUNX1 en BCR-ABL1+ ALL en eerder zeldzaam met hyperdiploïde ALL. Een studie van Mullighan et al [70] heeft aangetoond dat *BTG1* deleties een rol spelen bij resistentie tegen glucocorticoïden door hun effect op de glucocorticoïde receptor. Door het mogelijk ontstaan van therapieresistentie worden ze geassocieerd met een slechte afloop en is een nauwgezette follow-up van deze patiënten aangeraden. [71], [72], [73]

ETV6 gen

Met een prevalentie van 22 % bij kinderen zijn deleties in ETV6 een frequente afwijking in BCP-ALL. Deze deleties kunnen zowel het volledige *ETV6* gen, gelegen op chromosoom 12p13, omvatten of slechts een klein stuk ervan.

Binnen de ETV6-RUNX1 groep hebben *ETV6* deleties een prevalentie van meer dan 50 % en zijn bijgevolg geassocieerd met een jongere leeftijd. In grote BCP-ALL studies met kinderen met *ETV6* deleties is aangetoond dat patiënten zowel met als zonder het *ETV6-RUNX1* fusiegen een gunstige prognose hebben. [75], [76], [77]

RB1 gen

Het retinoblastoma 1 (*RB1*) gen gelegen op chromosoom 13q14.2 is een tumorsuppressorgen waarbinnen deleties met een frequentie van 7 % voorkomen. De deletie kan zich beperken tot exon 19-26 van *RB1* maar kan ook het volledig *RB1* gen omvatten. Deze deleties kunnen biallelisch zijn met verschillende groottes in de beide allelen. In sommige gevallen gaat het om een grote deletie die betrekking heeft op meerdere genen en ook *ITM2B*, *RCBTB2* en *DLEU* omvat. *RB1* deleties worden vaak teruggevonden tesamen met intrachromosomale amplificaties van chromosoom 21. Deleties van 13q zijn geassocieerd met een verhoogd risico op herval. [9]

CDKN2A en CDKN2B gen

Deleties in *CDKN2A/B* (cycline-dependent kinase inhibitor 2A/B) genen gelegen op chromosoom 21p21.3 komen regelmatig voor bij hematologische aandoeningen. Bij BCP-ALL komen deleties in *CDKN2A/B* voor in 30 % van de gevallen. Deze genen bevinden zich naast elkaar en meestal zijn er deleties in beide genen terug te vinden. *CDKN2A* codeert voor twee transcripten namelijk p16(INK4a) en p14(ARF) die beiden een rol spelen in de celcycluscontrole door het reguleren van het retinoblastoom (Rb) en p53 trajecten en door het controleren van de overgang van de G1-fase tot de S-fase van de celcyclus. *CDKN2B* codeert voor de p15 tumorsuppressor die betrokken is bij het stilleggen van de celcyclus. [63]

In 40 % van de gevallen zijn deleties in *CDKN2A/B* geassocieerd met afwijkingen in 9p wat zorgt voor een gelijktijdig verlies van *PAX5*. Binnen de kleine groep patiënten met een amplificatie van *PAX5* vertonen het merendeel van de patiënten een deletie van *CDKN2A/B*. [9] Het prognostisch belang van *CDKN2A/B* deleties is nog onduidelijk. In sommige studies wordt aangetoond dat deze patiënten een slechte prognose hebben terwijl andere studies geen prognostisch effect zagen. Deze deleties zijn terug te vinden in verschillende cytogenetische groepen wat de inschatting van de prognose bemoeilijkt. [74]

Momenteel wordt in het CME voor de diagnose van BCP-ALL met een kwantitatieve real-time PCR de aanwezigheid van fusietranscripten van vier verschillende translocaties opgespoord. Het gaat om t(9;22) (BCR-ABL1), t(1;19) (TCF3-PBX), t(12;21) (ETV6-RUNX1) en t(4;11) (MLL-AF4). Uit de recente ontdekkingen is gebleken dat CNA's in *ETV6*, *CDKN2A/B*, *RB1*, *BTG1*, *EBF1*, *PAX5* en *IKZF1* een belangrijke rol spelen in de pathogenese van BCP-ALL. Omdat deze CNA's relevante informatie geeft omtrent de prognose van de patiënt en mogelijke behandelingen wil het CME de opsporing van deze CNA's toevoegen aan de diagnostische work-up van BCP-ALL. Er werd gekozen voor de MLPA-assay die bekend staat als een robuuste techniek voor de detectie van CNA's. Met probemix P335-B1 van de firma MRC Holland is het mogelijk om de meest frequente CNA's die voorkomen bij de hoge risicogroep van BCP-ALL op te sporen. In het vervolg van de thesis wordt de MLPA-assay met probemix P335-B1 uitgetest met als doel de implementatie ervan in de diagnostiek van BCP-ALL.

3 Materiaal & methode

3.1 MLPA-assay

MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification) is een techniek die gebruikt wordt voor de kwantificatie van gemiddeld 40 tot 50 verschillende nucleïnezuur sequenties in één enkele, simpel uit te voeren reactie. Er wordt gebruik gemaakt van een multiplex PCR waarbij de gehybridiseerde MLPA-probes geamplificeerd worden. Met MLPA kunnen sequenties die slechts één enkel nucleotide verschillen van elkaar onderscheiden worden. De firma MRC-Holland biedt een grote verscheidenheid aan van MLPA-probemixen die bruikbaar zijn voor meer dan 250 verschillende applicaties. Een bijkomend voordeel is dat de MLPA-reagentia en de procedure voor elke toepassing dezelfde zijn, enkel de MLPA-probes zijn verschillend. [78]

3.1.1 Principe

MLPA-reactie

MLPA wordt uitgevoerd op DNA. Omdat de manier van extractie van DNA de resultaten van de MLPA-test kan beïnvloeden, is het sterk aangeraden om referentiestalen te gebruiken die via dezelfde methode geëxtraheerd werden als de patiëntenstalen. De hoeveelheid DNA die nodig is, is gelegen tussen 50 en 250 ng waarbij het optimum 50 tot 100 ng DNA is. Wanneer er veel contaminanten aanwezig zijn, wordt er best gewerkt bij een lagere DNA hoeveelheid zodat deze meer verdund worden. [79]

De MLPA-reactie kan in drie grote stappen opgedeeld worden, namelijk:

- DNA-denaturatie & hybridisatie van MLPA-probes,
- ligatie,
- PCR-reactie.

In de eerste stap wordt het DNA gedenatureerd tot enkelstrengig DNA.

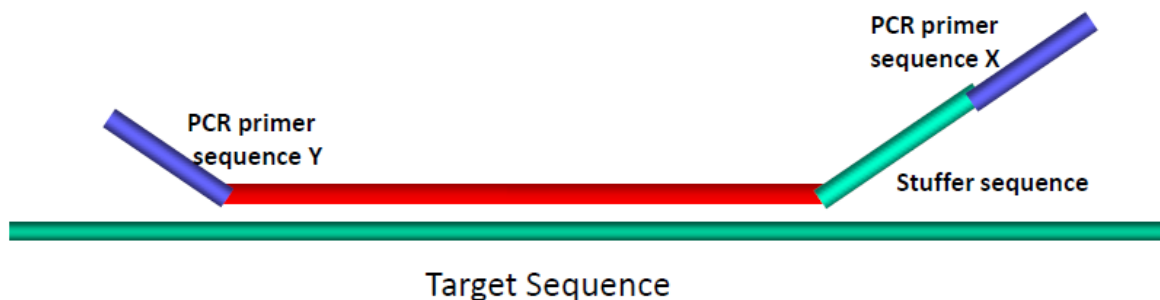
Na de denaturatie worden de MLPA-probes gehybridiseerd aan de targetsequenties. Elke MLPA-probe bestaat uit twee aparte oligonucleotiden die specifiek binden aan de complementaire targetsequentie. Elk oligonucleotide heeft een target specifieke sequentie (55-80 nt) en één primersequentie (identiek voor elke probe). Daarnaast bevat elke MLPA-probe een unieke stuffer sequentie die bepalend is voor de grootte van het geamplificeerde fragment en dus een rol speelt in de identificatie van elke probe. [79]

De hybridisatie vindt plaats bij een temperatuur van 60°C gedurende minstens 16 uur. Het is belangrijk dat er een overmaat van probes aanwezig is tijdens de hybridisatiestap. Standaard worden er ongeveer 500 miljoen kopieën van elk oligonucleotide toegevoegd. In 60 ng DNA zijn er ongeveer 20 000 kopieën van elke targetsequentie aanwezig zodat er steeds voldoende overmaat van probes aanwezig is. De hybridisatiestap wordt hieronder schematisch weergegeven. [11], [78]



Figuur 20: Hybridisatiestap van de MLPA-assay [80]

Het is van groot belang dat de hybridisatie volledig kan plaatsvinden want enkel na een succesvolle hybridisatie kan de ligatie gebeuren. In de ligatiestap worden de twee naast elkaar liggende oligonucleotiden met elkaar verbonden. Deze stap vindt enkel plaats als de twee oligonucleotiden onmiddellijk naast elkaar liggen en 100 % overeenkomen met hun targetsequentie (zie figuur 21). Dit verhoogt de specificiteit van de techniek. Het wegwassen van ongebonden probes is niet nodig omdat zowel de hybridisatie als de ligatie noodzakelijk zijn om een exponentiële amplificatie te laten plaatsvinden. De hoeveelheid van geligeerde probes is afhankelijk van het aantal targetsequenties aanwezig in het staal. [11], [81]



Figuur 21: Ligatiestap van de MLPA-assay [80]

In de laatste stap worden alle geligeerde probes geamplificeerd met één enkele primerset wat de techniek robuust maakt (zie figuur 22). De primerset (zie figuur 23) waarvan de forward primer fluorescent gelabeld is, is gericht tegen de PCR-primerssequenties X en Y van de MLPA-probes. De polymerase activiteit tijdens de PCR-reactie kan verlaagd worden door de aanwezigheid van contaminanten. Daarbij komt dat de relatieve signaalsterkte van sommige probe afneemt met dalende polymerase activiteit. Deze PCR-reactie is bijgevolg meer gevoelig voor contaminanten dan normale PCR-reacties. De condities van de PCR-reactie zijn zo gekozen dat de reactie volledig afloopt m.a.w. totdat alle primers zijn opgebruikt. [82], [83]



Figuur 22: PCR-reactie van de MLPA-assay [80]

SALSA PCR Forward primer (Labelled): 5'*GGGTTCCT
AAGGGTTGGA-3'.

SALSA PCR Reverse primer (Unlabelled): 5'-GTGCCAGC AAG
ATCCAATCTAGA-3'.

Figuur 23: Voorstelling van PCR-primerset [11]

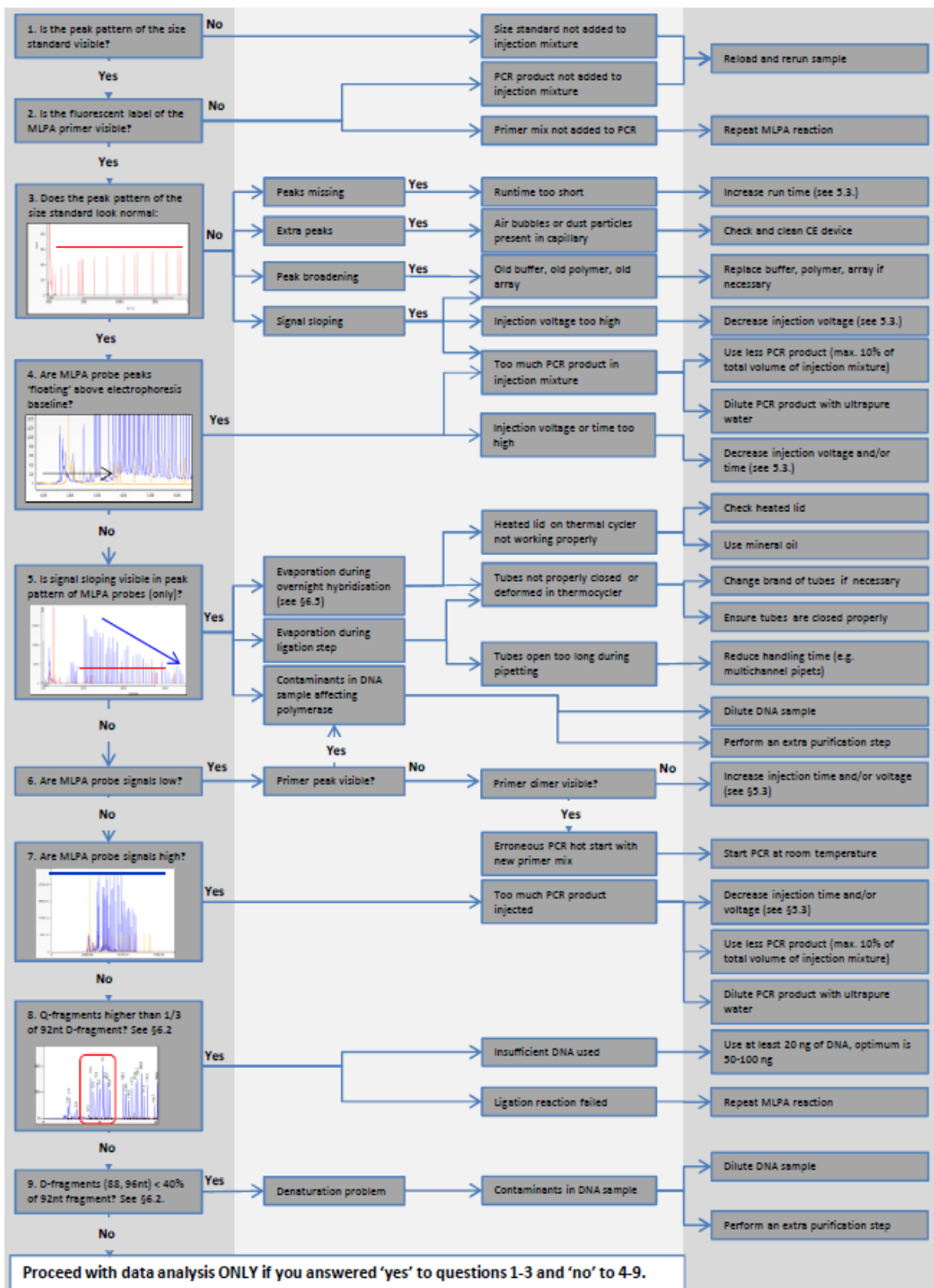
Fragmentanalyse

Na de MLPA worden de PCR-fragmenten gemengd met een fluorescent gelabelde size standaard (GeneScan-500 ROX Size standaard) en formamide. Na verhitting (om opnieuw enkelstrengig DNA te bekomen) worden de fragmenten gescheiden op basis van hun grootte door middel van capillaire elektroforese. In een probemix is elke MLPA-probe zo ontworpen dat de amplificatieproducten na PCR een unieke lengte hebben. Het lengteverschil tussen de probes bedraagt 6-9 nt en de totale range waarbinnen de amplificatieproducten zich bevinden is 65 tot 500 nt. [84], [85]

Data-analyse

Bij de data-analyse is het de bedoeling om op basis van de hoogte van de pieken elk fragment te kwantificeren. De hoeveelheid gevormd product is evenredig met het copy-number van de DNA sequentie waaraan de MLPA-probe zich gehecht heeft.

In eerste instantie moet de kwaliteit van de ruwe data en het verkregen piekpatroon geëvalueerd worden. In de onderstaande figuur is de quality control flowchart van MRC Holland weergegeven.



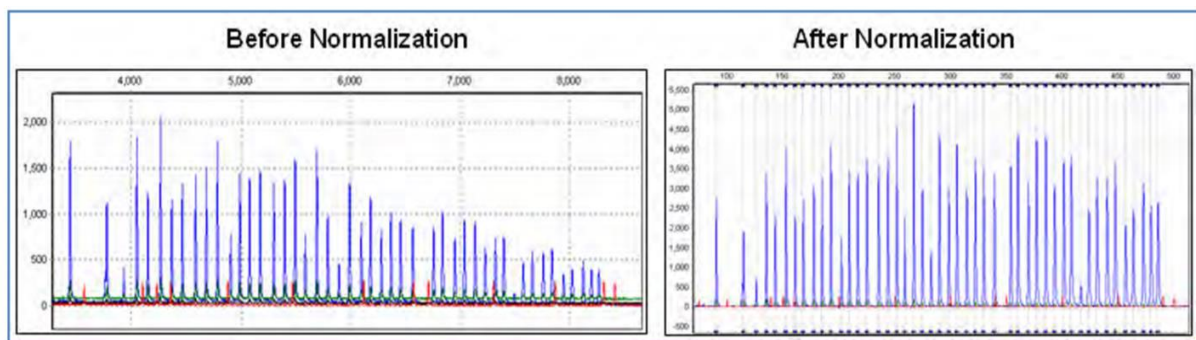
Figuur 24: Quality control flowchart [78]

Voor de analyse van de resultaten zijn er verschillende mogelijkheden. In huis wordt gebruik gemaakt van de software GeneMarker van de firma SoftGenetics. Daarnaast biedt MRC Holland zijn eigen freeware aan voor MLPA-analyse nl. Coffalyser.net.

Beide softwarepakketten vertrekken van de ruwe data na fragmentanalyse. De verschillende analysestappen zijn in grote lijnen hetzelfde. Na de scheiding van de fragmenten wordt elk fragment vertaald in een piek. De software detecteert de verschillende pieken en kent er een lengte aan toe. Hiervoor wordt de positie van de gedetecteerde pieken van de stalen vergeleken met die van de size standaard waarvan de lengte gekend is. Iedere software heeft hiervoor zijn eigen manier. [86]

In tweede instantie wordt het panel van de MLPA-assay aangeduid zodat de pieken op basis van hun lengte gekoppeld worden aan de probes aanwezig in die specifieke mix. Vervolgens moeten de data genormaliseerd worden. Normalisatie is het proces waarbij de piekhoogtes worden aangepast als correctie op de variatie binnen elk staal en tussen verschillende stalen. [85]

In de eerste plaats wordt er een intra-sample normalisatie uitgevoerd om de variatie binnen elk staal te corrigeren. Immers zoals te zien is in onderstaande figuur daalt de PCR-efficiëntie wanneer de fragmenten groter worden. Hiervoor wordt gecorrigeerd tijdens de intra-sample normalisatie. Na deze normalisatie wordt er voor elke probe een relatieve proberatio verkregen die door beide softwarepakketten op een verschillende manier berekend wordt.



Figuur 25: Weergave resultaten fragmentanalyse voor en na normalisatie [87]

Met GeneMarker kan op twee verschillende manieren genormaliseerd worden. Enerzijds kan dit via de interne controle normalisatie waarbij genormaliseerd wordt door de piekintensiteit van de referentiefragmenten (zie § 3.1.2 Materialen) gelijk aan één te stellen. De ratio's van de andere fragmenten worden dan berekend ten opzichte van de referentiefragmenten. Maar omdat de piekintensiteiten van de referentiefragmenten nogal kunnen schommelen van staal tot staal wordt de populatie normalisatie (zie verder) aanbevolen omwille van zijn robuustheid. Stel dat bij een aantal referentieprobes specifieke amplificatie optreedt en er zijn niet veel referentieprobes in de mix, dan leidt dit tot een verminderde nauwkeurigheid en meer vals positieven indien de interne controle normalisatie gebruikt wordt. Bij populatie normalisatie wordt de piekintensiteit van alle probes gebruikt om de lokale mediaan intensiteit te berekenen. Deze worden dan gebruikt om een exponentiele functie te fitten. Aspecifieke amplificatie van een controleprobe vormt dan veel minder een probleem. [87]

Met de coffalyser.net software kan je net als met GeneMarker normaliseren t.o.v. de referentieprobes of t.o.v. alle probes. Het algoritme dat hiervoor gebruikt wordt is echter verschillend. [88]

De laatste stap is de inter-sample normalisatie. Hierbij worden de relatieve proberatio's van elk patiëntenstaal vergeleken met de relatieve proberatio's van de referentiestalen. Het is dan ook noodzakelijk om in elke test minstens 1 referentiestaal mee te nemen. Voor elke probe wordt zo een MLPA-ratio/dosage quotiënt (DQ) verkregen. Deze MLPA-ratio (zie figuur 26) is dus de ratio van de genormaliseerde piekintensiteit van het staal ten opzichte van de genormaliseerde piekintensiteit van het referentiestaal. [89]

$$\frac{\text{relatieve proberatio } n \text{ in patiëntenstaal } A}{\text{relatieve proberatio } n \text{ in referentiestaal}} = \text{MLPA - ratio}$$

Figuur 26: Formule MLPA-ratio

In onderstaande tabel worden de cut-off waarden voor de detectie van deleties en amplificaties weergegeven.

Tabel 7: Cut-off waarden voor de detectie van CNA's

MLPA-ratio	
≤ 0,25	Biallelische deletie
0,25- 0,75	Monoallelische deletie
0,75 – 1,3	Normaal
≥ 1,3	Amplificatie

3.1.2 Materialen

DNA geëxtraheerd uit bloed- en beenmergstalen

De DNA-extractie uit bloed- en beenmergstalen gebeurt momenteel via de chemagen methode. Met behulp van de Chemagic DNA blood kit wordt de extractie uitgevoerd door de Chemagen MSM I robot. Er wordt gebruik gemaakt van magnetische polyvinyl alcohol beads waaraan het DNA na lysis van de rode bloedcellen zal binden. Om onzuiverheden weg te werken vinden er verschillende wasstappen plaats. Vervolgens wordt het DNA opgelost in een elutiebuffer en worden de magnetische beads verwijderd. Na de extractie wordt de DNA-concentratie opgemeten. Alle DNA stalen worden op een concentratie van 1 µg DNA/2.5 µl gebracht (indien mogelijk) en vervolgens gestockeerd op -20°C. Manuele DNA-extractie met Autopure consumables werd uitgevoerd tot medio 2013 en is op dit moment vervangen door de chemagen methode. Deze manuele DNA-extractie was een 2-staps protocol. In de eerste stap werden de RBC gelyseerd en de WBC gepelleteerd waarna de WBC gelyseerd werden met een anionisch detergent in aanwezigheid van een DNA stabilisator. In de tweede stap worden mogelijke contaminanten verwijderd door een zout-precipitatie. Vervolgens wordt het DNA geprecipiteerd met alcohol en opgelost in een buffer met DNA-stabilisator.

MLPA-reactie

De gebruikte materialen voor de MLPA-reactie zijn:

- DLD1-cel lijn (geëxtraheerd via chemagen),
- DNA van bloed- en beenmergstalen
- thermocycler: Biometra TProfessional (Westburg BV),
- SALSA MLPA EK1-FAM reagentia kit (MRC-holland),
- SALSA MLPA probemix P335-B1 (MRC-holland).

De reagentia van de SALSA MLPA EK1-FAM kit worden weergegeven in onderstaande tabel.

Tabel 8: Inhoud van de SALSA MLPA EK1-FAM reagentia kit [90]

SALSA MLPA-reagentia	Samenstelling
SALSA MLPA-buffer (gele dop)	KCl, Tris-HCl, EDTA, PEG-6000, nucleotiden (pH 8.5)
SALSA Ligase-65 (groene dop)	Glycerol, niet-ionisch detergent, EDTA, Beta-Mercaptoethanol (0.1 %), KCl, Tris-HCl, Ligase (van bacteriële oorsprong) (pH 7.5)
Ligase Buffer A	Coenzym NADH (pH3.5)
Ligase Buffer B	Tris-HCl, niet-ionisch detergent, MgCl ₂ . pH 8.5
SALSA PCR primer mix (bruine dop)	Synthetische oligonucleotiden met fluorescente kleurstof (FAM), dNTPs, Tris, EDTA (pH 8)
SALSA Polymerase (oranje dop)	Glycerol, niet-ionisch detergent, EDTA, DTT (0.2%), KCl, Tris-HCl, Polymerase enzym (van bacteriële oorsprong) (pH7.5)

De probemix P335-B1 bevat 57 MLPA-probes met een amplificatieproduct dat gelegen is tussen 118 en 503 nt. Daarnaast bevat de kit nog 9 controlefragmenten die een amplificatieproduct kleiner dan 110 nt hebben. In onderstaande tabel worden de functies van de controlefragmenten weergegeven.

Tabel 9: Controlefragmenten van probemix P335-B1 [78]

Naam	Lengte (nt)	Interpretatie
92 nt maatstaf probe	92	Normale probe die een maatstaf is om de andere controle fragmenten mee te vergelijken
Q-fragmenten	64, 70, 76, 82	Het signaal van deze 4 fragmenten moet kleiner zijn dan 33 % van het signaal van de 92 nt maatstaf probe. Wanneer ze alle vier groter zijn is de DNA hoeveelheid te laag of is de ligatiestap niet gelukt.

D-fragmenten	88, 96	Wanneer het signaal van deze probes lager is dan 40 % van het signaal van de 92 nt maatstaf probe duidt dit op denaturatie problemen.
X & Y fragmenten	100, 105	Controle voor staal verwisseling

De 57 MLPA-probes bestaan uit 42 sample probes, 13 referentieprobes, 1 probe voor *ZFY* en 1 probe voor *JAK2*. De 42 sample probes bedoeld voor de target specifieke regio's zijn:

- vijf probes voor de *PAR1*-regio (Xp22.33/Yp11.32) die aanwezig is in 2 kopieën per cel. De genen waar deze vijf MLPA-probes binden, gerangschikt volgens hun chromosomale ligging, zijn:
 - *SHOX*-area,
 - *CRLF2* ex4,
 - *CSF2RA* ex10,
 - *IL3RA* ex1,
 - *P2RY8* ex2.

In de probemix is ook een flanking probe *ZFY* ex4 aanwezig die bindt op Yp11.31. Dit gen is enkel bij mannen terug te vinden. Samen met het Y specifieke controle fragment wordt het gebruikt om het verlies van het Y chromosoom bij mannen op te sporen;

- vier probes voor het *EBF1* (5q33.3) gen. Het gaat om probes voor ex16, 14, 10 en 1;
- acht probes voor het *IKZF1* gen (7p12.2). Met de probes kunnen CNA's in ex1 tot en met ex8 opgespoord worden;
- drie probes voor *CDKN2A/B* (9p21.3) Deze genen worden samen behandeld omdat ze naast elkaar liggen en vaak samen gedeleteerd zijn. De genregio's waar de drie MLPA-probes binden, gerangschikt volgens hun chromosomale ligging, zijn:
 - *CDKN2A* ex5,
 - *CDKN2A* ex2a,
 - *CDKN2B* ex2.

Binnen deze regio is er nog een flanking probe *JAK2* ex23 (9p24.1) aanwezig. De probes voor *ZFY* en *JAK2* zijn flanking probes die worden toegevoegd om de bepaling van de grootte van een amplificatie/deletie te vergemakkelijken;

- zeven probes voor het *PAX5* gen (9p13.2). Er zijn MLPA-probes aanwezig voor ex10, 8, 7, 6, 5, 2 en 1;
- zes probes voor het *ETV6* gen (12p13.2). De aanwezige MLPA-probes binden aan ex1a, 1b, 2, 3, 5 en 8. Deze MLPA-probes detecteren wel niet alle microdeleties die kunnen voorkomen binnen deze regio;
- vier probes voor het *BTG1* gen (12q22.33). De genen waar de vier MLPA-probes binden, gerangschikt volgens hun chromosomale ligging, zijn:
 - *BTG1 area 1*,
 - *BTG1 area 2*,
 - *BTG1 ex2*,
 - *BTG 1 ex1*.

De *BTGI* area 1 & 2 zijn centromerische area's (gen-arme regio's) van *BTGI* die regelmatig betrokken zijn bij deleties van het *BTGI* gen;

- vijf probes voor het *RBI* gen (13q14.2), namelijk voor ex 6, 14, 19, 24 en 26.

De referentieprobes binden in regio's die relatief stabiel zijn bij BCP-ALL.

Een uitgebreide lijst van de probes aanwezig in de probemix P335-B1 samen met hun lengte en chromosomale positie is te vinden in bijlage A. [91]

Fragmentanalyse

De materialen nodig voor de fragmentanalyse zijn:

- De ABI 3730xl Genetic analyser;
- Hi-Di Formamide Genetic Analysis grade;
- GeneScan-500 ROX Size standaard.

Op de ABI wordt de fragmentanalyse uitgevoerd met capillaire elektroforese. In het capillair wordt er gebruik gemaakt van POP7TM polymeer als matrix waarop de scheiding wordt uitgevoerd. De detectie gebeurt aan de hand van fluorescent gelabelde PCR-producten die voorbij een laserstraal migreren waardoor de labels oplichten en gedetecteerd kunnen worden.

Voor de fragmentanalyse moet aan elke staal een bepaalde hoeveelheid van een mengsel van Hi-Di formamide/ROX Size standaard worden toegevoegd. Hi-Di formamide is sterk gedeïoniseerd formamide dat zorgt voor het stabiel houden van het gedenateerd DNA gedurende de elektrolyse. De GeneScan-500 ROX size standaard is een interne size standaard speciaal ontwikkeld voor fluorescent gelabelde DNA elektroforese systemen. De standaard bevat 16 enkelstrengig ROXTM gelabelde fragmenten van 35, 50, 75, 100, 139, 150, 160, 200, 250, 300, 340, 350, 400, 450, 490 en 500 bp. [92]

3.1.3 Methode

Het werkblad dat gebruikt werd voor de uitvoering van de MLPA-assay is terug te vinden in bijlage B.

MLPA-reactie

De MLPA-reactie kan in vier stappen onderverdeeld worden waarvan de werkwijze hieronder weergegeven wordt.

1. Denaturatie

Voor elke reactie is 50-250 ng DNA nodig in een volume van 5µl. Verdunningen worden gemaakt met dH₂O.

Elk staal wordt gedenateerd door 5 minuten te verhitten op 98°.

2. Hybridisatie

Bij elk staal wordt 3 µl hybridisatie mastermix toegevoegd. In de onderstaande tabel wordt de bereiding van mastermix weergegeven.

Tabel 10: Bereiding hybridisatie mastermix

Hybridisatie mastermix	
Probemix	1,5 µl
MLPA-buffer	1,5 µl
	3 µl/reactie

Na toevoegen van de mastermix wordt het mengsel minstens 16 uur gehybridiseerd op 60°C.

3. Ligatie

Na 16 uur hybridiseren wordt de reactieoplossing op een temperatuur van 54 °C gebracht en wordt 32 µl ligatie mastermix per staal toegevoegd. De bereiding van deze mastermix is weergegeven in onderstaande tabel.

Tabel 11: Bereiding ligatie mastermix

Ligatie mastermix	
Buffer A	3 µl
Buffer B	3 µl
dH₂O	25 µl
Ligase 65	1 µl
	32 µl/reactie

Na toevoeging van de mix wordt het onderstaand temperatuurprogramma van de ligatie verdergezet.

Tabel 12: Temperatuurprogramma van de ligatie reactie

Tempartuurprogramma ligatie reactie	
54°C (toevoegen ligatie mastermix)	pauze
54°C	15 min
98°C	5 min

4. PCR-reactie

Na de ligatie wordt aan elke reactieoplossing 10 µl polymerase mastermix (zie onderstaande tabel) toegevoegd op kamertemperatuur.

Tabel 13: Bereiding polymerase mastermix

Polymerase mastermix	
SALSA PCR mix	2 µl
dH₂O	7,5 µl
SALSA polymerase	0,5 µl
	10 µl/reactie

Vervolgens wordt het temperatuurprogramma voor de PCR-reactie (zie tabel 14) opgestart. De tijd tussen toevoeging van PCR mix en start van de reactie moet zo klein mogelijk gehouden worden.

Tabel 14: Temperatuurprogramma van de PCR-reactie

PCR-reactie		
35 cycli:	95°C	30 sec
	60°C	30 sec
	72°C	60 sec
72°C		20 min
15°C		pauze

Fragmentanalyse

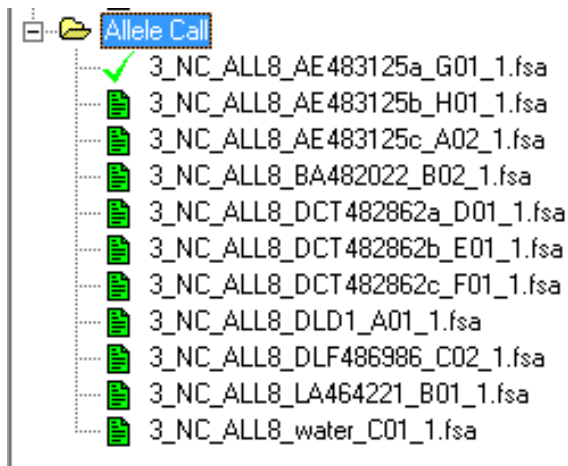
1. Bereiding van een HiDi-formamide en ROX 500 sizer mengsel: 19.5 µl HiDi Formamide + 0.5 µl ROX 500 sizer
2. Voor elk staal wordt er aan 20 µl van bovenstaand mengsel 1 µl PCR-product toegevoegd
3. Denaturatie (3 minuten op 96 °C) van het mengsel
4. Voor het staal op de ABI wordt gezet moet het minstens enkele minuten bewaard worden op -20°C

Data analyse

Vervolgens worden de ruwe data geanalyseerd met GeneMarker of coffalyer.net. Vermits maar éénmalig werd geanalyseerd met coffalyser.net (zie resultaten) wordt hier enkel de methode van GeneMarker weergegeven. De uitgebreide uitleg van de software is te vinden bij § 3.1.1 Principe van de data-analyse. In het kort zijn de te volgen stappen:

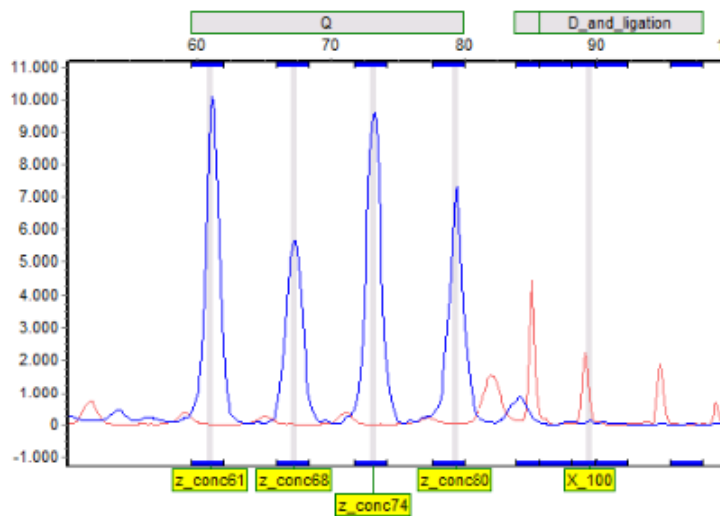
- 1) Importeren van de ruwe data,
- 2) Analyse van de ruwe data,
 - a. Sizing,
 - b. Normalisatie,
- 3) Aligneren & toepassen van het probe panel,
- 4) MLPA-analyse.

GeneMarker controleert steeds of de size calling geslaagd is. Dit wordt weergegeven door een groen icoon langs de staalnaam (zie figuur 27).



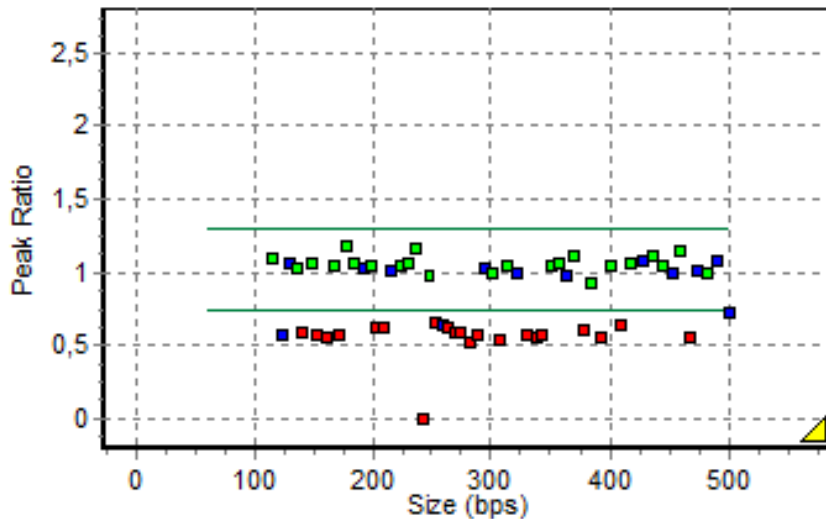
Figuur 27: Manier waarop een geslaagde size calling wordt weergegeven

Na de normalisatie van de data wordt de kwaliteit van elke staal gecontroleerd aan de hand van een signaal-ruis verhouding (MLPA-score). Aan elk staal wordt een MLPA-score tussen 0 en 100 gegeven wat de kwaliteit van de laan weergeeft. Hoe groter de MLPA-score, hoe beter de kwaliteit. Standaard wordt bij elke MLPA-analyse de minimale laan score treshold gesteld op 10. Wanneer deze score lager is dan 10 wordt het staal duidelijk aangegeven als een slecht staal. De no-DNA controle is een voorbeeld van een staal met een MLPA-score van 0. Een no-DNA controle wordt bij elke run meegenomen en wordt gebruikt om contaminatie van de reagentia uit te sluiten. Zoals in onderstaande figuur weergegeven wordt, mogen enkel de vier Q-controlefragmenten zichtbaar zijn. [86]



Figuur 28: Controlefragmenten zichtbaar bij een no-DNA controle

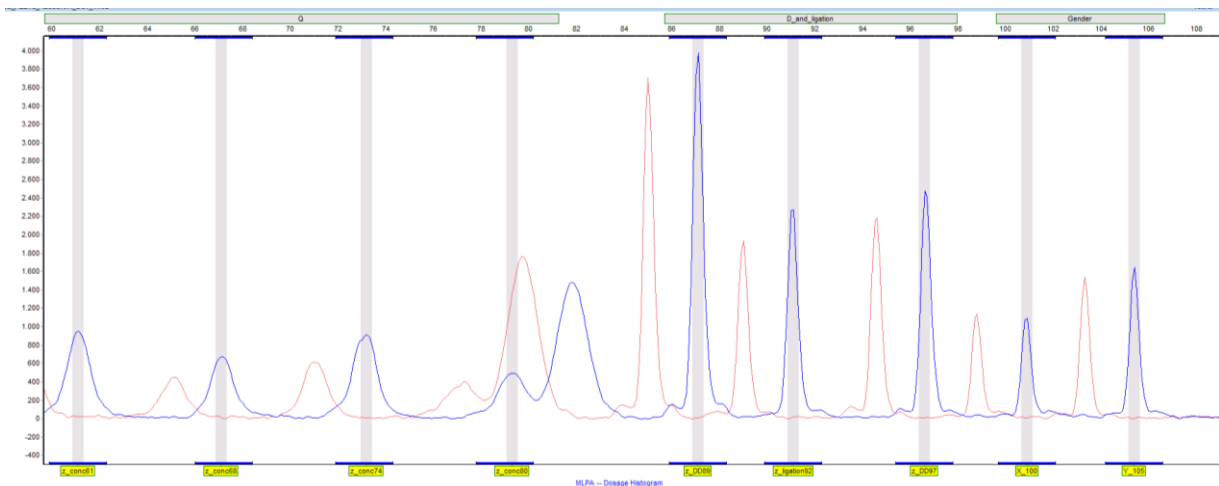
In onderstaande figuur is een voorbeeld van een ratioplot te zien. De groene lijnen stellen de grenzen van de MLPA-ratio voor. De groene vierkanten stellen targetprobes voor die normaal zijn, wanneer ze buiten de grenzen vallen, kleuren ze rood. De referentieprobes worden weergegeven met een blauwe kleur.



Figuur 29: Ratioplot die door GeneMarker wordt weergegeven.

De software geeft bij elke ratioplot het succes van de normalisatie weer met een driehoek in de rechterbenedenhoek. Een groene driehoek betekent een geslaagde normalisatie, een gele driehoek een normalisatie waarvan de juistheid geverifieerd moet worden. Een rode driehoek betekent een mislukte normalisatie. Het succes van de normalisatie wordt bepaald door de relatieve afwijkingen van de proberatio's te berekenen. Hierdoor kan de normalisatie ook mislukt zijn wanneer een groot aantal probes CNA's vertonen. [86]

Tot slot moeten de controlefragmenten gecontroleerd worden. In onderstaande figuur worden de controlefragmenten weergegeven die bij elk staal geëvalueerd moeten worden. De vier Q-fragmenten moeten kleiner zijn dan 33 % van het 92 nt probe (ligation probe). Wanneer dit niet het geval is duidt dit op te weinig DNA. De twee D-fragmenten moeten groter zijn dan 40 % van het 92 nt probe. Anders duidt dit op denaturatie problemen. Daarnaast zijn nog Y- en X-fragmenten aanwezig die een eventuele staalverwisseling aan het licht kunnen brengen. [91]



Figuur 30: MLPA-dosage histogram van de controlefragmenten.

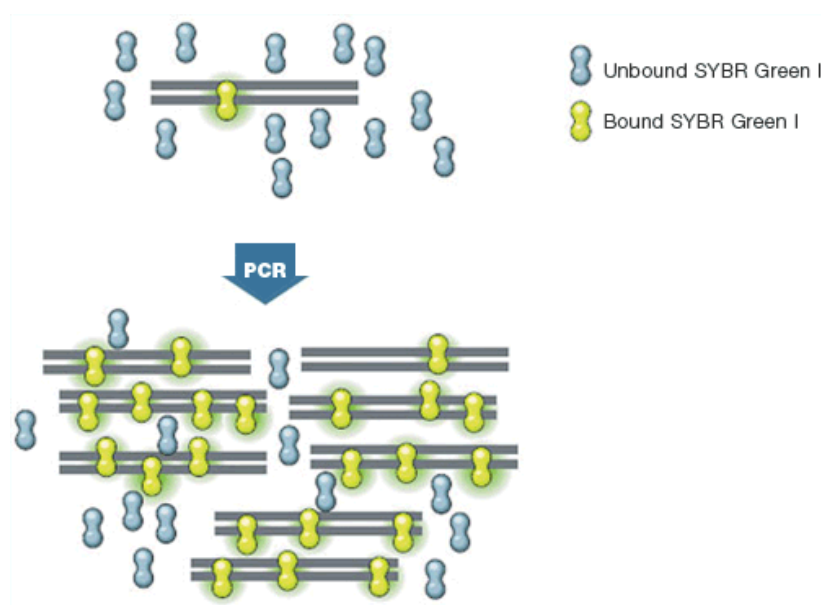
3.2 Real-time PCR

Het doel van de real-time PCR (QPCR) is om de resultaten bekomen met de MLPA-assay voor de *PAX5*, *CDKN2A*, *CDKN2B* en *IKZF1* genen te bevestigen met een tweede techniek. Voor de uitvoering van deze PCR werd vertrokken van de paper van Schwab et al, GCC 2010. [10]

3.2.1 Principe

Real-time PCR is een kwantitatieve PCR techniek waarbij tijdens de PCR-reactie de amplificatie van het DNA opgevolgd wordt. In principe is het een standaard PCR waarbij binnen bepaalde tijdsintervallen de hoeveelheid van het geamplificeerde DNA gedetecteerd wordt (real-time). De detectie van het geamplificeerde DNA kan op verschillende manieren gebeuren, namelijk door gebruik te maken van fluorescent gelabelde probes (TaqMan principe) of door een fluorescerende kleurstof te gebruiken die intercaleert tussen dubbelstrengig DNA.

Bij deze QPCR wordt er gebruik gemaakt van SybrGreen, een fluorescerende kleurstof die intercaleert tussen al het aanwezige dubbelstrengig DNA. Zoals te zien op de onderstaande figuur fluoresceert het SybrGreen pas wanneer het tussen de dubbelstrengig geïntercaleerd is. Vermits met deze detectiemethode alle aanwezige DNA strengen gedetecteerd worden, is het een aspecifieke methode. [93]



Figuur 31: Werking SybrGreen [94]

Tijdens de PCR-reactie wordt er meer DNA gevormd en zal er meer SybrGreen binden. Bijgevolg zal het fluorescentiesignaal in functie van de tijd stijgen. Gedurende de reactie wordt een amplificatiecurve opgenomen waarbij het aantal cycli wordt uitgezet t.o.v. het fluorescentiesignaal. Van deze curve kan voor elk staal de C_p -waarde afgelezen worden. De C_p (crossing point)-waarde geeft het aantal cycli weer dat een staal nodig heeft om boven een bepaalde waarde (threshold) te komen. Deze C_p -waarde is rechtstreeks afhankelijk van de DNA-concentratie. [93], [95]

De detectie van CNA's gebeurt door de berekening van een relatieve ratio voor elke geamplificeerde regio. Hiervoor wordt een ratio berekend op basis van de Cp-waarde van het targetgen en een referentiegen. Deze ratio wordt dan genormaliseerd t.o.v. de ratio verkregen voor een referentiestaal. De formule voor de berekening van de ratio is weergegeven in onderstaande figuur. [95]

$$ratio = \frac{2^{-(Cp_{preferentiegen} - Cp_{targetgen})}}{2^{-(Cp_{preferentiegen} - Cp_{targetgen})}}_{referentie}$$

Figuur 32: Formule voor de ratio bij QPCR [95]

Een normale ratio is gelegen tussen 0.75 en 2. Bij een waarde tussen 0.75 en 0.25 wordt er gesproken van een monoallelische deletie. Als de waarde onder de 0.25 is de deletie biallelisch. Bij een waarde boven de 2 is er een amplificatie van het gen aanwezig. [10]

3.2.2 Materialen

- LightCycler 480;
- Light cycler 480 SYBR Green I Master Mix;
- 96-well microtiterplaat
- DNA van bloed- en beenmergstalen (zie § 3.1.2 Materialen)
- Primermixen (5 µM) voor *IKZF1* ex2, 3, 4, 5, 6, 7, 8;
- Primermixen (5 µM) voor *PAX5* ex1, 2, 5, 6, 8, 10;
- Primermixen (5 µM) voor *CDKN2A* ex2 en 4;
- Primermixen (5 µM) voor *CDKN2B* ex2
- Primermixen (5µM) voor *B2M* intron 1-2, *RPLP0* intron 5-6 en *TBP* ex6 (=controle probes)

De sequenties van de verschillende primers zijn terug te vinden in bijlage C.

3.2.3 Methode

Aanmaak primermixen

De bereiding van 1 ml van een 5 µM primermix gebeurt als volgt:

- 20 µl Forward-primer,
- 20 µL Reverse-primer,
- 960 µl water.

Uitvoeren QPCR

1) Bereiding van de PCR mastermix

Reagentia	Hoeveelheid
Light cycler 480 SYBR Green I Master mix	7,5 μ l
5 μ M primermix	2,5 μ l
Totaal	10 μ l mix/staal

2) Bereiding van de microtiterplaat

Toevoeging in elke well van:

- 10 μ l mastermix,
- 5 μ l verdund DNA met een concentratie van 2ng/ μ l.

Elk staal wordt in triplo uitgevoerd en er wordt telkens minstens 1 referentiegen meegenomen. Om contaminatie uit te sluiten wordt er bij elke run ook water meegenomen voor elke primermix.

3) Inzetten van de PCR

PCR-programma:

5 min	95 °C		
10 min	95 °C	}	45 x
30 sec	60 °C		

4) Berekening van de copy-number afwijking

Voor de berekening van de ratio's wordt als referentiegen steeds *B2M* gebruikt. De gebruikte formule is terug te vinden bij § 3.2.1 Principe.

4 Resultaten

4.1 Optimalisatie

We vertrekken van een bestaand protocol dat in het CME gebruikt wordt voor verschillende MLPA-kits in het kader van erfelijke aandoeningen. Verschillende factoren waaronder de afkomst, zuiverheid en concentratie van het DNA, experimentele instellingen (bv. keuze van het referentiestaal), probekit, instrument instellingen voor de fragmentanalyse en de data normalisatiemethode kunnen een MLPA-assay beïnvloeden waardoor een optimalisatiestap vereist is.

De bedoeling van de optimalisatie is om te kijken of de analysemethode ook geschikt is voor probemix P335-B1 en of met het bestaande protocol een resultaat wordt verkregen dat voldoet aan de kwaliteitsvoorwaarden. In de eerste plaats wordt nagegaan of de GeneMarker software geschikt is voor de data-analyse van probemix P335-B1. Door MRC-Holland wordt de coffalyser.net software aanbevolen. Daarnaast wordt gecontroleerd of de DLD1-celijn gebruikt kan worden als referentiestaal. Vervolgens wordt nagegaan welke de benodigde hoeveelheid DNA is om enerzijds weinig storingen te hebben door de aanwezigheid van contaminanten en toch nog een voldoende nauwkeurige test te kunnen uitvoeren. Tot slot wordt nagegaan of met het bestaande protocol en de optimale DNA hoeveelheid aan de kwaliteitsvoorwaarden voldaan wordt.

4.1.1 Keuze van de analysemethode

Voor verschillende stalen werden de data geanalyseerd door gebruik te maken van een populatie normalisatie en interne controle normalisatie in GeneMarker. De resultaten werden met elkaar vergeleken. Een voorbeeld van één patiëntenstaal dat werd geanalyseerd met de twee verschillende methoden is terug te vinden in de onderstaande figuur. Daarbij is te zien dat bij de interne controle normalisatie er amplificaties in *IKZF1* exon 1, 2 en 7, *PAX5* exon 6 en 7 en *ETV6* exon 2 en 5 voorkomen die niet gedetecteerd worden bij de populatie normalisatie. Voor *IKZF1* en *PAX5* werd een QPCR uitgevoerd. De amplificaties van *IKZF1* exon 1 en 2 en *PAX5* exon 6 werden niet bevestigd. Op basis van deze vergelijking wordt er gekozen om verder te werken met de populatie normalisatie waarbij dus genormaliseerd wordt t.o.v. alle probes i.p.v. enkel de referentieprobes. In tegenstelling tot de interne controle normalisatie is deze techniek minder afhankelijk van mogelijke afwijkingen in de referentieprobes.

Tabel 15: Resultaten van een patiënt geanalyseerd met interne controle normalisatie en populatie normalisatie.

Genregio's	GeneMarker	GeneMarker	
	interne controle normalisatie	populatie normalisatie	
	3_NC_ALL6_481372DCJ_D01_1.fsa	3_NC_ALL6_481372DCJ_D01_1.fsa	
SHOX-AREA	0,869	0,846	Amplificatie
CRLF2_ex04	1,292	1,264	Monoallelische deletie
CSF2RA_ex10	1,292	1,111	biallelische deletie
IL3RA_ex01	0,922	0,856	
P2RY8_ex02	1,074	1,037	
ZFY_ex04	0	0	
EBF1_ex16	0,999	0,904	
EBF1_ex14	1,175	1,07	
EBF1_ex10	1,122	1,036	
EBF1_ex01	1,161	1,11	
IKZF1_ex01	1,395	1,321	
IKZF1_ex02	1,373	1,32	
IKZF1_ex03	1,14	1,052	
IKZF1_ex04	1,214	1,151	
IKZF1_ex05	1,055	1,031	
IKZF1_ex06	1,024	0,924	
IKZF1_ex07	1,401	1,303	
IKZF1_ex08	1,121	1,055	
JAK2_ex23	1,009	0,983	
CDKN2A_ex05	0	0	
CDKN2A_ex02	0,178	0,169	
CDKN2B_ex02	0,165	0	
PAX5_ex10	1,07	0,983	
PAX5_ex08	1,101	1,042	
PAX5_ex07	1,336	1,244	
PAX5_ex06	1,321	1,271	
PAX5_ex05	0,798	0,753	
PAX5_ex02	0,955	0,926	
PAX5_ex01	1,008	0,981	
ETV6_ex01A	1,249	1,172	
ETV6_ex01B	1,141	1,051	
ETV6_ex02	1,402	1,285	
ETV6_ex03	1,275	1,215	
ETV6_ex05	1,374	1,233	
ETV6_ex08	1,434	1,381	
BTG1-AREA_1	1,651	1,598	
BTG1-AREA_2	1,616	1,479	
BTG1_ex02	1,273	1,188	
BTG1_ex01	1,787	1,706	
RB1_ex06	0,971	0,93	
RB1_ex14	0,996	0,931	
RB1_ex19	1,183	1,096	
RB1_ex24	0,876	0,8	
RB1_ex26	0,877	0,794	
*Ctrl_01p21.1	0,802	0,77	
*Ctrl_02p16.1	0,787	0,705	
*Ctrl_02q24.3	1,322	1,255	
*Ctrl_03p12.2	1,151	1,032	
*Ctrl_03p25.3	0,899	0,832	
*Ctrl_03q12.2	0,847	0,763	
*Ctrl_07q11.23	1	0,982	
*Ctrl_09q34.3	0,985	0,927	
*Ctrl_11q12.3	0,997	0,961	
*Ctrl_15q21.1	0,836	0,78	
*Ctrl_16p13.2	1,162	1,139	
*Ctrl_19q13.43	0,921	0,834	
*Ctrl_20p13	1,212	1,104	

Naast de normalisatiemethode werden ook beide softwarepakketten (GeneMarker vs coffalyser.net) vergeleken. In bijlage D wordt een overzichtstabel van de geanalyseerde stalen weergegeven. Hieruit kan besloten worden dat er weinig verschil is in de resultaten gegenereerd door beide softwarepakketten. Omwille van de “in huis” voorkeur voor GeneMarker wordt beslist om met deze software verder te werken voor de MLPA-analyse van probemix P335-B1.

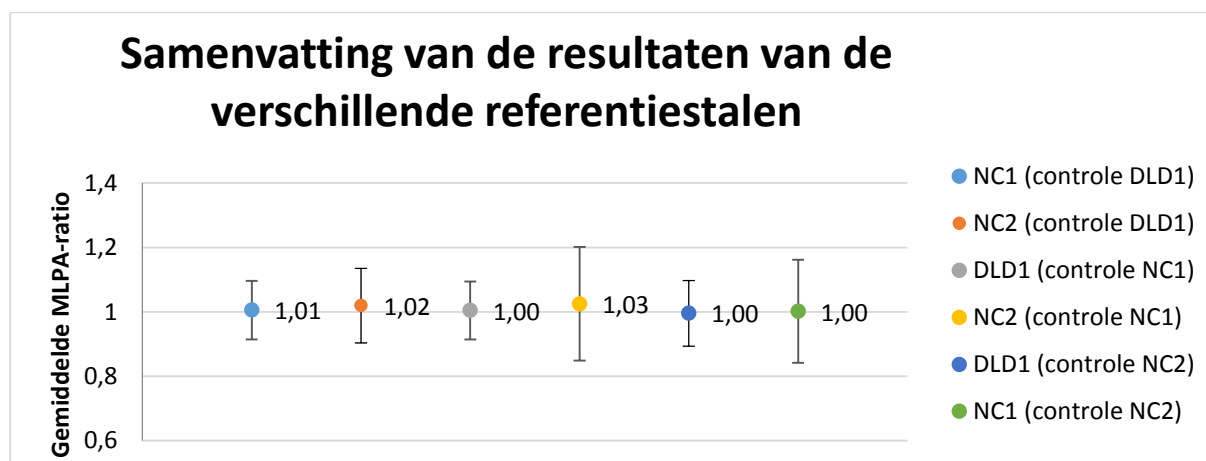
4.1.2 DLD1-cellijn als referentiestaal

We opteren om een cellijn te gebruiken als controlestaal omdat we hiervan onbeperkt DNA ter beschikking hebben. Omdat de DLD1-cellijn al voor vele andere diagnostische testen gebruikt wordt als negatieve controle, werken we hiermee verder. Om zeker te zijn dat de DLD1-cellijn een geschikte controle is, wordt een vergelijking met twee negatieve patiëntenstalen uitgevoerd (NC1 en NC2). Op basis van de klinische info waarover wij beschikken beschouwen we NC1 en NC2 als negatieve stalen.

We vertrekken van het bestaand “in huis” protocol en evalueren de kwaliteit van het verkregen resultaat. De size calling van de ruwe data en de normalisatie zijn succesvol. De controlefragmenten van de verschillende stalen voldoen aan de vereisten. Het protocol van MRC-Holland stelt dat voor de referentiestalen de standaardafwijking van alle probes kleiner of gelijk aan 0,1 moet zijn en dat er geen afwijkingen in de onderzochte regio’s mogen terug te vinden zijn.

De standaardafwijking van de referentiestalen is kleiner of gelijk aan de voorgeschreven 0,1. In vergelijking met NC1 en NC2 wordt bij DLD1 een amplificatie bij controlefragment 02p16.1 terug gevonden. Alle andere probes komen bij NC1 en DLD1 goed overeen. Bij NC2 worden er bij enkele targetprobes afwijkende resultaten gevonden. In onderstaande figuur wordt van elk referentiestaal de gemiddelde waarde van de probes samen met de standaardafwijking weergegeven. Dit toont aan dat voor DLD1 en NC1 de gemiddelde waarde het best aansluit bij 1 en de kleinste standaardafwijking heeft.

Op basis hiervan worden NC1 en de DLD1-cellijn als negatieve controles geselecteerd.



Figuur 33: Gemiddelde waarde en standaardafwijking van alle probes voor drie referentiestalen (DLD1, NC1 en NC2)

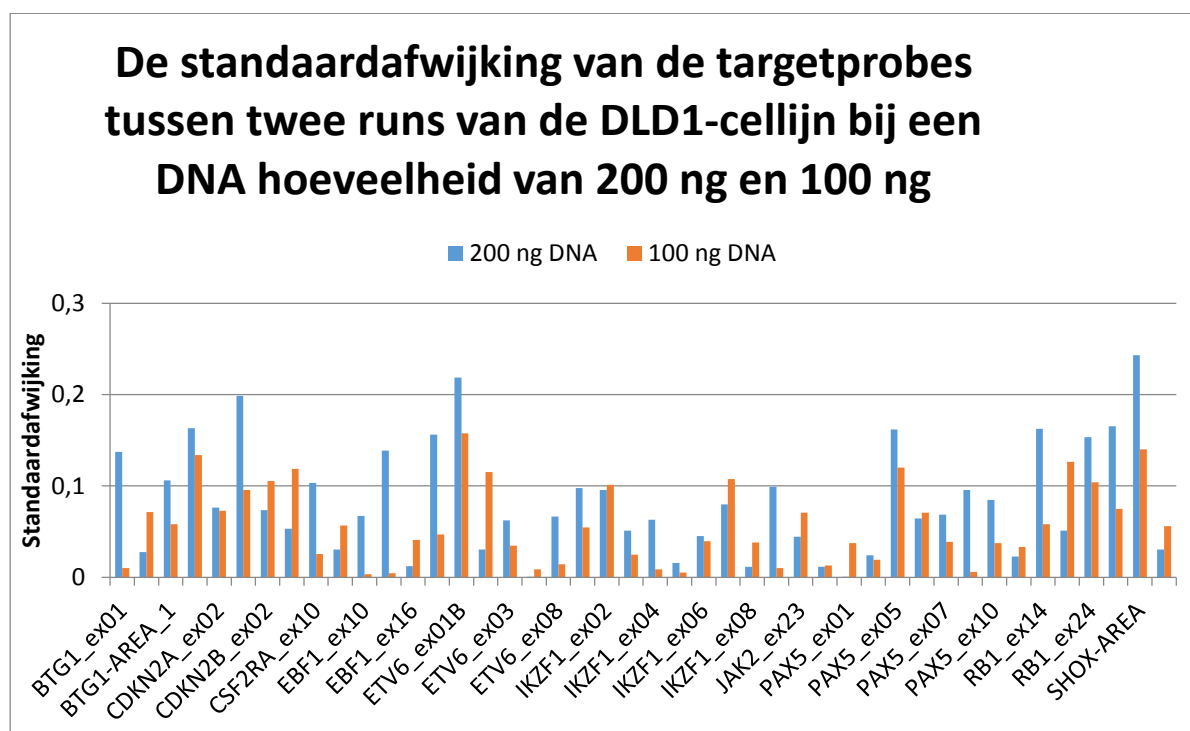
4.1.3 Optimale DNA hoeveelheid

De aanbevolen hoeveelheid DNA is gelegen tussen 50 en 250 ng. Wij evalueren welke de optimale hoeveelheid DNA is om deze test uit te voeren. Hiervoor worden de resultaten van de DLD1-cellijn van twee verschillende runs met een DNA hoeveelheid van 200 en 100 ng met elkaar vergeleken. Zoals te zien is in onderstaande tabel is de standaardafwijking van alle probes binnen elke run iets kleiner bij 100 ng dan bij 200 ng DNA.

Tabel 16: Standaardafwijking van alle probes binnen elke run bij de DLD1-cel lijn.

De standaardafwijking van alle probes (zonder fragment 02p16.1)			
Herhaling van DLD1-cel lijn			
200 ng DNA		100 ng DNA	
RUN 1	RUN 2	RUN 1	RUN 2
0,095615708	0,090040215	0,088934966	0,079014677

De standaardafwijking van elke probe tussen de twee verschillende runs bij een DNA-concentratie van 200 en 100 ng is weergegeven in onderstaande figuur.



Figuur 34: Weergave standaardafwijking tussen twee runs van de DLD1-cel lijn bij een hoeveelheid DNA van 200 en 100 ng

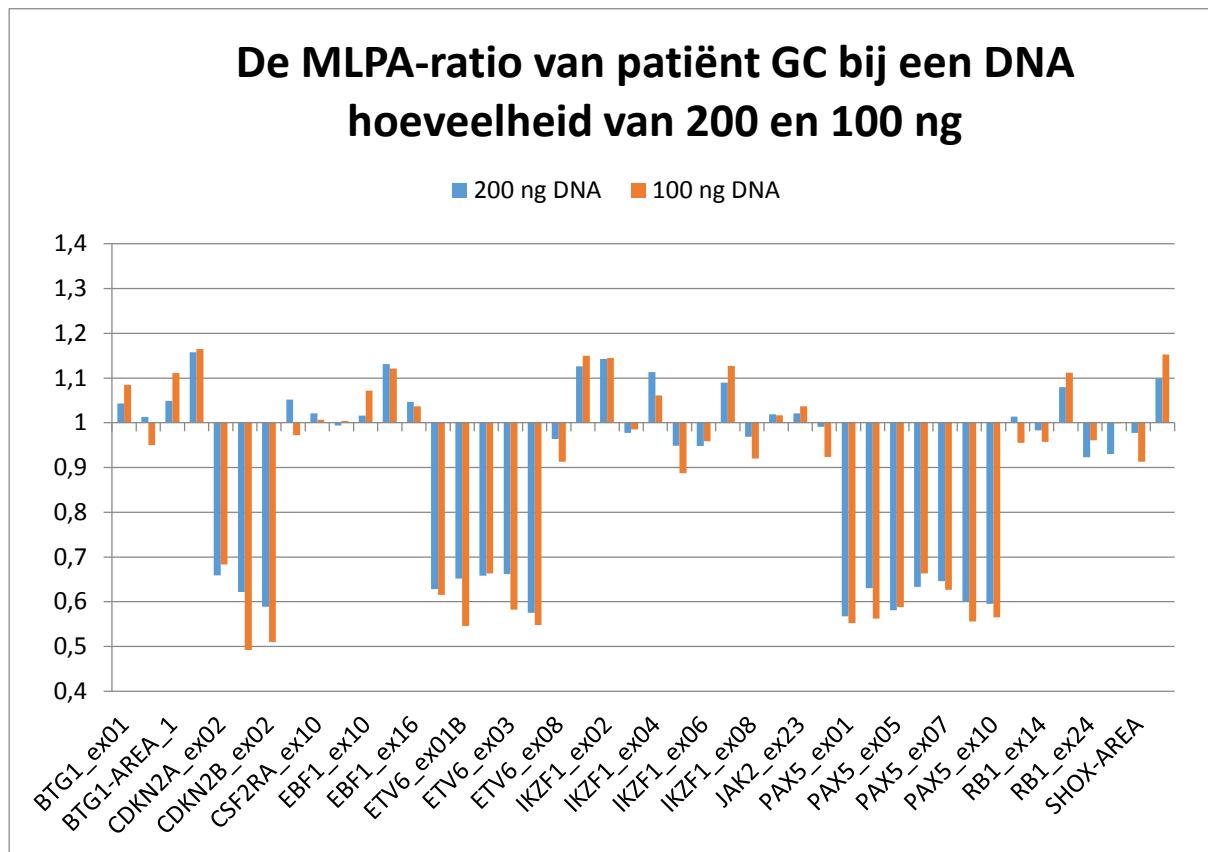
Het is duidelijk te zien dat de variatie tussen twee verschillende runs voor de meeste probes kleiner is bij een lagere hoeveelheid DNA.

Daarnaast werd één patiënt driemaal herhaald bij een hoeveelheid DNA van 200 en 100 ng. De standaardafwijking van de referentieprobes zijn weergegeven in onderstaande tabel.

Tabel 17: Standaardafwijking van referentieprobes bij patiënt GC bij een hoeveelheid DNA van 200 en 100 ng

De standaardafwijkingen van de referentieprobes (zonder fragment 02p16.1)					
Herhaling van patiënt GC					
200 ng DNA			100 ng DNA		
RUN 1	RUN 2	RUN 3	RUN 1	RUN 2	RUN 3
0,383563752	0,077125635	0,288409	0,17504569	0,227619083	0,10274516

De standaardafwijking is duidelijk lager bij 100 ng DNA wat erop duidt dat de variatie binnen elke run kleiner is bij een lagere DNA-hoeveelheid. Wanneer de resultaten van run 2 bij 200 ng DNA en run 3 bij 100 ng DNA vergeleken worden, wordt bij beide runs analoge MLPA-ratio's bekomen. De gemiddelde MLPA-ratio's voor elke targetprobe van de twee runs bij de twee verschillende DNA-concentratie is weergegeven in onderstaande figuur.



Figuur 35: MLPA-ratio's van patiënt GC bij een DNA hoeveelheid van 200 en 100 ng

4.1.4 Getolereerde standaardafwijking

Volgens het protocol van MRC-Holland is de test betrouwbaar als de standaardafwijking van de referentieprobes kleiner of gelijk aan 0,1 is voor een patiëntenstaal en wanneer geen afwijkingen terug te vinden zijn in de referentieprobes.

Voor één patiënt werd de MLPA-assay driemaal herhaald bij een hoeveelheid DNA van 100 ng. De standaardafwijkingen van run 1, 2 en 3 zijn respectievelijk 0,18; 0,23 en 0,10. De waarden voor run 1 en 2 zijn dus groter dan de voorgeschreven 0,1. Bovendien zien we dat een test herhalen in dezelfde omstandigheden geen majeure invloed heeft op de standaardafwijking.

De richtlijn dat de standaardafwijking van de referentieprobes kleiner of gelijk aan 0,1 moet zijn, geldt voor alle MLPA-kits en houdt geen rekening met het aantal referentieprobes. In vergelijking met genetische aandoeningen is het aantal referentieprobes in tumor diagnostiek beduidend hoger omdat er een beduidend hoger risico is op CNA's in referentiegenen door de genetische instabiliteit van kwaadaardige cellen. Hierdoor verwachten we tussen de referentieprobes een toename in standaardafwijking. Op basis van onze data is een cut-off van 0,1 te streng en dient deze te worden aangepast. Wanneer de MLPA-ratio's van de drie runs

met elkaar vergeleken worden, wordt een volledig analoog resultaat gezien tussen run 1 en 3. Bij run 2 worden zeven amplificaties en één deletie terug gevonden, die niet worden gevonden bij run 1 en 3. De standaardafwijking van run 2 was beduidend groter dan bij de andere runs. Ook de standaardafwijking van run 1 was hoger dan de cut-off en mogen we volgens de MRC Holland richtlijn niet interpreteren hoewel het resultaat wel overeenkomt met run 3. Op basis hiervan en ten einde nodeloze herhalingen te vermijden, wordt de getolereerde standaardafwijking aangepast naar 0,2 omdat we hierbij nog betrouwbare resultaten krijgen. Is de standaardafwijking groter dan 0,2 dan wordt de test herhaald. Ook bij meerdere afwijkingen in de referentieprobes zoals het geval is bij run 2 wordt de test herhaald. De deletie bij controlefragment 02p16.1 is afkomstig van de amplificatie in DLD1 en wordt niet in rekening gebracht. De resultaten van de drie verschillende runs worden weergegeven in onderstaande tabel.

Tabel 18: Resultaten van patiënt GC voor drie verschillende runs

Probes	RUN 1	RUN 2	RUN 3		RUN 1	RUN 2	RUN 3
*Ctrl_01p21.1	0,841	0,755	0,927	Standaardafwijking tussen de referentieprobes (behalve ctrl 02p16.1)	0,175046	0,227619	0,102745
*Ctrl_02p16.1	0,701	0,783	0,707	Gemiddeldewaarde van de referentieprobes	0,982909	0,965818	0,957636
*Ctrl_02q24.3	1,192	1,435	1,23				
*Ctrl_03p12.2	1,058	1,15	1,012	Amplificatie			
*Ctrl_03p25.3	0,791	0,75	0,87	Monoallelische deletie			
*Ctrl_03q12.2	1,156	0,839	0,94	biallelische deletie			
*Ctrl_07q11.23	0,82	0,915	0,892				
*Ctrl_09q34.3	1,135	0,992	0,982				
*Ctrl_11q12.3	1,174	1,049	1				
*Ctrl_15q21.1	0,819	0,779	0,908				
*Ctrl_16p13.2	1,125	1,177	1,066				
*Ctrl_19q13.43	1,257	1,083	0,922				
*Ctrl_20p13	1,183	1,345	1,092				
BTG1_ex01	1,102	1,221	1,085				
BTG1_ex02	1,029	0,935	0,95				
BTG1-AREA_1	1,123	1,083	1,111				
BTG1-AREA_2	1,14	1,5	1,165				
CDKN2A_ex02	0,657	0,749	0,683				
CDKN2A_ex05	0,478	0,444	0,492				
CDKN2B_ex02	0,516	0,489	0,51				
CRLF2_ex04	1,006	1,053	0,972				
CSF2RA_ex10	1,21	1	1,007				
EBF1_ex01	1,096	0,98	1,004				
EBF1_ex10	1,093	1,07	1,072				
EBF1_ex14	1,276	1,139	1,121				
EBF1_ex16	0,985	0,895	1,037				
ETV6_ex01A	0,742	0,543	0,615				
ETV6_ex01B	0,632	0,544	0,546				
ETV6_ex02	0,652	0,714	0,663				
ETV6_ex03	0,735	0,588	0,582				
ETV6_ex05	0,489	0,531	0,548				
ETV6_ex08	0,961	0,953	0,913				
IKZF1_ex01	1,161	1,389	1,15				
IKZF1_ex02	1,015	1,435	1,145				
IKZF1_ex03	1,06	1,03	0,985				
IKZF1_ex04	1,162	1,243	1,061				
IKZF1_ex05	0,956	0,847	0,887				
IKZF1_ex06	1,156	0,943	0,959				
IKZF1_ex07	1,061	1,476	1,127				
IKZF1_ex08	1,002	0,817	0,92				
IL3RA_ex01	1,225	0,939	1,017				
JAK2_ex23	1,124	1,107	1,037				
P2RY8_ex02	1,025	0,905	0,924				
PAX5_ex01	0,575	0,514	0,552				
PAX5_ex02	0,634	0,597	0,562				
PAX5_ex05	0,605	0,576	0,588				
PAX5_ex06	0,703	0,735	0,663				
PAX5_ex07	0,688	0,759	0,627				
PAX5_ex08	0,544	0,594	0,556				
PAX5_ex10	0,598	0,547	0,565				
RB1_ex06	0,949	0,833	0,955				
RB1_ex14	1,239	0,885	0,957				
RB1_ex19	1,228	1,232	1,112				
RB1_ex24	0,903	0,769	0,961				
RB1_ex26	1,1	0,773	0,999				
SHOX-AREA	0,773	0,686	0,913				
ZFY_ex04	1,31	1,308	1,153				

4.1.5 Besluit optimalisatie

In de eerste plaats is uit onze optimalisatie gebleken dat tussen resultaten gegenereerd met coffalyser.net of Genemarker weinig variatie terug te vinden is. Door onze voorkeur voor GeneMarker wordt de MLPA-analyse hiermee uitgevoerd. Er wordt bovendien geopteerd om met populatie normalisatie te werken. Daarnaast kunnen we besluiten dat de DLD1-celijn geschikt is als referentiestaal. Vermits de DLD1-celijn onbepaald beschikbaar is, wordt bij elke run de DLD1-celijn naast een negatief patiëntenstaal meegenomen als referentiestaal. Ook zien we dat de variatie binnen één run en tussen verschillende runs lager is bij 100 ng DNA in vergelijking met 200 ng DNA. Bij beide hoeveelheden is de nauwkeurigheid even groot. Tot slot zien we dat een standaardafwijking van 0,1 tussen de referentieprobes onhaalbaar is voor onze experimentele opzet. Uit de resultaten blijkt dat de resultaten nog betrouwbaar zijn wanneer de cut-off waarde verhoogd wordt tot 0,2.

4.2 Testen van patiëntenstalen

4.2.1 Testpopulatie

In totaal werden 12 BCP-ALL-patiënten getest. Het materiaal dat hiervoor gebruikt werd, is restmateriaal van de diagnostische work-up die werd uitgevoerd bij de initiële presentatie van de patiënt. In bijlage E is een tabel te vinden met de diagnostische informatie van de geanalyseerde stalen.

4.2.2 Overzicht resultaten

Er wordt 100 ng DNA gebruikt omdat uit de optimalisatie is gebleken dat hierbij de variatie binnen dezelfde run en tussen verschillende runs goede resultaten geeft (zie § 4.1.3 Optimale DNA hoeveelheid). Voor de analyse wordt GeneMarker (populatie normalisatie) gebruikt en er wordt steeds genormaliseerd t.o.v. de DLD1-celijn. Naast de DLD1-celijn wordt steeds patiënt LA meegenomen als tweede referentiestaal zodat de DLD1-celijn hiermee kan vergeleken worden. Bij elk run wordt ook water meegenomen als no-DNA controle.

De test wordt aanvaard als binnen de uitgevoerde run de standaardafwijking tussen alle probes bij referentiestaal DLD1 lager of gelijk is aan 0,1 en de standaardafwijking tussen de referentieprobes (behalve fragment 02p16.1) voor elk BCP-ALL staal kleiner of gelijk is aan 0,2. Wanneer aan deze criteria niet voldaan werd, werd het staal een tweede maal geanalyseerd. Op basis van deze criteria moesten twee stalen (patiënt DLF en BA) herhaald worden. Na de tweede analyse werden de vooropgestelde criteria wel behaald en was duidelijk op te merken dat de eerste MLPA-analyse foutieve resultaten gaf. In de onderstaande resultaten zijn enkel de resultaten die voldeden aan deze criteria weergegeven.

De size calling die door de software uitgevoerd en gecontroleerd wordt, was bij alle stalen geslaagd. Daarnaast was de MLPA-score voor alle stalen in orde (boven de threshold van 10), ook voor de no-DNA controle waar de MLPA-score nul moet bedragen. Er wordt wel opgemerkt dat bij stalen waar veel monoallelische deleties aanwezig zijn, de normalisatie twijfelachtig is. Bij één staal waar meerdere biallelische deleties aanwezig waren, gaf de

software aan dat de normalisatie faalde. Maar zoals beschreven bij de § 3.1.3 Methoden is dit te wijten aan de hoge aantal deleties.

Tot slot moeten de controlefragmenten die aanwezig zijn in de probemix voldoen aan de gestelde eisen. Bij al de uitgevoerde stalen waren de controlefragmenten in orde.

In onderstaande tabel worden de resultaten van de MLPA-assay weergegeven.

Tabel 19: MLPA-resultaat van 12 BCP-ALL-patiënten

PAR1 regio										
naam patient	SHOX-AREA	CRLF2_ex04	CSF2RA_ex10	IL3RA_ex01	P2RY8_ex02	ZFY_ex04	EBF1_ex16	EBF1_ex14	EBF1_ex10	EBF_ex01
AE	1,057	1,031	1,052	1,054	1,065	1,098	1,151	1,114	1,115	1,062
BA	1,354	1,121	1,099	1,145	1,121	0	1,137	1,193	1,003	1,084
BS	1,156	1,693	1,576	1,45	1,44	0	1,131	1,258	1,171	1,177
CR	1,311	1,079	1,056	1,069	1,106	0,938	1,064	1,092	0,98	1,122
DCJ	0,846	1,264	1,111	0,856	1,037	0	0,904	1,07	1,036	1,11
DCT	1,332	1,112	1,036	1,007	1,21	0,954	1,082	1,127	1,083	1,214
DLF	1,288	1,01	0,744	0,82	0,75	1,03	0,992	1,144	0,884	1,019
GC	0,913	0,972	1,007	1,017	0,924	1,153	1,037	1,121	1,072	1,004
JM	1,63	1,341	1,202	1,266	1,476	0	1,06	0,986	1,06	1,121
MC	1,17	1,044	1,33	1,397	1,483	0,917	0,967	0,983	0,885	1,103
VG	1,057	1,093	1,039	0,996	1,003	0	1,022	1,042	1,134	1,013
VST	1,489	1,265	1,096	1,237	1,362	0,862	1,116	1,008	1,036	1,11
IKZF1 gen										
naam patient	IKZF1_ex01	IKZF1_ex02	IKZF1_ex03	IKZF1_ex04	IKZF1_ex05	IKZF1_ex06	IKZF1_ex07	IKZF1_ex08		
AE	0,584	0,617	0,603	0,631	0,589	0,557	0,568	0,571		
BA	0,586	0,066	0	0,62	0,634	0,519	0,571	0,614		
BS	0,71	0,663	0,721	0,693	0,622	0,656	0,68	0,545		
CR	0,859	0,824	1,074	0,932	1,096	1,091	0,781	1,196		
DCJ	1,321	1,32	1,052	1,151	1,031	0,924	1,303	1,055		
DCT	0,734	0,453	0,535	0,758	0,874	0,822	0,65	0,978		
DLF	0,997	0,938	0,959	0,892	1,045	1,042	0,862	1,165		
GC	1,15	1,145	0,985	1,061	0,887	0,959	1,127	0,92		
JM	0,908	0,853	1,004	0,939	0,968	1,006	0,777	1,186		
MC	1,015	0,967	0,964	1,007	0,922	1,114	0,834	1,215		
VG	1,07	1,127	0,923	1,025	0,923	1,013	1,039	0,953		
VST	0,897	0,807	1,081	0,912	1,051	1,008	0,762	1,196		
CDKN2A/B gen				MLPA-grensen						
naam patient	JAK2_ex23	CDKN2A_ex05	CDKN2A_ex02	CDKN2B_ex02						
AE	0,575	0,54	0,652	0	> 1,3					
BA	1,114	0,635	0	0	0,75-1,3					
BS	1,137	0,468	0,73	0,547	0,75-0,25					
CR	0,529	0,183	0,18	0,208	< 0,25					
DCJ	0,983	0	0,169	0						
DCT	1,005	1,177	1,062	1,245						
DLF	1,071	0,85	0,67	1,097						
GC	1,037	0,492	0,683	0,51						
JM	0,824	1,223	1,046	1,058						
MC	0,913	1,297	0,998	1,132						
VG	1,08	1,07	1,107	0,99						
VST	0,907	1,071	0,976	1,072						
PAX5 gen										
naam patient	PAX5_ex10	PAX5_ex08	PAX5_ex07	PAX5_ex06	PAX5_ex05	PAX5_ex02	PAX5_ex01			
AE	0,567	0,596	0,565	0,617	0,522	0,578	0,563			
BA	0,534	0,684	0,664	0,593	0,572	0,572	0,597			
BS	1,074	1,12	1,234	1,175	0,876	0,876	0,983			
CR	0,591	0,707	0,601	0,591	0,58	0,532	0,608			
DCJ	0,983	1,042	1,244	1,271	0,753	0,926	0,981			
DCT	1,083	1,155	1,082	1,003	0,928	0,99	0,927			
DLF	0,956	1,081	1,168	0,937	0,655	0,672	0,701			
GC	0,565	0,556	0,627	0,663	0,588	0,562	0,552			
JM	1,171	1,202	1,081	0,988	0,838	0,943	0,966			
MC	1,109	1,079	1,205	1,03	0,817	0,922	0,967			
VG	0,991	0,949	1,056	1,04	0,842	1,003	0,966			
VST	1,074	1,2	1,064	0,973	0,897	1	1,067			
ETV6 gen										
naam patient	ETV6_ex01A	ETV6_ex01B	ETV6_ex02	ETV6_ex03	ETV6_ex05	ETV6_ex08				
AE	1,001	0,933	1,051	0,983	0,999	1,051				
BA	0,547	0,594	0,938	1,151	0,991	1,05				
BS	0,912	0,773	1,123	1,125	1,081	1,105				
CR	1,068	1,055	0,973	1,117	1,134	1,026				
DCJ	1,172	1,051	1,285	1,215	1,233	1,381				
DCT	0,805	0,783	0,488	0,595	0,565	0,521				
DLF	1,105	1,17	0,917	1,152	1,023	0,969				
GC	0,615	0,546	0,663	0,582	0,548	0,913				
JM	0,967	0,966	0,908	0,966	1,238	0,936				
MC	0,997	0,941	0,788	1,005	1,132	0,785				
VG	0,943	0,963	1,022	1,018	0,89	0,929				
VST	0,941	0,961	0,911	0,995	1,176	0,984				
BTG1 gen										
naam patient	BTG1-AREA_1	BTG1-AREA_2	BTG1_ex02	BTG1_ex01	RB1_ex06	RB1_ex14	RB1_ex19	RB1_ex24	RB1_ex26	
AE	1,182	0,634	0,573	1,164	1,052	1,043	1,063	1,063	1,049	
BA	1,058	0,632	0,614	1,093	1,064	1,14	1,149	1,034	0,982	
BS	1,254	1,254	0,932	1,295	1,035	1,102	1,163	0,899	0,913	
CR	1,05	0,733	0,979	0,915	1,181	1,25	0,911	1,119	1,165	
DCJ	1,598	1,479	1,188	1,706	0,93	0,931	1,096	0,8	0,794	
DCT	1,126	0,792	0,995	1,032	1,158	1,105	0,815	0,889	0,878	
DLF	0,977	0,877	1	0,959	1,094	1,102	1,038	1,168	1,04	
GC	1,111	1,165	0,95	1,085	0,955	0,957	1,112	0,961	0,999	
JM	1,047	0,702	1,025	1,02	1,14	1,061	0,833	0,966	0,973	
MC	1,047	0,686	0,994	0,969	1,168	1,038	0,96	0,881	0,973	
VG	1,092	1,077	1,006	1,095	0,963	0,925	1,054	0,909	0,968	
VST	1,05	0,713	0,979	0,969	1,158	1,088	0,868	0,939	0,973	

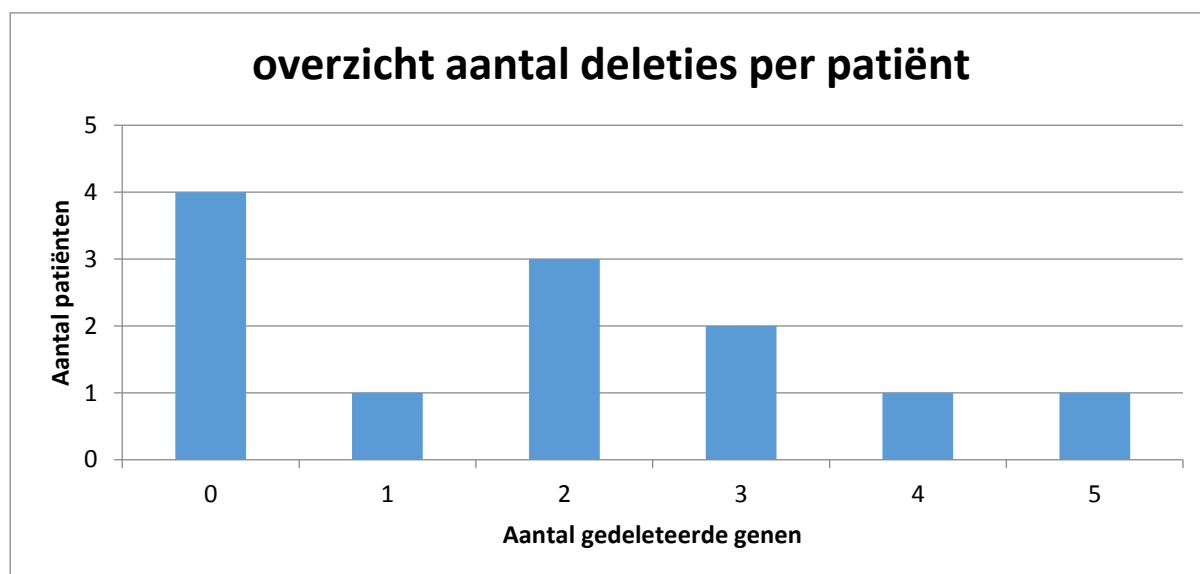
Bij het interpreteren van het MLPA resultaat moet ook steeds in het achterhoofd gehouden worden dat niet alle afwijkingen die gedetecteerd worden met MLPA pathoog zijn. De submicroscopische chromosomale afwijkingen die met deze kit opgespoord worden zijn voornamelijk deleties. Enkel amplificaties van *PAX5* exons werden eerder beschreven in de literatuur en zijn klinisch relevant. Amplificaties in de andere genen worden dan ook buiten beschouwing gelaten voor de interpretatie van de resultaten. Ook wanneer enkel de *BTG2* area gedeleteerd is, wordt dit niet weerhouden.

Van de 12 geteste BCP-ALL-patiënten vertonen acht patiënten klinisch relevante CNA's. In GeneMarker kan van elke patiënt een analyserapport worden aangemaakt waarop het piekpatroon, de ratioplot en de MLPA-ratio's weergegeven worden. In bijlage F worden de analyserapporten van acht patiënten waarbij verschillende CNA's gedetecteerd werden weergegeven. In onderstaande tabel wordt de frequentie van de gedeleteerde genen weergegeven. Ondanks de kleine populatie waarmee de test werd uitgevoerd, komt de onderlinge verhouding goed overeen met de literatuur.

Tabel 20: Frequenties van de gevonden deleties in vergelijking met cijfers uit de literatuur

	Aantal deleties	Incidentie volgens de literatuur (%) ¹
CDKN2A/B gen	7	27
PAX5 gen	5	19
IKZF1 gen	4	13
ETV6 gen	3	22
BTG1 gen	2	6
PAR1-regio	1	4
RB1 gen	0	7
EBF1 gen	0	2

Zoals in onderstaand staafdiagram te zien is, varieert het aantal CNA's per patiënt van 0 tot 5.



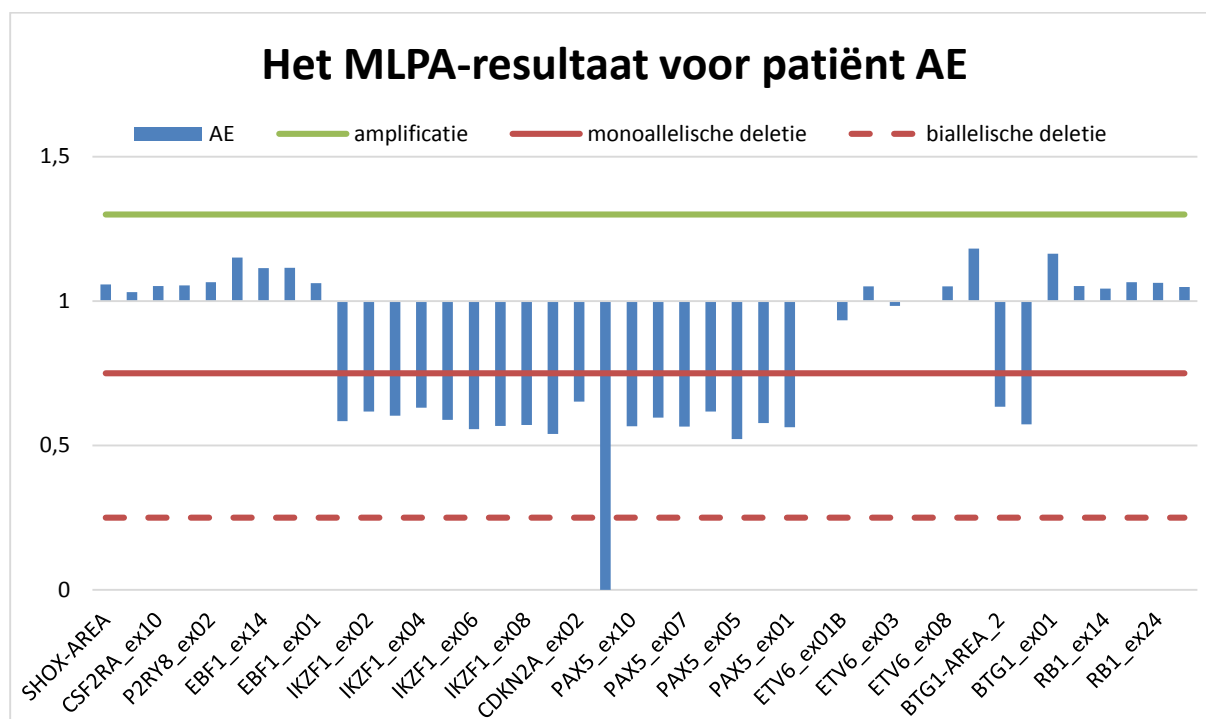
Figuur 36: Weergave van het aantal deleties per patiënt

¹ Dit is de incidentie van 1363 deleties gedetecteerd bij kinderen met BCP-ALL.

De acht patiënten waarbij verschillende CNA's gevonden zijn, worden hieronder apart besproken.

Patiënt AE

Deze patiënt heeft 89 % blasten en met FISH werd een partiële deletie van 9p vastgesteld. Daarnaast is deze patiënt ook BCR-ABL1 e1a2 positief. Een overzicht van het MLPA resultaat wordt gegeven in onderstaande grafiek. In de grafiek zijn de MLPA-probes gerangschikt volgens chromosomale richting te beginnen met de geslachtschromosomen gevolgd door chromosoom 7, 9, 12 en 13. Enkel de targetprobes worden weergegeven.

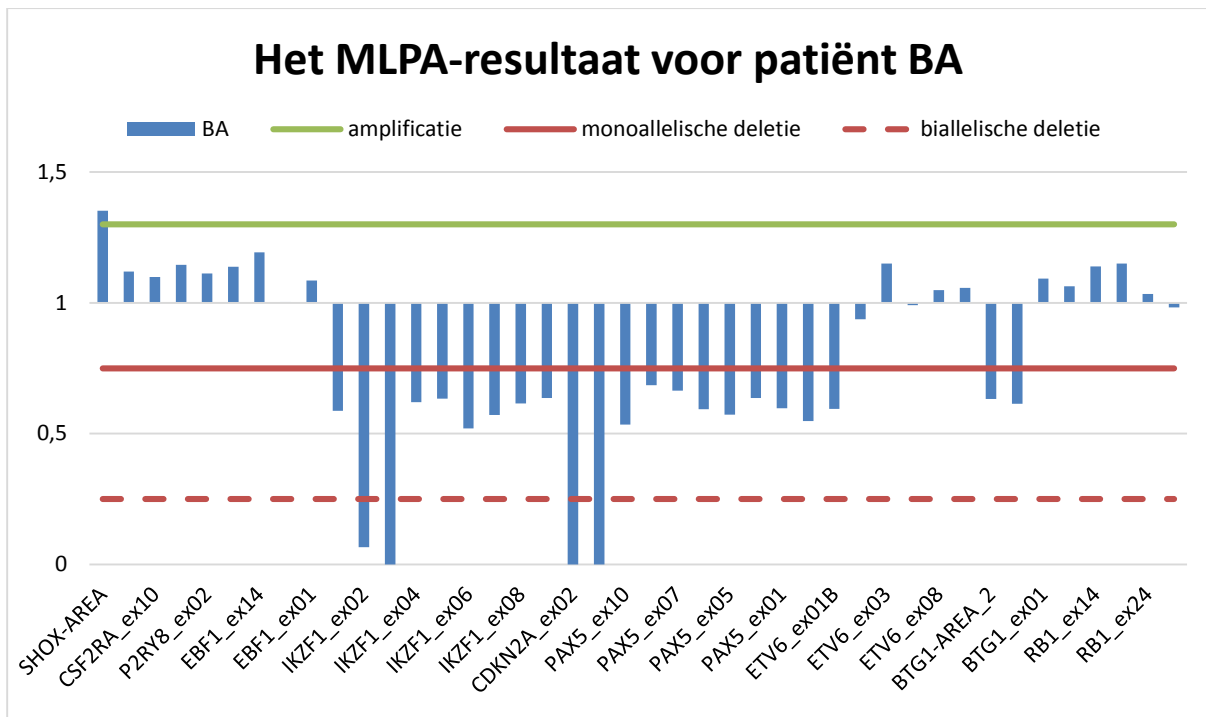


Figuur 37: MLPA resultaat van patiënt AE

De deletie van *CDKN2A/B* en *PAX5* die gevonden wordt met MLPA bevestigt de partiële deletie van 9p, gedetecteerd met FISH. Daarnaast worden nog monoalleleische deleties teruggevonden in *IKZF1* exon 1-8 en *BTG1* exon 2 en area 2. Deze deleties zijn vaak geassocieerd met BCR-ABL1+ ALL. Deleties in *IKZF1* vergroten bovendien het risico op herhal bij patiënten met BCR-ABL1+ ALL.

Patiënt BA

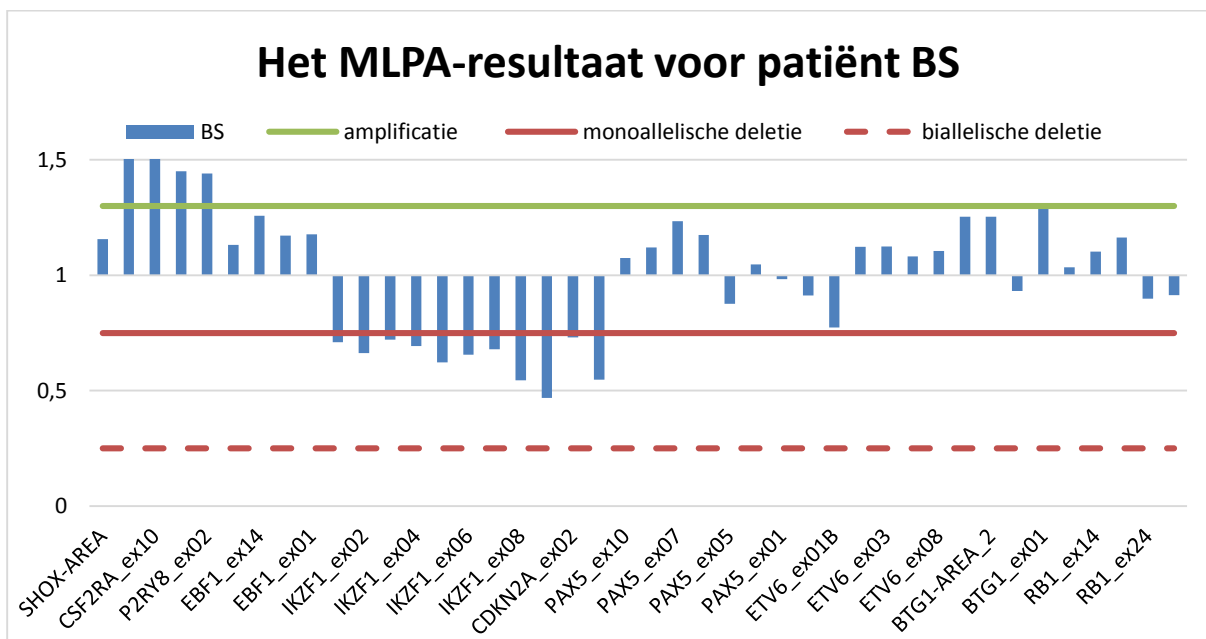
Deze patiënt heeft 91 % blasten en vertoont met FISH een monoalleleische deletie van *CDKN2A* en een breekpunt op 14q32. Zoals in onderstaande grafiek te zien is, wordt in *IKZF1* een deletie gevonden van exon 1 tot 8 waarvan de deletie van exon 2 en 3 biallelisch zijn. *CDKN2A* exon 2 en *CDKN2B* exon 2 vertonen een bialleleische deletie terwijl dat *CDKN2A* exon 5 een monoalleleische deletie vertoont wat het FISH resultaat bevestigt. Daarnaast wordt er nog een deletie teruggevonden in *PAX5* exon 1-10, *ETV6* exon 01a en 01b en *BTG1* area 2 en exon 2.



Figuur 38: MLPA resultaat van patiënt BA

Patiënt BS

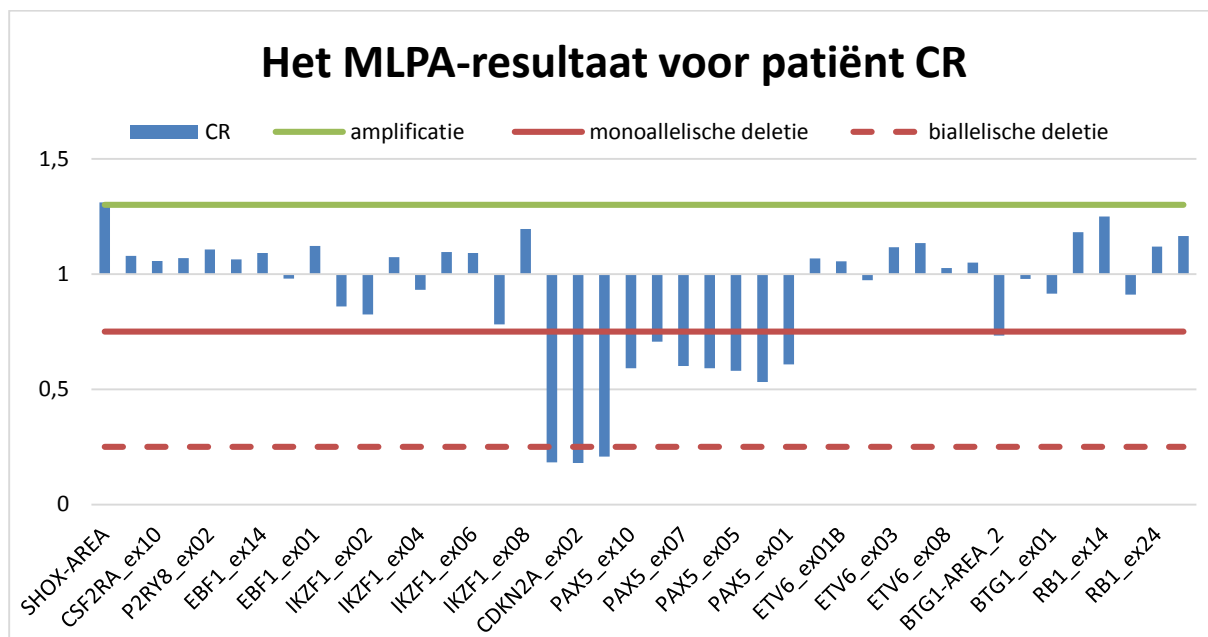
Deze patiënt heeft 98 % blasten en vertoont met FISH hyperdiploïdie en een deletie van *CDKN2A*. Zoals in onderstaande figuur te zien is, worden deleties in *IKZF1* exon 1-8, *CDKN2A* exon 2 en 5 en *CDKN2B* exon 2 teruggevonden. Met MLPA wordt de deletie van *CDKN2A* gedetecteerd met FISH bevestigd. Hyperdiploïdie werd niet gevonden met de MLPA maar deze assay is dan ook niet geschikt voor de opsporing van numerieke chromosoomafwijkingen.



Figuur 39: MLPA resultaat van patiënt BS

Patiënt CR

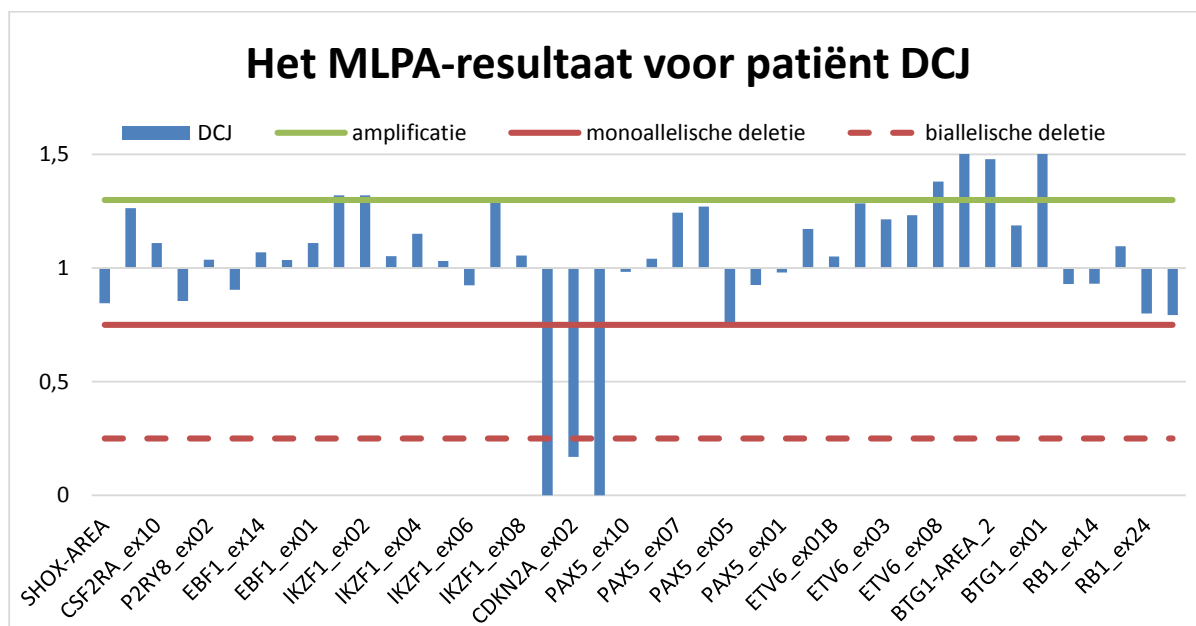
Het percentage blasten is bij deze patiënt 90 %. Zoals in onderstaande figuur te zien is, worden deleties in *CDKN2A* exon 2 en 5, *CDKN2B* exon 2 en *PAX5* exon 1-10 teruggevonden. Dit ligt in de lijn van de FISH resultaten waarbij afwijkingen in 9p gevonden werden.



Figuur 40: MLPA resultaat van patiënt CR

Patiënt DCJ

Deze patiënt heeft 93 % blasten en vertoont met FISH een partiële trisomie van chromosoom 9 en een deletie van *CDKN2A*. Zoals in onderstaande ratioplot te zien is, worden monoallelische deleties teruggevonden in *CDKN2A/B*.



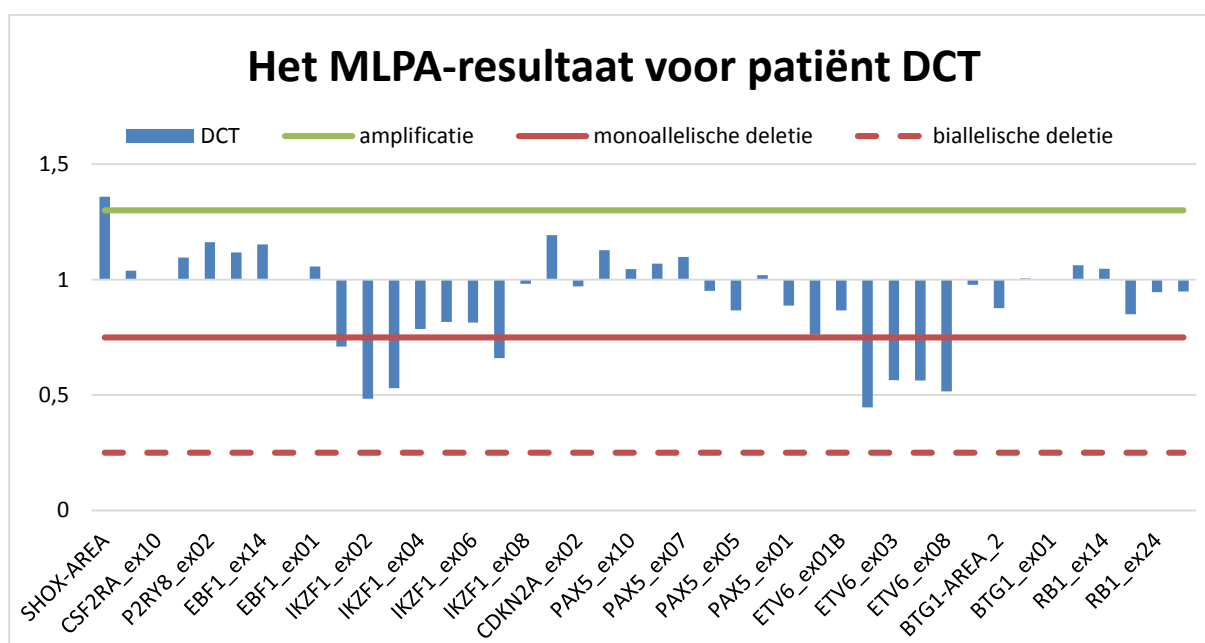
Figuur 41: MLPA resultaat van patiënt DCJ

Patiënt DCT

Deze patiënt heeft een percentage blasten van 53 % en vertoont een pseudodiploïd karyotype. Zoals in onderstaande figuur te zien is, worden deleties terug gevonden in *ETV6* exon 2, 3, 5 en 8 en *IKZF1* exon 1, 2, 3 en 7. Exon 4, 5 en 6 zijn niet gedeleteerd volgens de MLPA. Ook na meermaals herhalen wordt hetzelfde resultaat bekomen. De MLPA-ratio van deze exons liggen wel dicht bij de cut-off-waarde van 0,75.

	MLPA-ratio
IKZF1_ex01	0,734
IKZF1_ex02	0,453
IKZF1_ex03	0,535
IKZF1_ex04	0,758
IKZF1_ex05	0,874
IKZF1_ex06	0,822
IKZF1_ex07	0,65
IKZF1_ex08	0,978

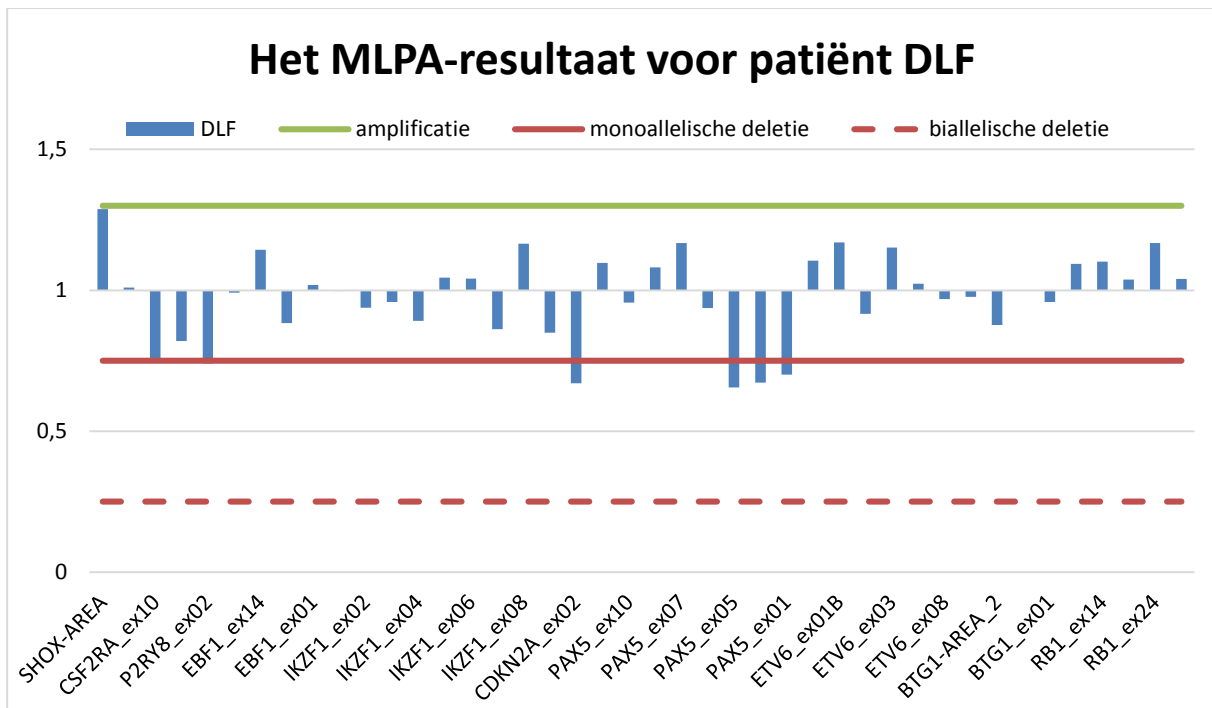
Tabel 21: MLPA-ratio voor *IKZF1* van patiënt GC



Figuur 42: MLPA resultaat van patiënt DCT

Patiënt DLF

Deze patiënt heeft een percentage blasten van 93 % en vertoont met karyotypering een hyperdiploïd signaal. Zoals in onderstaande figuur te zien is, worden deleties terug gevonden in de *PARI*-regio, *CDKN2A* exon 2 en *PAX5* exon 1, 2 en 5.



Figuur 43: MLPA resultaat van patiënt DLF

Zoals in bovenstaande figuur te zien is, is *CSF2RA* en *P2RY8* gedeleteerd terwijl dat het tussenliggende *IL3RA* niet gedeleteerd is. Daarom werd de MLPA herhaald voor dit staal. De MLPA-ratio van beide runs voor de *PAR1*-regio wordt hieronder weergegeven.

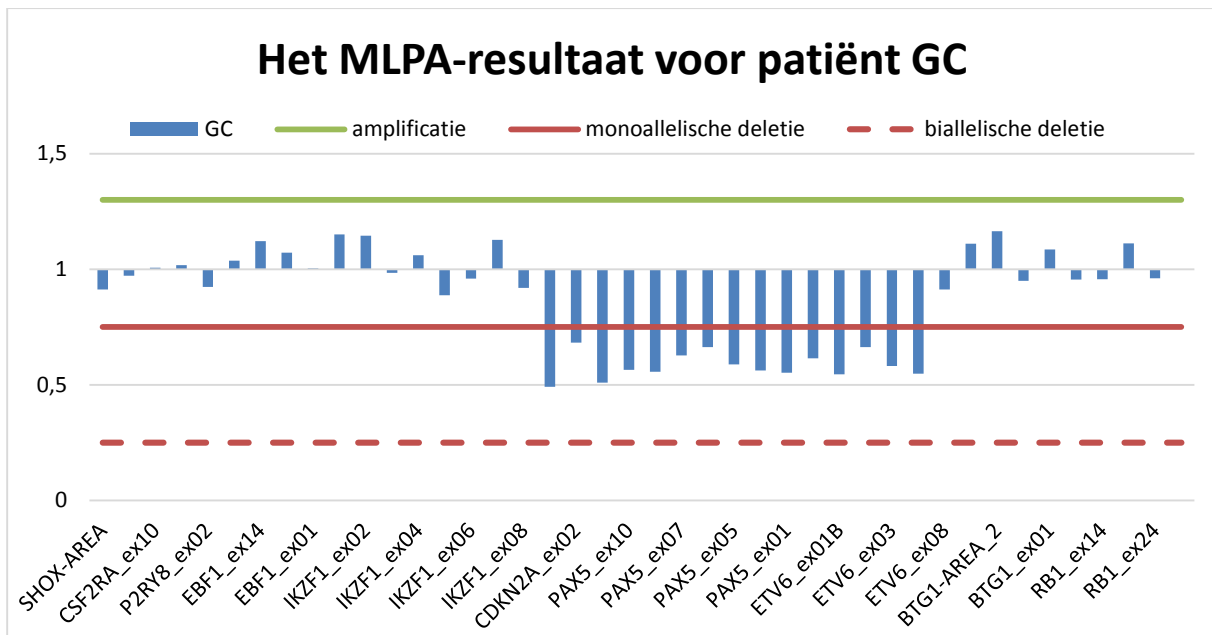
Tabel 22: MLPA-ratio van de *PAR1*-regio voor patiënt DLF

PAR1 regio	RUN 1	RUN 2
SHOX-AREA	1,288	1,382
CRLF2_ex04	1,01	0,995
CSF2RA_ex10	0,744	0,713
IL3RA_ex01	0,82	0,719
P2RY8_ex02	0,741	0,758
ZFY_ex04	1,03	0,891

Bij herhaling wordt een verschillend resultaat bekomen. De MLPA-ratio in run 1 voor *IL3RA* ex1 en in run 2 voor *P2RY8* ex2 liggen net boven de grenswaarde van 0,75. Waarschijnlijk zijn *CSF2RA*, *IL3RA* en *P2RY8* gedeleteerd maar deze conclusie is pas mogelijk na herhaling. Dit toont aan dat de MLPA-ratio steeds met een kritisch oog bekeken moet worden.

Patiënt GC

Deze patiënt heeft 86 % blasten en vertoont een t(12;21) en een extra kopie van chromosoom 21. Zoals in onderstaande figuur te zien is, worden deleties terug gevonden in *CDKN2A/B*, *PAX5* ex1-10 en *ETV6* ex1-5.



Figuur 44: MLPA resultaat van patiënt GC

4.3 Validatie

Vermits de MLPA-assay geen CE-gelabelde kit is, moet deze test aan een grondige validatie onderworpen worden vooraleer de implementatie in een geaccrediteerd laboratorium kan plaats vinden. De validatie gebeurt door de juistheid, intra-run en inter-run variatie van de resultaten te controleren. Voor de validatie worden enkel stalen gebruikt waarvoor de standaardafwijking tussen de referentieprobes kleiner of gelijk is aan 0,2. Daarnaast moet de size calling geslaagd zijn en moeten de controlefragmenten aan de vooropgestelde eisen voldoen.

4.3.1 Juistheid

Bij de validatie van een nieuwe test hoort een onafhankelijke bevestiging van het resultaat. Voor een aantal patiënten kon een deel van het MLPA resultaat bevestigd worden aan de hand van beschikbare resultaten van karyotypering en FISH (zie § 4.2.2). Omdat we niet verder over deze technieken konden beschikken werd een alternatieve benadering gezocht. Naar analogie met de paper van Schwab et al [10] werd QPCR gebruikt om het MLPA resultaat voor *CDKN2A/B*, *PAX5* en *IKZF1* te bevestigen. Kanttekening hierbij is dat het QPCR protocol niet volledig geoptimaliseerd werd, omdat dit buiten het tijdsbestek en de scope van dit onderzoek ligt. Daarbij komt nog dat bij de QPCR het *CDKN2A* ex4 opgespoord wordt terwijl dat bij de MLPA-assay *CDKN2A* ex5 opgespoord wordt.

Voor 12 stalen werd het volledige MLPA resultaat bevestigd met QPCR. Vier stalen waren volledig negatief met zowel de MLPA als met de QPCR. De resultaten van de MLPA-assay en QPCR van de patiënten die meerdere deleties vertonen worden in onderstaande tabel weergegeven.

Patiënt AE	resultaat MLPA	resultaat PCR	Patiënt BA	resultaat MLPA	resultaat PCR	Patiënt BS	resultaat MLPA	resultaat PCR	Patiënt CR	resultaat MLPA	resultaat PCR
IKZF1ex2	0,617	0,682376017	IKZF1ex2	0,066	0,024768427	IKZF1ex2	0,663	0,473487677	IKZF1ex2	0,824	0,884497172
IKZF1ex3	0,603	0,558116749	IKZF1ex3	0	0,022686524	IKZF1ex3	0,721	0,401850872	IKZF1ex3	1,074	0,766449566
IKZF1ex4	0,631	0,503002978	IKZF1ex4	0,62	0,245644882	IKZF1ex4	0,693	0,499329986	IKZF1ex4	0,932	0,911467277
IKZF1ex5	0,589	0,680801213	IKZF1ex5	0,634	0,330941033	IKZF1ex5	0,622	0,563074914	IKZF1ex5	1,096	1,140444391
IKZF1ex6	0,557	0,51357214	IKZF1ex6	0,52	0,122822441	IKZF1ex6	0,656	0,396318472	IKZF1ex6	1,091	0,862300588
IKZF1ex7	0,568	0,744996479	IKZF1ex7	0,571	0,398130348	IKZF1ex7	0,68	0,589705049	IKZF1ex7	0,781	1,124743556
IKZF1ex8	0,571	0,676098576	IKZF1ex8	0,615	0,216331065	IKZF1ex8	0,545	0,582931708	IKZF1ex8	1,196	1,039768798
CDKN2Aex4	0,54	0,404806823	CDKN2Aex4	0,636	0,09351313	CDKN2Aex4	0,468	0,376676722	CDKN2Aex4	0,183	0,168746494
CDKN2Aex2	0,652	0,512386906	CDKN2Aex2	0	0,012441573	CDKN2Aex2	0,73	0,363006038	CDKN2Aex2	0,18	0,106549528
CDKN2Bex2	0	0,124306374	CDKN2Bex2	0	0,004200119	CDKN2Bex2	0,547	0,373642927	CDKN2Bex2	0,208	0,179608737
PAX5Ex10	0,567	0,558116749	PAX5Ex10	0,534	0,433662947	PAX5Ex10	1,074	0,910500754	PAX5Ex10	0,591	0,499860039
PAX5Ex8	0,596	0,525713984	PAX5Ex8	0,684	0,373189272	PAX5Ex8	1,12	0,861386201	PAX5Ex8	0,707	0,521086976
PAX5Ex6	0,617	0,638085923	PAX5Ex6	0,593	0,381030772	PAX5Ex6	1,175	1,024366599	PAX5Ex6	0,591	0,567593288
PAX5Ex5	0,522	0,569435943	PAX5Ex5	0,572	0,094818524	PAX5Ex5	0,876	0,832044224	PAX5Ex5	0,58	0,766449566
PAX5Ex2	0,578	0,591695307	PAX5Ex2	0,637	0,295468829	PAX5Ex2	1,047	1,107902205	PAX5Ex2	0,532	0,682595312
PAX5Ex1	0,563	0,494429155	PAX5Ex1	0,597	0,306224121	PAX5Ex1	0,983	1,633970238	PAX5Ex1	0,608	0,883174408
Patiënt DCI	resultaat MLPA	resultaat PCR	Patiënt DCT	resultaat MLPA	resultaat PCR	Patiënt DLF	resultaat MLPA	resultaat PCR	Patiënt GC	resultaat MLPA	resultaat PCR
IKZF1ex2	1,32	1,109294317	IKZF1ex2	0,453	0,466958299	IKZF1ex2	0,938	0,84565241	IKZF1ex2	1,145	1,196540037
IKZF1ex3	1,052	0,920741912	IKZF1ex3	0,535	0,374066228	IKZF1ex3	0,959	0,900087209	IKZF1ex3	0,985	1,050462593
IKZF1ex4	1,151	0,8384275	IKZF1ex4	0,758	0,381044736	IKZF1ex4	0,892	1,204251479	IKZF1ex4	1,061	1,031969925
IKZF1ex5	1,031	1,248274044	IKZF1ex5	0,874	0,706143007	IKZF1ex5	1,045	1,618663796	IKZF1ex5	0,887	1,92539374
IKZF1ex6	0,924	0,881297476	IKZF1ex6	0,822	0,471293914	IKZF1ex6	1,042	1,149869414	IKZF1ex6	0,959	1,207807108
IKZF1ex7	1,303	1,260484075	IKZF1ex7	0,65	0,78532712	IKZF1ex7	0,862	1,275859999	IKZF1ex7	1,127	1,644247811
IKZF1ex8	1,055	1,043931517	IKZF1ex8	0,978	0,602082166	IKZF1ex8	1,165	1,272915539	IKZF1ex8	0,92	1,470617773
CDKN2Aex4	0	0,121301279	CDKN2Aex4	1,177	0,969087579	CDKN2Aex4	0,85	0,337931646	CDKN2Aex4	0,492	0,173539181
CDKN2Aex2	0,169	0,10438599	CDKN2Aex2	1,062	1,095330026	CDKN2Aex2	0,67	0,655864653	CDKN2Aex2	0,683	0,339151082
CDKN2Bex2	0	0,010476737	CDKN2Bex2	1,245	1,266955299	CDKN2Bex2	1,097	1,246719316	CDKN2Bex2	0,51	0,615572207
PAX5Ex10	0,983	0,886791389	PAX5Ex10	1,083	0,946953588	PAX5Ex10	0,956	0,95360918	PAX5Ex10	0,565	0,567752215
PAX5Ex8	1,042	0,864537231	PAX5Ex8	1,155	0,8320251	PAX5Ex8	1,081	0,92967822	PAX5Ex8	0,556	0,508086066
PAX5Ex6	1,271	1,214194884	PAX5Ex6	1,003	1,077757267	PAX5Ex6	0,937	1,02678683	PAX5Ex6	0,663	0,507734215
PAX5Ex5	0,753	1,689582347	PAX5Ex5	0,928	1,293576723	PAX5Ex5	0,655	0,215357185	PAX5Ex5	0,588	0,251371725
PAX5Ex2	0,926	1,416041955	PAX5Ex2	0,99	1,081025041	PAX5Ex2	0,672	0,524095557	PAX5Ex2	0,562	0,28147724
PAX5Ex1	0,981	1,723467605	PAX5Ex1	0,927	1,030568908	PAX5Ex1	0,701	0,445946629	PAX5Ex1	0,552	0,095094386
Amplificatie Monoallelische deletie biallelische deletie											

Tabel 23: Vergelijkende tabel van resultaat MLPA-assay en QPCR voor acht patiënten

Voor drie stalen was er een verschil tussen het MLPA resultaat en de QPCR voor *CDKN2A* ex4/5 maar hier wordt niet verder op ingegaan vermits een ander exon werd onderzocht.

Voor patiënt DCT is er een afwijkend resultaat bij *IKZF1* ex4-5-6. Bij de MLPA is enkel *IKZF1* ex1-3-7 gedeleteerd terwijl met QPCR een deletie in *IKZF1* ex1 tot 7 detecteerd wordt. Ook na herhaling van de MLPA test, wordt hetzelfde resultaat bekomen. Zoals in onderstaande tabel te zien is, is voor *IKZF1* ex4-5-6 de MLPA-ratio wel dicht bij 0,75 gelegen.

	MLPA run 1	MLPA run 2	QPCR
IKZF1_ex02	0,484	0,453	0,466958
IKZF1_ex03	0,529	0,535	0,374066
IKZF1_ex04	0,786	0,758	0,381045
IKZF1_ex05	0,817	0,874	0,706143
IKZF1_ex06	0,814	0,822	0,471294
IKZF1_ex07	0,66	0,65	0,785327
IKZF1_ex08	0,982	0,978	0,602082

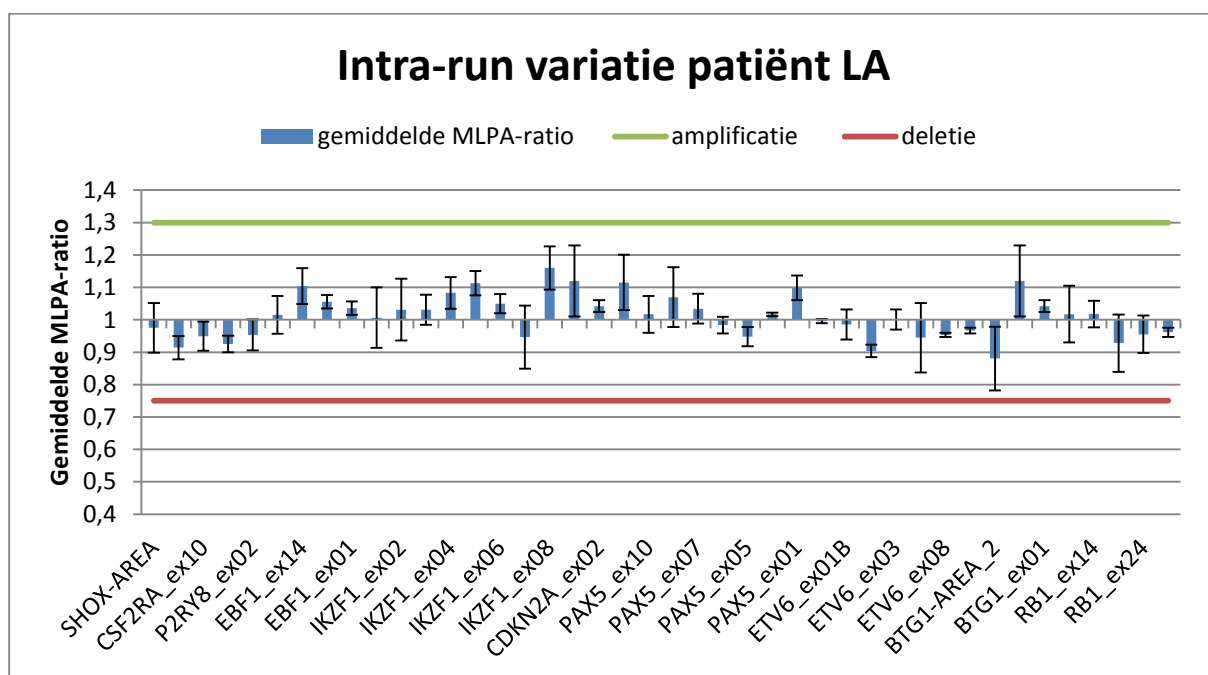
Tabel 24: Resultaat van MLPA-assay en QPCR voor *IKZF1* bij patiënt DCT

Vermoedelijk is het missen van deze deleties het gevolg van het laag aantal blasten (53 %) dat aanwezig is in het staal. Op basis van deze resultaten concluderen we dat *IKZF1* ex4-5-6 gedeleteerd zijn.

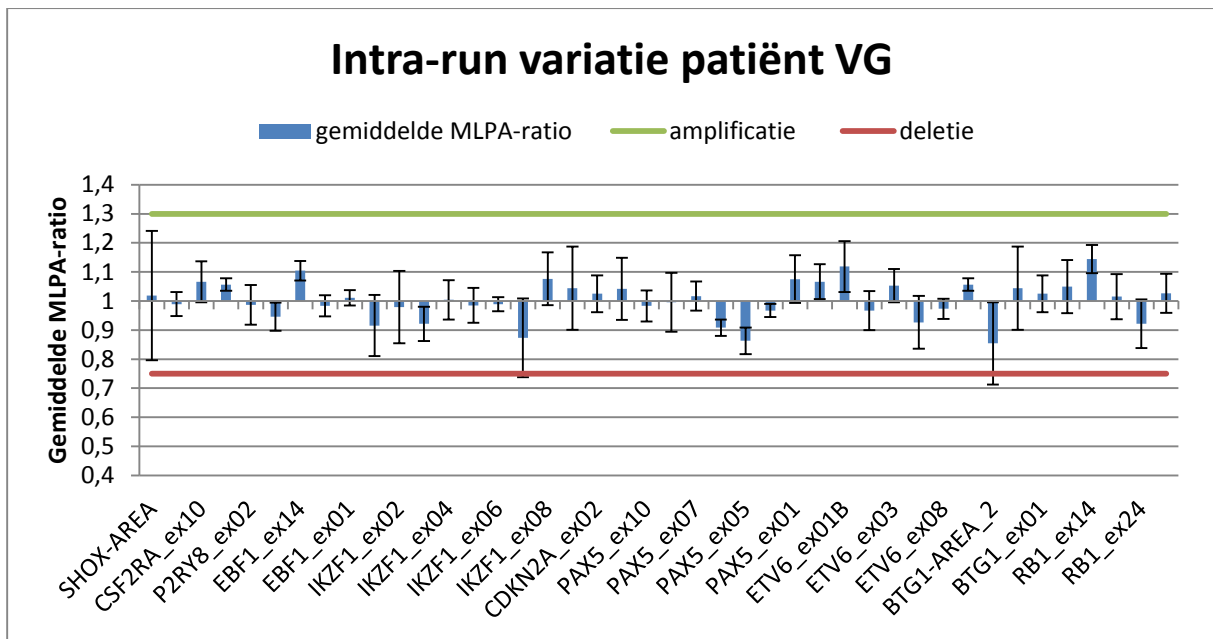
4.3.2 Intra-run variatie

Om de variatie op het MLPA resultaat binnen dezelfde test te evalueren werden drie patiëntenstalen driemaal herhaald binnen één run. Het gaat om twee stalen (patiënt LA en VG) zonder afwijkingen en één staal (patiënt GC) met afwijkingen in *CDKN2A/B*, *PAX5* ex1-10 en *ETV6* ex1-5. De afwijkingen in *CDKN2A/B* en *PAX5* werden bevestigd met QPCR.

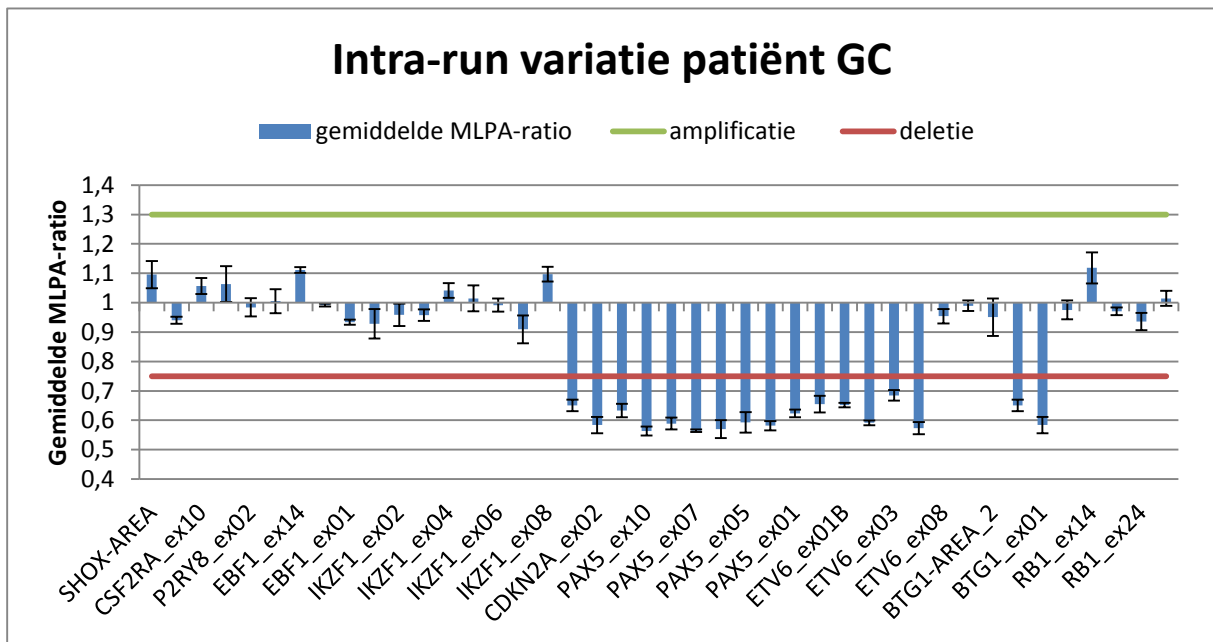
Op basis van de gegevens uit het validatierapport van EuroGentest [96] wordt gesteld dat de intra-run variatie geslaagd is indien de standaardafwijking voor elke targetprobe tussen de verschillende herhalingen kleiner is dan 0,25. De hoogste standaardafwijking die werd bereikt was 0,22 en kwam voor bij staal VG bij de targetprobe van de *SHOX*-area. Bij staal VG wordt bij de targetprobe van *IKZF1* ex7 en *BTG1*-area 2 opgemerkt dat de MLPA-ratio bij één run net onder de cut-off waarde gelegen is. In onderstaande grafieken worden de gemiddelde MLPA-ratio en standaardafwijking voor elke targetprobe weergegeven.



Figuur 45: Gemiddelde MLPA-ratio en standaardafwijking voor elke targetprobe van patiënt LA



Figuur 46: Gemiddelde MLPA-ratio en standaardafwijking voor elke targetprobe van patiënt VG

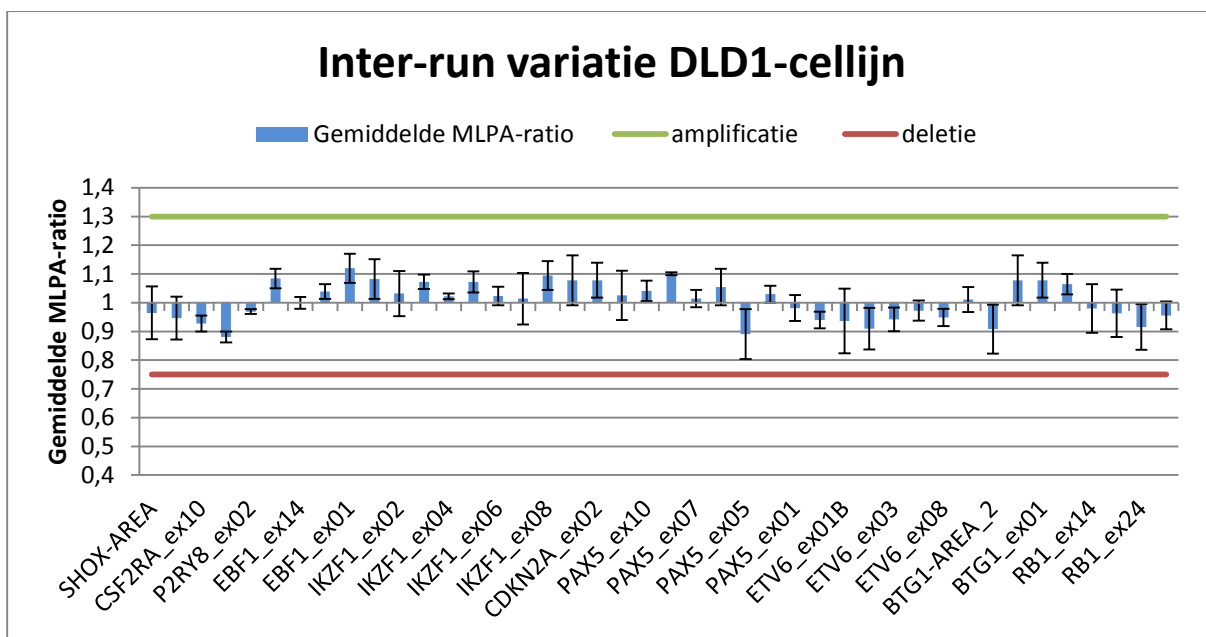


Figuur 47: Gemiddelde MLPA-ratio en standaardafwijking voor elke targetprobe van patiënt GC

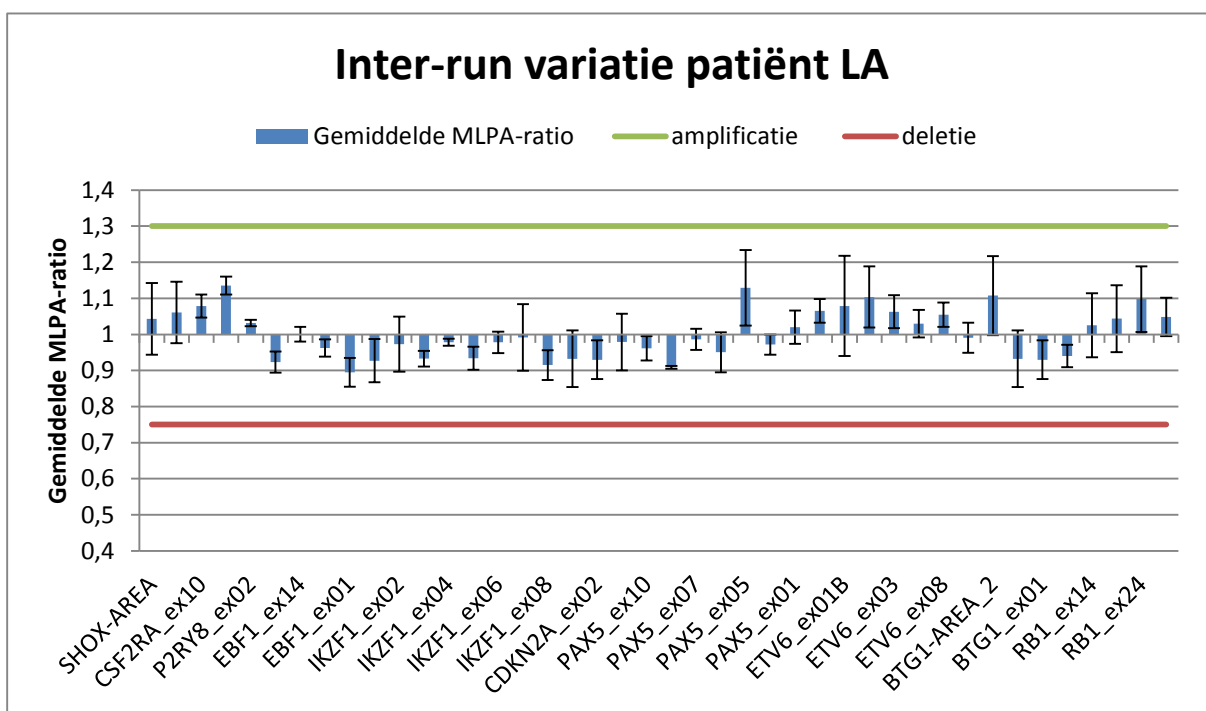
4.3.3 Inter-run variatie

Om de variatie op het MLPA resultaat tussen verschillende testen te evalueren werden verschillende patiëntestalen driemaal herhaald in aparte runs. De runs werden uitgevoerd op hetzelfde PCR-toestel. Er worden twee referentiestalen (controlepatiënt LA en DLD1-celijn) zonder afwijkingen en één BCP-ALL staal (patiënt GC) met meerdere afwijkingen in de onderzochte regio's onderzocht. Net als bij de intra-run variatie is deze test geslaagd als de standaardafwijking voor elke targetprobe tussen de drie verschillende runs kleiner is dan 0,25. Bij geen enkel staal wordt een standaardafwijking > 0,25 verkregen. De hoogste standaardafwijking die bereikt wordt is 0,14 en komt voor bij de DLD1-celijn met targetprobe *ETV6* ex01B.

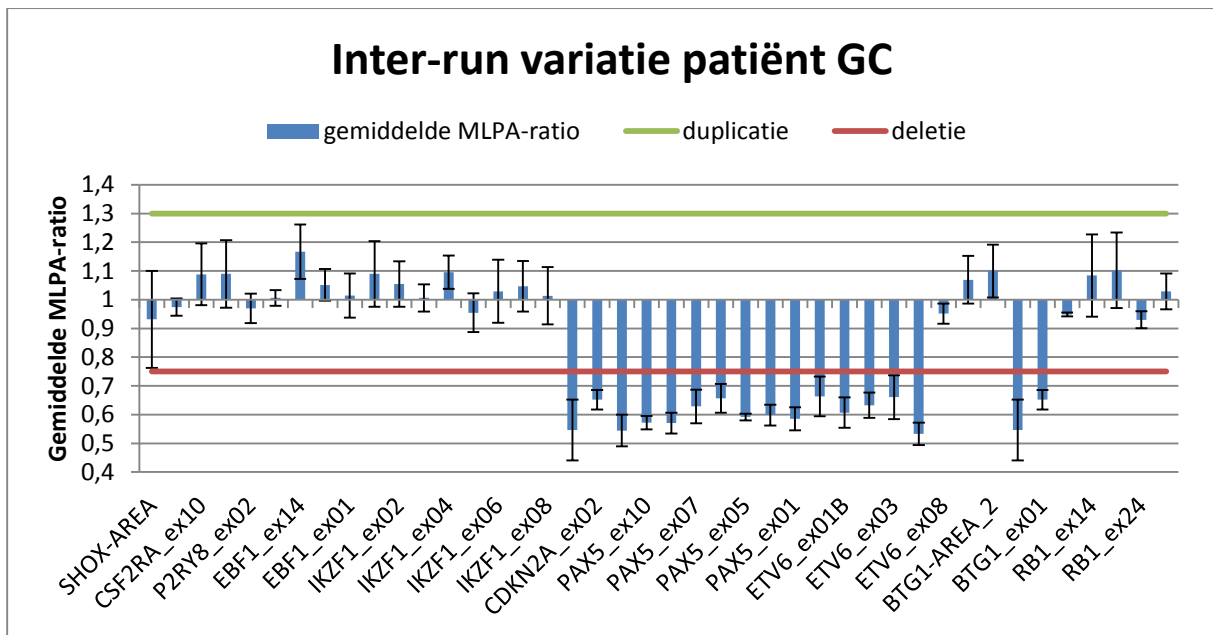
In onderstaande grafieken worden de gemiddelde MLPA-ratio's en standaardafwijkingen van elke targetprobe weergegeven.



Figuur 48: Gemiddelde MLPA-ratio en standaardafwijking voor elke targetprobe van DLD1-celijn

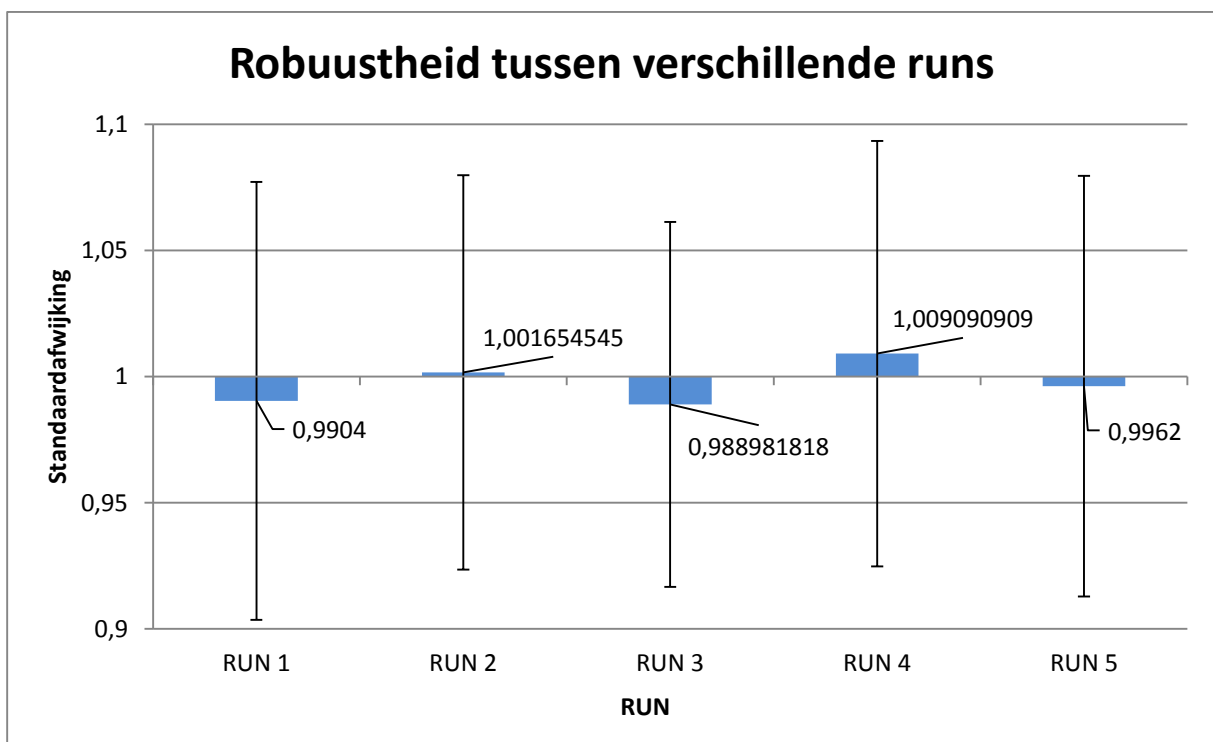


Figuur 49: Gemiddelde MLPA-ratio en standaardafwijking voor elke targetprobe van patiënt LA



Figuur 50: Gemiddelde MLPA-ratio en standaardafwijking voor elke targetprobe van patiënt GC

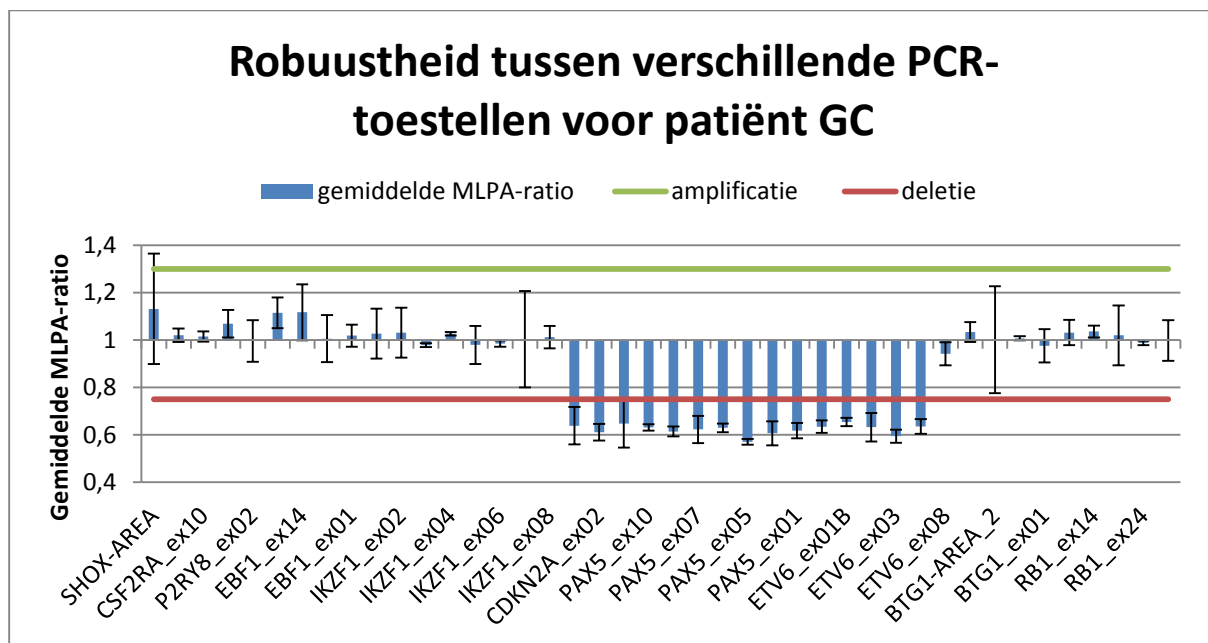
Daarnaast werd met patiënt LA (referentiestaal) de gemiddelde waarde en standaardafwijking van alle probes tussen verschillende runs bekeken. Vermits het om een referentiestaal gaat, zouden in het ideale geval alle MLPA-ratio's één moeten zijn. Wanneer de gemiddelde waarde van alle probes wordt genomen, zien we dat deze zeer dicht bij één gelegen zijn. Ook de standaardafwijking tussen alle probes is voor elke run steeds kleiner dan 0,1. Daarom kan er gezegd worden dat de inter-run variatie van deze MLPA-assay klein is. In onderstaande grafiek worden de gemiddelde waarden en standaardafwijking bij de verschillende runs weergegeven.



Figuur 51: Weergave van gemiddelde MLPA-ratio en standaardafwijking van de referentieprobes per run

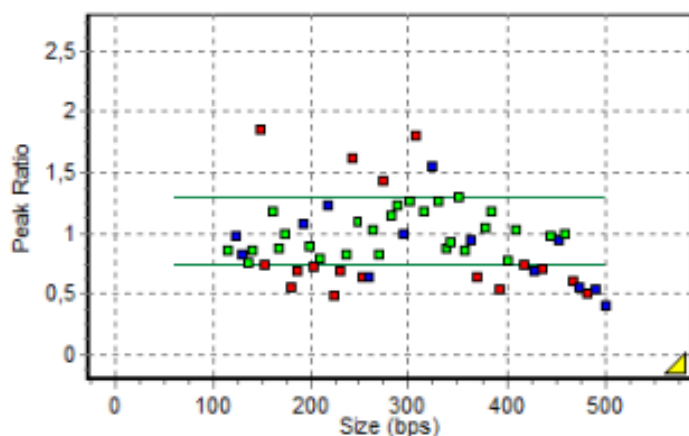
4.3.4 Robuustheid

Bij de robuustheid wordt gekeken naar de invloed op het resultaat wanneer de MLPA-assay in wisselende omstandigheden wordt uitgevoerd. In de eerste plaats wordt de invloed op het MLPA-resultaat nagegaan bij gebruik van een verschillend PCR-toestel. Hiervoor werd patiënt GC driemaal geanalyseerd op een verschillend toestel. De overige factoren (o.a. bereiding mastermix, DNA-verdunningen, tijd hybridisatie) waren bij de uitvoering identiek. De standaardafwijking voor alle probes tussen de drie runs is steeds kleiner dan 0,25 (zie figuur 52). Hieruit kan besloten worden dat de MLPA-assay robuust is voor de uitvoering op verschillende PCR-toestellen.



Figuur 52: Robuustheid tussen verschillende toestellen voor patiënt GC

Daarnaast werd de invloed op het MLPA-resultaat nagegaan indien patiëntenstalen gebruikt worden waarvan het DNA op een andere manier geëxtraheerd werd. Bij alle eerder uitgevoerde testen werden DNA gebruikt die geëxtraheerd werden volgens de chemagen methode. In deze test wordt er naast deze stalen DNA gebruikt dat geëxtraheerd werd volgens de manuele extractie (Autopure consumables). Als de ratioplot van GeneMarker (zie figuur 53) van een negatief patiëntenstaal (manueel geëxtraheerd) bekeken wordt, zien we dat het staal verschillende CNA's vertoont als er genormaliseerd wordt t.o.v. de DLD1-cel lijn (chemagen extractie). Hieruit kan geconcludeerd worden dat stalen geëxtraheerd via een verschillende extractiemethoden niet met elkaar vergeleken kunnen worden. Het is dus zeer belangrijk om het juiste referentiestaal te gebruiken aangezien het MLPA resultaat hierdoor sterk wordt beïnvloed.



Figuur 53: Ratioplot van negatieve patiënt (manueel geëxtraheerd) genormaliseerd t.o.v. de DLD1-celijn (chemagen extractie)

4.3.5 Besluit validatie

Uit de validatie kunnen we besluiten dat de MLPA-assay een betrouwbare techniek is voor de opsporing van CNA's bij BCP-ALL-patiënten. De resultaten van de MLPA-analyse voor *CDKN2A/B*, *PAX5* en *IKZF1* werden bevestigd met QPCR. Daarnaast voldeed zowel de intra-run als de inter-run variatie aan de vooropgestelde eisen. Tot slot werd aangetoond dat de MLPA-assay een robuuste techniek is. Het is wel duidelijk dat de keuze van het referentiestaal een grote invloed heeft op het eindresultaat.

Ondanks de geslaagde validatie merken we op dat er regelmatig stalen waren waarvoor de MLPA-assay mislukt was. Bij herhaling was de test telkens wel in orde wat wijst op een probleem bij de uitvoering. De gebruikte volumes zijn relatief klein en hoewel het een eenvoudig protocol is, omvat het vele kleine stappen gedurende dewelke er vanalles kan mislopen zoals evaporatie, luchtballen en pipetting errors.

5 Discussie

MLPA staat bekend als een robuuste techniek waarmee met één enkele reactie gelijktijdig meerdere targets kunnen worden opgespoord. Het is een betrouwbare techniek voor de detectie van kleine copy-number afwijkingen. De MLPA-assay is niet geschikt om numerieke chromosoomafwijkingen waar geen CNA's voorkomen op te sporen. Enkel genomische onevenwichten binnen de typische sequenties van 55-80 nt van de gebruikte MLPA-probes worden hiermee opgepikt.

In vergelijking met FISH is de resolutie voor de opsporing van CNA's met de MLPA-assay beduidend hoger. Bij de MLPA-assay daarentegen is de detectie van afwijkingen in een gemengde celpopulatie of bij een laag percentage van kwaadaardige cellen veel moeilijker dan bij FISH. Wanneer het percentage blasten lager is dan 20 % is de MLPA-assay niet meer nauwkeurig voor de detectie van CNA's. Deze techniek is dan ook enkel nuttig in de diagnostiek van BCP-ALL en heeft geen waarde in de opvolging ervan.

In tegenstelling tot real-time PCR is de MLPA-assay een eenvoudige methode om gelijktijdig verschillende CNA's op te sporen. Hierdoor is het mogelijk om op korte tijd een groot aantal patiënten te screenen voor de aanwezigheid van een vijftigtal CNA's. De MLPA-assay is wel gevoeliger voor aanwezige contaminanten (bv. fenol, ethanol en zouten) in vergelijking met een standaard PCR-reactie. Daarom is het belangrijk dat referentiestalen op dezelfde manier behandeld werden als de patiëntenstalen.

Bij het testen van een populatie van 12 gekende BCP-ALL-patiënten vertonen acht patiënten klinisch relevante CNA's. Ondanks de kleine populatie komt de verhouding van de gedeleteerde genen goed overeen met de cijfers uit de literatuur. Bij zes van de acht patiënten komt het resultaat van de MLPA-assay overeen met de resultaten van de QPCR, FISH en karyotypering.

Bij twee patiënten was het MLPA resultaat minder duidelijk doordat ofwel de herhaling ofwel de QPCR een discrepant resultaat opleverde. Het is belangrijk dat er voldoende blasten aanwezig zijn in het staal. De MLPA-assay geeft namelijk de gemiddelde MLPA-ratio weer van het totale DNA. Wanneer het percentage blasten laag is, kan de afwijking gemaskeerd worden door DNA afkomstig van normale WBC's en wordt deze niet opgepikt. De resultaten moeten dus steeds met een kritisch oog en rationeel geïnterpreteerd worden.

De ervaring met de MLPA-assay in de context van aangeboren aandoeningen leert dat maximaal 24 stalen per reeks mogen worden ingezet. De tijd voor het pipetteren van de ligase mastermix bij een groot aantal stalen heeft nauwelijks invloed op het eindresultaat. Maar de tijd tussen het pipetteren van PCR polymerase mix en het starten van de PCR-reactie wordt best wel zo kort mogelijk gehouden waardoor het aantal stalen dat gelijktijdig getest kan worden, beperkt is.

6 Besluit

Uit de optimalisatie is gebleken dat de populatie normalisatie van de GeneMarker software voor de MLPA probemix P335-B1 een geschikte methode is voor de analyse van de ruwe data. Daarnaast werd beslist om bij elke MLPA-run de DLD1-celijn en een negatief patiëntenstaal mee te nemen als referentiestalen. Volgens het protocol van MRC-Holland is de test betrouwbaar wanneer de standaardafwijking tussen de referentieprobes kleiner is dan 0,1. Bij het meermaals herhalen van stalen werd opgemerkt dat een standaardafwijking onder de 0,1 onhaalbaar is gezien het groot aantal referentieprobes dat aanwezig is in onze kit. We zien wel dat een standaardafwijking tot 0,2 een betrouwbaar resultaat geeft waardoor een test met een standaardafwijking tot 0,2 aanvaard wordt.

Daarnaast werd de optimale concentratie voor de uitvoering van de MLPA-assay bepaald. Er werden twee verschillende DNA hoeveelheden uitgetest nl. 200 en 100 ng. Bij beide hoeveelheden werd hetzelfde resultaat bekomen maar de variatie binnen en tussen de runs is kleiner bij een lagere hoeveelheid DNA.

Na de optimalisatie werd de validatie uitgevoerd. De juistheid van de MLPA-assay werd bevestigd voor *CDKN2A/B*, *IKZF1* en *PAX5* met behulp van QPCR. Daarnaast werd de intra-run en inter-run validatie en de robuustheid van de MLPA-assay aangetoond.

Uit deze masterproef kan geconcludeerd worden dat de MLPA-assay met probemix P335-B1 een betrouwbare en robuuste techniek is voor de opsporing van CNA's bij patiëntenstalen waarbij het percentage blasten hoger is dan 20 %. De volgende stap is de implementatie van de hier geoptimaliseerde en gevalideerde test in de diagnostische work-up van BCP-ALL. De bijkomende informatie die deze assay oplevert, zal de inschatting van de prognose alsook de risicostratificatie van de patiënten aanzienlijk verbeteren. Hierdoor kan elke patiënt een meer optimale behandeling krijgen wat moet leiden tot een verbeterde overleving van patiënten met BCP-ALL.

Literatuurlijst

- [1] K.-N. Prof.dr.J.C. and T.-H. E.A., *Hematologie*. Bohn Stafleu van Loghum, 2013, pp. 1–6,91–96.
- [2] C. Pui, L. L. Robison, and A. T. Look, “Acute lymphoblastic leukaemia,” *Lancet*, vol. 371, no. 1030–43, 2008.
- [3] C. G. Mullighan, “The molecular genetic makeup of acute lymphoblastic leukemia.,” *Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program*, vol. 2012, pp. 389–96, Jan. 2012.
- [4] C. G. Mullighan, S. Goorha, I. Radtke, C. B. Miller, E. Coustan-Smith, J. D. Dalton, K. Girtman, S. Mathew, J. Ma, S. B. Pounds, X. Su, C.-H. Pui, M. V Relling, W. E. Evans, S. a Shurtleff, and J. R. Downing, “Genome-wide analysis of genetic alterations in acute lymphoblastic leukaemia.,” *Nature*, vol. 446, no. 7137, pp. 758–64, Apr. 2007.
- [5] V. leeuwen F. N. Kuiper R P, Hoogerbrugge P.M., “Nieuwe genomische markers voor diagnostiek en behandeling van voorloper-B-cel acute lymfatische leukemie bij kinderen,” *Ned. Tijdschr. voor Hematol.*, vol. 7, pp. 307–314, 2010.
- [6] C.-H. Pui, M. V Relling, and J. R. Downing, “Acute lymphoblastic leukemia,” *N. Engl. J. Med.*, vol. 350, no. 15, pp. 1535–48, Apr. 2004.
- [7] H. Vranckx, “TCR - PCR,” 2014.
- [8] H. Vranckx, “IgH en IgK-PCR,” 2014.
- [9] C. J. Schwab, L. Chilton, H. Morrison, L. Jones, H. Al-Shehhi, A. Erhorn, L. J. Russell, A. V Moorman, and C. J. Harrison, “Genes commonly deleted in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia: association with cytogenetics and clinical features.,” *Haematologica*, vol. 98, no. 7, pp. 1081–8, Jul. 2013.
- [10] C. J. Schwab, L. R. Jones, H. Morrison, S. L. Ryan, H. Yigittop, J. P. Schouten, and C. J. Harrison, “Evaluation of Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification as a Method for the Detection of Copy Number Abnormalities in B-Cell Precursor Acute Lymphoblastic Leukemia,” vol. 1113, no. July, pp. 1104–1113, 2010.
- [11] P. G. C. E. Van Os and J. P. Schouten, “Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification (MLPA) for the detection of copy number variation in genomic sequences,” in *PCR Mutation Detection Protocols*, vol. 688, B. D. M. Theophilus and R. Rapley, Eds. Totowa, NJ: Humana Press, 2011, pp. 97–126.
- [12] J. J. M. L. Hoffmann, J. W. N. Akkerman, H. K. Nieuwenhuis, and M. A. . Overbeeke, *Hematologie*, 2de druk. Syntax media, 2006.
- [13] M. Jones, “Hematopoiesis,” *Scientific Illustration*. [Online]. Available: <http://scientificillustration.tumblr.com/post/26351439238/kristinmountillustration-in-addition-to-full>. [Accessed: 02-Jul-2014].

- [14] A. T. Look, "Oncogenic Transcription Factors in the Human Acute Leukemias," vol. 278, no. November, 1997.
- [15] J. J. M. van D. R. Pieters, "Acute lymfatische leukemie bij kinderen en adolescenten," in *handboek hemetologie*, .
- [16] P. Marynen, "Verworven aandoeningen : kanker," in *Moleculaire Genetica*, KULeuven, 2000, pp. 40–47.
- [17] A. Mandal, "What are proto-oncogenes?," *News Medical*. [Online]. Available: <http://www.news-medical.net/health/What-are-Proto-Oncogenes.aspx>. [Accessed: 01-Apr-2014].
- [18] erasmus mc, "Wat is leukemie?" [Online]. Available: http://www.erasmusmc.nl/kindergeneeskunde/oncologie/patientenzorg/KOCR/leukemie_lymfoom/leukemie/.
- [19] B. Caroline and V. K. Dana, "Diagnose en classificatie van acute leukemieën." .
- [20] Nederlands vereniging voor hematologie, "Acute lymfatische leukemie." [Online]. Available: <http://www.hematologienederland.nl/acute-lymfatische-leukemie>.
- [21] C. Cobaleda and I. Sánchez-García, "B-cell acute lymphoblastic leukaemia: towards understanding its cellular origin.," *Bioessays*, vol. 31, no. 6, pp. 600–9, Jun. 2009.
- [22] C. J. Harrison, "Targeting signaling pathways in acute lymphoblastic leukemia: new insights.," *Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program*, vol. 2013, pp. 118–25, Jan. 2013.
- [23] T. J. Lightfoot, W. T. Johnston, J. Simpson, a G. Smith, P. Ansell, S. Crouch, E. Roman, and S. E. Kinsey, "Survival from childhood acute lymphoblastic leukaemia: the impact of social inequality in the United Kingdom.," *Eur. J. Cancer*, vol. 48, no. 2, pp. 263–9, Jan. 2012.
- [24] M. Onciu, "Acute lymphoblastic leukemia," *Hematol. Oncol. Clin. North Am.*, vol. 23, no. 4, pp. 655–74, Aug. 2009.
- [25] K. W. Chan, "Acute Lymphoblastic Leukemia Biologic Features of ALL Morphologic and Cytochemical Classification," no. February, pp. 40–49, 2002.
- [26] E. S. Jaffe, N. L. Harris, J. Diebold, and H. K. Muller-Hermelink, "World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues. A progress report.," *Am. J. Clin. Pathol.*, vol. 111, no. 1 Suppl 1, pp. S8–12, Jan. 1999.
- [27] "UMCG - Hematologie-protocollen," *UMCG - Hematologie-protocollen*. [Online]. Available: <http://hematologiegroningen.nl/protocollen/>. [Accessed: 23-Jul-2013].

- [28] M. Ching-Hon Pui, “ACUTE LYMPHOBLASTIC,” *Pediatr. Clin. north amerika*, vol. 44, no. 4, 1997.
- [29] “Het Ph chromosoom, het genetisch defect bij chronische myeloïde leukemie (CML),” *Research & Diagnostics*. [Online]. Available: <http://sanbiobv.wordpress.com/category/leukemie/>. [Accessed: 10-Nov-2011].
- [30] C. G. Mullighan and J. R. Downing, “Genome-wide profiling of genetic alterations in acute lymphoblastic leukemia: recent insights and future directions.,” *Leukemia*, vol. 23, no. 7, pp. 1209–18, Jul. 2009.
- [31] F. W. Van Delft, M. G. Atherton, T. Davies, M. Griffiths, S. Hing, F. M. Ross, P. Talley, and V. Saha, “Genome complexity in acute lymphoblastic leukemia is revealed by array-based comparative genomic hybridization,” no. October 2006, pp. 4306–4318, 2007.
- [32] A. V Moorman, H. M. Ensor, S. M. Richards, L. Chilton, C. Schwab, S. E. Kinsey, A. Vora, and C. D. Mitchell, “Prognostic effect of chromosomal abnormalities in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia : results from the UK Medical Research Council ALL97 / 99 randomised trial,” *Lancet Oncol.*, vol. 11, no. 5, pp. 429–438.
- [33] H. E. Aburawi, A. Biloglav, B. Johansson, and K. Paulsson, “Cytogenetic and molecular genetic characterization of the ‘high hyperdiploid’ B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia cell line MHH-CALL-2 reveals a near-haploid origin.,” *Br. J. Haematol.*, vol. 154, no. 2, pp. 275–7, Jul. 2011.
- [34] L. Chilton, G. Buck, C. J. Harrison, R. P. Ketterling, J. M. Rowe, M. S. Tallman, a H. Goldstone, a K. Fielding, and a V Moorman, “High hyperdiploidy among adolescents and adults with acute lymphoblastic leukaemia (ALL): cytogenetic features, clinical characteristics and outcome.,” *Leukemia*, no. October 2013, pp. 1–8, Dec. 2013.
- [35] K. Paulsson, E. Forestier, H. Lilljebjörn, J. Heldrup, M. Behrendtz, B. D. Young, and B. Johansson, “Genetic landscape of high hyperdiploid childhood acute lymphoblastic leukemia.,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 107, no. 50, pp. 21719–24, Dec. 2010.
- [36] K. Paulsson and B. Johansson, “High Hyperdiploid Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia,” vol. 660, no. May, pp. 637–660, 2009.
- [37] C. G. Mullighan, “Genome sequencing of lymphoid malignancies.,” *Blood*, vol. 122, no. 24, pp. 3899–907, Dec. 2013.
- [38] N. A. Heerema, J. B. Nachman, H. N. Sather, M. G. Sensel, M. K. Lee, B. J. Lange, P. G. Steinherz, B. Bostrom, P. S. Gaynon, F. Uckun, B. N. A. Heerema, and R. Hutchinson, “Hypodiploidy With Less Than 45 Chromosomes Confers Adverse Risk in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia: A Report From the Children’s Cancer Group,” pp. 4036–4045, 2014.
- [39] L. Holmfeldt, L. Wei, E. Diaz-Flores, M. Walsh, J. Zhang, L. Ding, D. Payne-Turner, M. Churchman, A. Andersson, S.-C. Chen, K. McCastlain, J. Becksfort, J. Ma, G. Wu,

- S. N. Patel, S. L. Heatley, L. a Phillips, G. Song, J. Easton, M. Parker, X. Chen, M. Rusch, K. Boggs, B. Vadodaria, E. Hedlund, C. Drenberg, S. Baker, D. Pei, C. Cheng, R. Huether, C. Lu, R. S. Fulton, L. L. Fulton, Y. Tabib, D. J. Dooling, K. Ochoa, M. Minden, I. D. Lewis, L. B. To, P. Marlton, A. W. Roberts, G. Raca, W. Stock, G. Neale, H. G. Drexler, R. a Dickins, D. W. Ellison, S. a Shurtleff, C.-H. Pui, R. C. Ribeiro, M. Devidas, A. J. Carroll, N. a Heerema, B. Wood, M. J. Borowitz, J. M. Gastier-Foster, S. C. Raimondi, E. R. Mardis, R. K. Wilson, J. R. Downing, S. P. Hunger, M. L. Loh, and C. G. Mullighan, "The genomic landscape of hypodiploid acute lymphoblastic leukemia.," *Nat. Genet.*, vol. 45, no. 3, pp. 242–52, Mar. 2013.
- [40] I. Golovleva, E. Forestier, M. K. Andersen, K. Autio, E. Blennow, G. Borgstro, S. Heim, K. Heinonen, R. Hovland, J. H. Johannsson, G. Kerndrup, and A. Nordgren, "Cytogenetic Patterns in ETV6 / RUNX1 -Positive Pediatric B-Cell Precursor Acute Lymphoblastic Leukemia : A Nordic Series of 245 Cases and Review of the Literature," vol. 450, pp. 440–450, 2007.
- [41] V. Torrano, J. Procter, P. Cardus, M. Greaves, and A. M. Ford, "ETV6-RUNX1 promotes survival of early B lineage progenitor cells via a dysregulated erythropoietin receptor.," *Blood*, vol. 118, no. 18, pp. 4910–8, Nov. 2011.
- [42] C. G. Mullighan, "Molecular genetics of B-precursor acute lymphoblastic leukemia," vol. 122, no. 10, 2012.
- [43] A. S. Felice, M. S. Gallego, C. N. Alonso, E. M. Alfaro, M. R. Gutter, A. R. Bernasconi, P. L. Rubio, P. A. Zubizarreta, and J. G. Rossi, "Prognostic impact of t (1 ; 19) / TCF3 – PBX1 in childhood acute lymphoblastic leukemia in the context of Berlin – Frankfurt – Mu ¨ nster-based protocols," vol. 52, no. July, pp. 1215–1221, 2011.
- [44] C. G. Mullighan, C. B. Miller, I. Radtke, L. a Phillips, J. Dalton, J. Ma, D. White, T. P. Hughes, M. M. Le Beau, C.-H. Pui, M. V Relling, S. a Shurtleff, and J. R. Downing, "BCR-ABL1 lymphoblastic leukaemia is characterized by the deletion of Ikaros.," *Nature*, vol. 453, no. 7191, pp. 110–4, May 2008.
- [45] H. H. Koo, "Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia in childhood.," *Korean J. Pediatr.*, vol. 54, no. 3, pp. 106–10, Mar. 2011.
- [46] K. M. Bernt and S. A. Armstrong, "Targeting Epigenetic Programs in MLL-Rearranged Leukemias," vol. 4, pp. 354–360.
- [47] H. M. Ensor, C. Schwab, L. J. Russell, S. M. Richards, H. Morrison, D. Masic, L. Jones, S. E. Kinsey, A. J. Vora, C. D. Mitchell, C. J. Harrison, V. Moorman, and A. V Moorman, "lymphoblastic leukemia and CRLF2 deregulation : results from the MRC ALL97 clinical trial Demographic , clinical , and outcome features of children with acute lymphoblastic leukemia and CRLF2 deregulation : results from the MRC ALL97 clinical trial," pp. 2129–2136, 2014.
- [48] L. J. Russell, M. Capasso, I. Vater, T. Akasaka, O. a Bernard, M. J. Calasanz, T. Chandrasekaran, E. Chapiro, S. Gesk, M. Griffiths, D. S. Guttery, C. Haferlach, L.

- Harder, O. Heidenreich, J. Irving, L. Kearney, F. Nguyen-Khac, L. Machado, L. Minto, A. Majid, A. V Moorman, H. Morrison, V. Rand, J. C. Strefford, C. Schwab, H. Tönnies, M. J. S. Dyer, R. Siebert, and C. J. Harrison, "Deregulated expression of cytokine receptor gene, CRLF2, is involved in lymphoid transformation in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia.," *Blood*, vol. 114, no. 13, pp. 2688–98, Sep. 2009.
- [49] H. M. Ensor, C. Schwab, L. J. Russell, S. M. Richards, H. Morrison, D. Masic, L. Jones, S. E. Kinsey, A. J. Vora, C. D. Mitchell, C. J. Harrison, and A. V Moorman, "Demographic, clinical, and outcome features of children with acute lymphoblastic leukemia and CRLF2 deregulation: results from the MRC ALL97 clinical trial.," *Blood*, vol. 117, no. 7, pp. 2129–36, Mar. 2011.
- [50] L. J. Russell, "IGH @ locus rearrangements and their involvement in acute lymphoblastic leukaemia," *Newcastle Cancer Cent.*
- [51] A. V Moorman, C. Schwab, H. M. Ensor, L. J. Russell, H. Morrison, L. Jones, D. Masic, B. Patel, J. M. Rowe, M. Tallman, A. H. Goldstone, A. K. Fielding, and C. J. Harrison, "IGH@ translocations, CRLF2 deregulation, and microdeletions in adolescents and adults with acute lymphoblastic leukemia.," *J. Clin. Oncol.*, vol. 30, no. 25, pp. 3100–8, Sep. 2012.
- [52] K. G. Roberts, R. D. Morin, J. Zhang, M. Hirst, Y. Zhao, X. Su, S.-C. Chen, D. Payne-Turner, M. L. Churchman, R. C. Harvey, X. Chen, C. Kasap, C. Yan, J. Becksfort, R. P. Finney, D. T. Teachey, S. L. Maude, K. Tse, R. Moore, S. Jones, K. Mungall, I. Birol, M. N. Edmonson, Y. Hu, K. E. Buetow, I.-M. Chen, W. L. Carroll, L. Wei, J. Ma, M. Kleppe, R. L. Levine, G. Garcia-Manero, E. Larsen, N. P. Shah, M. Devidas, G. Reaman, M. Smith, S. W. Paugh, W. E. Evans, S. a Grupp, S. Jeha, C.-H. Pui, D. S. Gerhard, J. R. Downing, C. L. Willman, M. Loh, S. P. Hunger, M. a Marra, and C. G. Mullighan, "Genetic alterations activating kinase and cytokine receptor signaling in high-risk acute lymphoblastic leukemia.," *Cancer Cell*, vol. 22, no. 2, pp. 153–66, Aug. 2012.
- [53] A. van der Veer, E. Waanders, R. Pieters, M. E. Willemsse, S. V Van Reijmersdal, L. J. Russell, C. J. Harrison, W. E. Evans, V. H. J. van der Velden, P. M. Hoogerbrugge, F. Van Leeuwen, G. Escherich, M. a Horstmann, L. Mohammadi Khankahdani, D. Rizopoulos, H. a De Groot-Kruseman, E. Sonneveld, R. P. Kuiper, and M. L. Den Boer, "Independent prognostic value of BCR-ABL1-like signature and IKZF1 deletion, but not high CRLF2 expression, in children with B-cell precursor ALL.," *Blood*, vol. 122, no. 15, pp. 2622–9, Oct. 2013.
- [54] J. C. Strefford, F. W. van Delft, H. M. Robinson, H. Worley, O. Yiannikouris, R. Selzer, T. Richmond, I. Hann, T. Bellotti, M. Raghavan, B. D. Young, V. Saha, and C. J. Harrison, "Complex genomic alterations and gene expression in acute lymphoblastic leukemia with intrachromosomal amplification of chromosome 21.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 103, no. 21, pp. 8167–72, May 2006.
- [55] V. Rand, H. Parker, L. J. Russell, C. Schwab, H. Ensor, J. Irving, L. Jones, D. Masic, L. Minto, H. Morrison, S. Ryan, H. Robinson, P. Sinclair, V. Anthony, J. C. Strefford, C. J. Harrison, and A. V Moorman, "genomic characterization implicates iAMP21 as a

- likely event in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia,” *Blood*, pp. 6848–6855, 2014.
- [56] V. Rand, H. Parker, L. J. Russell, C. Schwab, H. Ensor, J. Irving, L. Jones, D. Masic, L. Minto, H. Morrison, S. Ryan, H. Robinson, P. Sinclair, A. V Moorman, J. C. Strefford, and C. J. Harrison, “Genomic characterization implicates iAMP21 as a likely primary genetic event in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia,” *Blood*, vol. 117, no. 25, pp. 6848–55, Jun. 2011.
- [57] J. R. Collins-Underwood and C. G. Mullighan, “Genomic profiling of high-risk acute lymphoblastic leukemia,” *Leukemia*, vol. 24, no. 10, pp. 1676–85, Oct. 2010.
- [58] A. Caye, K. Beldjord, K. Mass-Malo, S. Drunat, J. Soulier, V. Gandemer, A. Baruchel, Y. Bertrand, H. Cavé, and E. Clappier, “Breakpoint-specific multiplex polymerase chain reaction allows the detection of IKZF1 intragenic deletions and minimal residual disease monitoring in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia,” *Haematologica*, vol. 98, no. 4, pp. 597–601, Apr. 2013.
- [59] C. Palmi, M. G. Valsecchi, G. Longinotti, D. Silvestri, V. Carrino, V. Conter, G. Basso, A. Biondi, G. Te Kronnie, and G. Cazzaniga, “What is the relevance of Ikaros gene deletions as a prognostic marker in pediatric Philadelphia-negative B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia?,” *Haematologica*, vol. 98, no. 8, pp. 1226–31, Aug. 2013.
- [60] B. C. Medeiros, “Deletion of IKZF1 and prognosis in acute lymphoblastic leukemia,” *N. Engl. J. Med.*, vol. 360, no. 17, p. 1787; author reply 1787–8, Apr. 2009.
- [61] P. Dörge, B. Meissner, M. Zimmermann, A. Mörcke, A. Schrauder, J. Bouquin, D. Schewe, J. Harbott, A. Teigler-schlegel, R. Ratei, W. Ludwig, R. Koehler, C. R. Bartram, M. Schrappe, M. Stanulla, and G. Cario, “IKZF1 deletion is an independent predictor of outcome in pediatric acute lymphoblastic leukemia treated according to the ALL-BFM 2000 protocol,” vol. 98, no. 3, pp. 428–432, 2013.
- [62] G. Martinelli, I. Iacobucci, C. T. Storlazzi, M. Vignetti, F. Paoloni, D. Cilloni, S. Soverini, A. Vitale, S. Chiaretti, G. Cimino, C. Papayannidis, S. Paolini, L. Elia, P. Fazi, G. Meloni, S. Amadori, G. Saglio, F. Pane, M. Baccharani, and R. Foà, “IKZF1 (Ikaros) deletions in BCR-ABL1-positive acute lymphoblastic leukemia are associated with short disease-free survival and high rate of cumulative incidence of relapse: a GIMEMA AL WP report,” *J. Clin. Oncol.*, vol. 27, no. 31, pp. 5202–7, Nov. 2009.
- [63] J. J. Yang, D. Bhojwani, W. Yang, X. Cai, G. Stocco, K. Crews, D. Morrison, M. Devidas, S. P. Hunger, C. L. Willman, A. Elizabeth, C. Pui, W. E. Evans, M. V Relling, W. L. Carroll, J. Wang, and E. A. Raetz, “Genome-wide copy number profiling reveals molecular evolution from diagnosis to relapse in childhood acute lymphoblastic leuk,” pp. 4178–4183, 2014.
- [64] K. Tokunaga, S. Yamaguchi, E. Iwanaga, T. Nanri, T. Shimomura, H. Suzushima, H. Mitsuya, and N. Asou, “High frequency of IKZF1 genetic alterations in adult patients

- with B-cell acute lymphoblastic leukemia.” *Eur. J. Haematol.*, vol. 91, no. 3, pp. 201–8, Sep. 2013.
- [65] I. Iacobucci, C. T. Storlazzi, D. Cilloni, A. Lonetti, E. Ottaviani, S. Soverini, A. Astolfi, S. Chiaretti, A. Vitale, F. Messa, L. Impera, C. Baldazzi, P. D’Addabbo, C. Papayannidis, A. Lonoce, S. Colarossi, M. Vignetti, P. P. Piccaluga, S. Paolini, D. Russo, F. Pane, G. Saglio, M. Baccharani, R. Foà, and G. Martinelli, “Identification and molecular characterization of recurrent genomic deletions on 7p12 in the IKZF1 gene in a large cohort of BCR-ABL1-positive acute lymphoblastic leukemia patients: on behalf of Gruppo Italiano Malattie Ematologiche dell’Adulto Acute Leuke,” *Blood*, vol. 114, no. 10, pp. 2159–67, Sep. 2009.
- [66] S. L. Nutt, B. Heavey, a G. Rolink, and M. Busslinger, “Commitment to the B-lymphoid lineage depends on the transcription factor Pax5.,” *Nature*, vol. 401, no. 6753, pp. 556–62, Oct. 1999.
- [67] C. Cobaleda, A. Schebesta, A. Delogu, and M. Busslinger, “Pax5: the guardian of B cell identity and function.,” *Nat. Immunol.*, vol. 8, no. 5, pp. 463–70, May 2007.
- [68] I. Iacobucci, A. Lonetti, F. Paoloni, C. Papayannidis, A. Ferrari, C. T. Storlazzi, M. Vignetti, D. Cilloni, F. Messa, V. Guadagnuolo, S. Paolini, L. Elia, M. Messina, A. Vitale, G. Meloni, S. Soverini, F. Pane, M. Baccharani, R. Foà, and G. Martinelli, “The PAX5 gene is frequently rearranged in BCR-ABL1-positive acute lymphoblastic leukemia but is not associated with outcome. A report on behalf PAX5 of the GIMEMA Acute Leukemia Working Party,” *Haematologica*, pp. 1683–1690, 2010.
- [69] J. Familiades, M. Bousquet, M. Lafage-Pochitaloff, M.-C. Béné, K. Beldjord, J. De Vos, N. Dastugue, E. Coyaud, S. Struski, C. Quelen, N. Prade-Houdellier, S. Dobbstein, J.-M. Cayuela, J. Soulier, N. Grardel, C. Preudhomme, H. Cavé, O. Blanchet, V. Lhéritier, a Delannoy, Y. Chalandon, N. Ifrah, a Pigneux, P. Brousset, E. a Macintyre, F. Huguet, H. Dombret, C. Broccardo, and E. Delabesse, “PAX5 mutations occur frequently in adult B-cell progenitor acute lymphoblastic leukemia and PAX5 haploinsufficiency is associated with BCR-ABL1 and TCF3-PBX1 fusion genes: a GRAALL study.,” *Leukemia*, vol. 23, no. 11, pp. 1989–98, Nov. 2009.
- [70] C. G. Mullighan, L. A. Phillips, X. Su, J. Ma, C. B. Miller, S. A. Shurtleff, and J. R. Downing, “GENOMIC ANALYSIS OF THE CLONAL ORIGINS OF RELAPSED,” *NIH Public Access*, vol. 322, no. 5906, pp. 1377–1380, 2009.
- [71] C. Lundin, L. Hjorth, M. Behrendtz, A. Nordgren, L. Palmqvist, M. K. Andersen, A. Biloglav, E. Forestier, K. Paulsson, and B. Johansson, “High Frequency of BTG1 Deletions in Acute Lymphoblastic Leukemia in Children with Down Syndrome,” vol. 206, no. November 2011, pp. 196–206, 2012.
- [72] J. C. Van Galen, R. P. Kuiper, L. Van Emst, M. Levers, E. Tijchon, E. Waanders, S. V. Van Reijmersdal, C. Gilissen, A. G. Van Kessel, P. M. Hoogerbrugge, F. N. Van Leeuwen, and B. Scheijen, “lymphoblastic leukemia BTG1 regulates glucocorticoid receptor autoinduction in acute lymphoblastic leukemia,” pp. 4810–4819, 2014.

- [73] E. Waanders, B. Scheijen, L. T. van der Meer, S. V van Reijmersdal, L. van Emst, Y. Kroeze, E. Sonneveld, P. M. Hoogerbrugge, A. G. van Kessel, F. N. van Leeuwen, and R. P. Kuiper, “The origin and nature of tightly clustered BTG1 deletions in precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia support a model of multiclonal evolution.,” *PLoS Genet.*, vol. 8, no. 2, p. e1002533, Jan. 2012.
- [74] A. Usvasalo, S. Savola, R. Riikka, K. Vettenranta, A. Harila-saari, P. Koistinen, and E. Savolainen, “CDKN2A deletions in acute lymphoblastic leukemia of adolescents and young adults — An array CGH study,” vol. 32, no. March 2006, pp. 1228–1235, 2008.
- [75] A. Drago, L. Impera, M. Guc-scekic, and N. Lakic, “A complex rearrangement involving cryptic deletion of ETV6 and CDKN1B genes in a case of childhood acute lymphoblastic leukemia,” *Cancer Genet. Cytogenet.*, vol. 195, no. 2, pp. 125–131, 2009.
- [76] V. Cacheux, S. Raynaud, G. Brunie, M. Bakkus, P. Cochaux, C. Preudhomme, and J. L. Lai, “ETV6 is the target of chromosome 12p deletions in t (12 ; 21) childhood acute lymphocytic leukemia,” no. June, pp. 1459–1464, 1997.
- [77] J. Nojima, Y. Motoki, H. Tsuneoka, H. Kuratsune, T. Matsui, M. Yamamoto, M. Yanagihara, Y. Hinoda, and K. Ichihara, “Native ETV6 deletions accompanied by ETV6-RUNX1 rearrangements are associated with a favourable prognosis in childhood acute lymphoblastic leukaemia : a candidate for prognostic marker,” pp. 530–533, 2011.
- [78] Mrc-holland, *MLPA General Protocol: instructions for use*. 2013, p. 13.
- [79] J. P. Schouten, C. J. McElgunn, R. Waaijer, D. Zwijnenburg, F. Diepvens, and G. Pals, “Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification.,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 30, no. 12, p. e57, Jun. 2002.
- [80] C. Schwab, *MLPA analysis in BCP-ALL*. 2010.
- [81] L. Stuppia, I. Antonucci, G. Palka, and V. Gatta, “Use of the MLPA Assay in the Molecular Diagnosis of Gene Copy Number Alterations in Human Genetic Diseases.,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 13, no. 3, pp. 3245–76, Jan. 2012.
- [82] Mrc-holland, *MLPA Copy number Quantification & methylation detection*. .
- [83] C. Ho and S. Savola, “Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) in Tumor Diagnostics and Prognostics,” *Diagn Mol Pathol*, vol. 21, no. 4, pp. 189–206, 2012.
- [84] T. F. Scientific, “USER GUIDE DNA Fragment Analysis by Capillary Electrophoresis,” no. 4474504.
- [85] P. G. C. E. Van Os and J. P. Schouten, “Multiplex ligation-dependent probe amplification for teh detection of copy number variation in genomic sequences,” vol. 688, pp. 97–126.

- [86] SoftGenetics LLC, “GeneMarker: Quick start guide.”
- [87] SoftGenetics, *multiplex ligation-dependent Probe amplification*, vol. 20, no. January 2002. 2014, pp. 1–17.
- [88] J. Coffa and J. Van den Berg, “Analysis of MLPA Data Using Novel Software Coffalyser.NET by MRC-Holland.”
- [89] I. It, S. Mlpa, A. Mrc-holland, D. M. Dystrophy, U. Kingdom, and A. S. Mlpa, *Interpretation of MLPA results MRC-Holland*. 2010, pp. 1–7.
- [90] Mrc-holland, “SALSA MLPA EK1 and EK5 reagent kits,” 2013.
- [91] Mrc-holland, *SALSA MLPA Probemix P335-B1 ALL-IKZF1*. 2013.
- [92] Applied Biosystems, *User guide applied biosystems 3730/3730xl DNA -analyser*. .
- [93] M. Meyers, *Recombinant DNA technologie*. UHasselt, 2013.
- [94] Biorad laboratories, “SYBR Green for qPCR,” 2014. [Online]. Available: <http://www.bio-rad.com/featured/en/sybr-green-for-qpcr.html>.
- [95] M. W. Pfaffl, “A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR,” *Oxford Univ. Press*, vol. 29, 2001.
- [96] T. Janssens, F. Le Calvez, and G. Matthijs, “Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA),” *EuroGentest*.

Bijlagen

Bijlage A: De uitgebreide probelijst van de probemix P335-B1	95
Bijlage B: Het gebruikte werkblad bij de uitvoering van de MLPA-assay	97
Bijlage C: De sequenties van de primers gebruikt bij QPCR	99
Bijlage D: overzichtstabel Coffalyser.net versus GeneMarker	101
Bijlage E: Diagnostische informatie van de 12 onderzochte patiënten	103
Bijlage F: De validatierapporten uit GeneMarker van de acht BCP-ALL-patiënten waarbij verschillende CNA's gedetecteerd werden	105

Bijlage A: De uitgebreide probelijst van de probemix P335-B161

Table 1. SALSA MLPA P335-B1 ALL-IKZF1 probemix

Length (nt)	SALSA MLPA probe	Chromosomal position		
		reference	region	location (hg 18)
64-70-76-82	Q-fragments: DNA quantity; only visible with less than 100 ng sample DNA			
88-92-96	D-fragments: Low signal of 88 or 96 nt fragment indicates incomplete denaturation			
100	X-fragment: Specific for the X chromosome			
105	Y-fragment: Specific for the Y chromosome			
118 * ~	ZFY probe S0135-L16766		Yp11.31	Y-002.889246
124 *	Reference probe 15370-L13762	7q11.23		07-075.448402
130 *	Reference probe 13867-L15385	16p13.2		16-008.765461
136	CRLF2 probe 13889-L15427		Xp22.33-PAR region	X-001.281274
142	IKZF1 probe 13872-L15390		7p12.2	07-050.417749
148	SHOX-AREA probe 05648-L06218		Xp22.33-PAR region	X-000.770580
153 ~	JAK2 probe 07452-L09964		9p24.1	09-005.112998
160 ¥	PAX5 probe 12501-L22020		9p13.2	09-037.024272
166 *	CSF2RA probe 13892-L16221		Xp22.33-PAR region	X-001.374311
172 ¥	PAX5 probe 14647-L15394		9p13.2	09-037.010669
178 *	BTG1-AREA probe 18021-L22630		12q21.33	12-090.657641
184 *	P2RY8 probe 17837-L15740		Xp22.33-PAR region	X-001.545095
190 *	Reference probe 06941-L06521	11q12.3		11-061.483953
196 *	ETV6 probe 17838-L22035		12p13.2	12-011.935935
202 *	PAX5 probe 17839-L22036		9p13.2	09-036.956555
208	IKZF1 probe 14056-L15654		7p12.2	07-050.329206
214 *	Reference probe 13265-L15166	1p21.1		01-103.203651
220	RB1 probe 01782-L01346		13q14.2	13-047.821213
226	EBF1 probe 12509-L13559		5q33.3	05-158.459187
232	BTG1 probe 12542-L15913		12q22	12-091.063286
238	CDKN2B probe 10337-L15914		9p21.3	09-021.995813
244	ETV6 probe 13874-L17160		12p13.2	12-011.883341
251	CDKN2A probe 10333-L15916		9p21.3	09-021.964958
258 *	Reference probe 04534-L22019	2q24.3		02-166.606098
263	IKZF1 probe 13873-L15917		7p12.2	07-050.411797
269 ±	IKZF1 probe 13877-L15918		7p12.2	07-050.315024
274 *	PAX5 probe 17840-L22037		9p13.2	09-036.871952
282	PAX5 probe 13870-L15920		9p13.2	09-036.992699
288 *	IKZF1 probe 17109-L20256		7p12.2	07-050.436281
295 *	Reference probe 10435-L22110	9q34.3		09-136.850306
301 ±	ETV6 probe 14058-L15656		12p13.2	12-011.694211
308 *	CDKN2A probe 17814-L22631		9p21.3	09-021.957858
315 ¥	RB1 probe 01789-L22025		13q14.2	13-047.851428
324 ¥	Reference probe 03918-L20270	15q21.1		15-046.584530
330 ¥	BTG1 probe 12553-L22632		12q22	12-091.061700
337 *	PAX5 probe 17841-L22038		9p13.2	09-036.913345
343 ¥	IKZF1 probe 13869-L22296		7p12.2	07-050.426948
350 ¥	IL3RA probe 13907-L22294		Xp22.33-PAR region	X-001.415699
358 ¥	RB1 probe 01792-L22295		13q14.2	13-047.928372
364 *	Reference probe 14675-L16327	3p25.3		03-010.142307
371 ¥	EBF1 probe 14059-L22017		5q33.3	05-158.137017
379 *	IKZF1 probe 15427-L22113		7p12.2	07-050.337845
386 ¥ ±	ETV6 probe 14060-L22634		12p13.2	12-011.694327
393 *±	PAX5 probe 17842-L22633		9p13.2	09-036.829905
400 ¥	ETV6 probe 13875-L22014		12p13.2	12-011.796696
409 *	BTG1 AREA probe 18022-L22363		12q21.33	12-091.005964
418	RB1 probe 01797-L01360		13q14.2	13-047.945205
427 *	Reference probe 07924-L22013	20p13		20-001.867470
436 ¥	EBF1 probe 13868-L22053		5q33.3	05-158.071810
445	RB1 probe 01799-L01362		13q14.2	13-047.949488
454 *	Reference probe 11533-L20700	19q13.43		19-061.386348

Length (nt)	SALSA MLPA probe	Chromosomal position		
		reference	region	location (hg 18)
462 ‡	EBF1 probe 12527-L22010		5q33.3	05-158.057828
470 ‡	IKZF1 probe 14061-L22112		7p12.2	07-050.422502
477 *	Reference probe 14846-L22111	3q12.2		03-099.782925
484 ‡	ETV6 probe 13871-L22009		12p13.2	12-011.913644
493 *	Reference probe 15203-L16978	3p12.2		03-081.774613
503 *	Reference probe 09870-L19465	2p16.1		02-061.126370

* New in version B1 (from lot B1-0412 onwards).

‡ Changed in version B1 (from lot B1-0412 onwards). Small change in length, no change in sequence detected.

± This probe is located within, or close to, a very strong CpG island. A low signal of this probe can be due to incomplete sample DNA denaturation, e.g. due to the presence of salt in the sample DNA.

→ Flanking probe: Included to facilitate the determination of the extent of a deletion/duplication. Copy number alterations of flanking and reference probes are unlikely to be related to the condition tested.

Bijlage B: Het gebruikte werkblad bij de uitvoering van de MLPA-assay



WERKBLAD

MD2-DGxxx-WB01

M01

ALL ... pagina 1

SALSA MLPA voor ALL: ALL- ...

I. MLPA: (zie SOP MD1-MT029-PR)

Uitvoerder PCR:

Datum PCR:

A) Denaturatie(DAG 1): stock DNA 1/10 verdunnen in dH₂O -> 5µl verdund DNA (50-250 ng) / reactie

PCR-toestel:

Uur PCR:

PCR programma(PROG 76)

98°C - 5'

25°C pauze

Controle programma:

B) Hybridisatie (DAG 1):

Lotnummer	Hybridisatie mastermix	per staal	x.....	
B1-1012	probe mix (zwart)	1,5 µl	 µl
G052	MLPA buffer (geel)	1,5 µl	 µl
				3µl / staal
				(niet vortexen)

Uur PCR:

PCR programma(PROG 74)

95°C - 1'

60°C pauze (16 uur/overnacht)

Controle programma:

C) Ligatie (DAG 2): TOEVOEGEN IN PCR-TOESTEL

Lotnummer	Ligatie mastermix	per staal	x.....	
G057	Buffer A (transparant)	3 µl	 µl
G044	Buffer B (wit)	3 µl	 µl
.....	dH ₂ O	25 µl	 µl
G054	Ligase 65 (groen)	1 µl	 µl (niet vortexen!)
				32 µl / staal

Uur PCR:

PCR programma(PROG 74)

60°C → CONTINU → laat tot 54°C komen → PAUZE

(voeg de ligatiemix toe) → CONTINU

54 °C - 15'

98 °C - 5'

20 °C - ...

Controle programma:

WERKBLAD
MD2-DGxxx-WB01
M01

D) PCR (DAG 2):

Lotnummer	Polymerase mastermix	per staal	x.....
G051	Salsa PCR mix (bruin)	2 µl µl
.....	dH ₂ O	7,5 µl µl
G053	SALSA polymerase (oranje)	0,5 µl µl (niet vortexen!)
10 µl / staal			

Uur PCR:

Controle programma:

PCR programma (PROG 78) (+/- 1h 48 min)

95 °C - 30"	} 35 cycli
60 °C - 30"	
72 °C - 1'	
72 °C - 20'	
15 °C - ...	

II. Detectie: Fragmentanalyse op ABI (zie SOP LABB-MT023-PR)

Uitvoerder:

Datum:

Lotnummer		per staal	x.....
.....	HiDi-formamide	19,5 µl µl
.....	ROX 500 sizer	0,5 µl µl
20 µl + 1 µl staal			

PCR-toestel:

Uur PCR:

Controle programma:

PCR programma (DENATURATIE)

96 °C - 3'
4 °C - ...

ABI:....._FRAG....._ROU

Uitvoerder afdrukken profielen:

Datum afdrukken:

Uitvoerder interpretatie MLPA:

Datum interpretatie:

Controle interpretatie MLPA:

Datum controle interpretatie:

Bijlage C: De sequenties van de primers gebruikt bij QPCR

Gene name	Forward sequence	Reverse sequence	Position
<i>IKZF1</i>	CATGTCCCAAGTTTCAGGTGAG	GACTTCCGGCCCCAGG	Exon 2
<i>IKZF1</i>	CACACTTCTTCTTTCTCATCAGGG	GATCGGCATGGGCTCATC	Exon 3
<i>IKZF1</i>	TTACGAATGCTTGATGCCTCG	TCCAACCCCGACAAAGCC	Exon 4
<i>IKZF1</i>	TCATTCACCCAGAAGGGCA	GTTGCAGAGGTGGCATTGA	Exon 5
<i>IKZF1</i>	CATGCATTCCCCTTACACAGAA	GTGAGGTTTACCAACTGCAGAAAA	Exon 6
<i>IKZF1</i>	CAGAAGACCTGTGCAAGATAGGATC	AGCTCTTACGTTTGGCGACG	Exon 7
<i>IKZF1</i>	TTGTTTGAGTTGGTTGATTGGG	GGAAGGTAGCAGTTCTGGATGC	Exon 8
<i>PAX5</i>	GCGAGAACAGGACATGATCTCA	AAAAAAAGCGTCCGAAGGC	Exon 1
<i>PAX5</i>	CGCCAGAGGATAGTGGAACCTG	ACAACCATGGCTGACCCG	Exon 2
<i>PAX5</i>	ATTCGGCCGGCTCGTC	TTACCTTCGTCTCTTTCGCT	Exon 5
<i>PAX5</i>	CGGAAGCAGATGCGGG	TGAGTAGTGCTGCCTCTCAAACAC	Exon 6
<i>PAX5</i>	GGAGCTGTGGACATGAGCG	GCCAAGTCACGGCCTGAG	Exon 8
<i>PAX5</i>	CAGCCGCCACTGCCTATG	TGTCACCCTCAATAGGTGCCA	Exon 10
<i>CDKN2A</i>	CCAACGCACCGAATAGTTACG	GCTACCTGATTCCAATCCCCT	Exon 2
<i>CDKN2A</i>	CGCCCTAAGCGCACATTC	CAAATGCTTGTGTCATGAAGTCGAC	Exon 4
<i>CDKN2B</i>	TCATTCTACCAGATACACATTTAAAAGAGA	GTAAAGATTTGTGATTCAACTCAAATGTACTC	Exon 2
<i>B2M</i>	TCTAGGCGCCCCTAAGTT	TCGCGTGCTGTTTCCTCC	Intron 1-2
<i>RPLP0</i>	ATAAACGGGCTCAGGCAAGTT	CGCGCTCTTTAGAAAGCCAG	Intron 2-3
<i>TBP</i>	TCTCTCTGACCATTGTAGCGGTT	CCGTGGTTCGTGGCTCTCT	Intron 5-6 Exon 6

Bijlage D: overzichtstabel Coffalyser.net versus GeneMarker

Overzicht resultaten		Genemarker		Coffalyser.net		Genemarker		Coffalyser.net		Genemarker		Coffalyser.net		Genemarker		Coffalyser.net		Genemarker		Coffalyser.net		Genemarker		Coffalyser.net	
	MLPA probe	483125AE (t.o.v. cellijn)	[3 NC ALL5 4E483125 20verdund] [Final ratio]	Standaardafwijking tussen de beide software's	482022BA (t.o.v. cellijn)	[3 NC ALL6 482022BA] [Final ratio]	Standaardafwijking tussen de beide software's	483680BS (t.o.v. cellijn)	[3 NC ALL6 483680BS] [Final ratio]	Standaardafwijking tussen de beide software's	484385CR (t.o.v. cellijn)	[3 NC ALL6 484385CR] [Final ratio]	Standaardafwijking tussen de beide software's	481372DCI (t.o.v. cellijn)	[3 NC ALL6 481372DCI] [Final ratio]	Standaardafwijking tussen de beide software's	482862DCT (t.o.v. cellijn)	[3 NC ALL6 482862DCT] [Final ratio]	Standaardafwijking tussen de beide software's						
PAR1 regio																									
	SHOX-AREA	1,057	1,31	0,178898	1,354	1,24	0,0806102	1,156	1,19	0,0240416	1,311	1,46	0,1053589	0,846	0,82	0,0183848	1,332	1,37	0,0268701						
	CRLF2_ex04	1,031	1,33	0,2114249	1,121	1,06	0,0431335	1,693	1,58	0,0799031	1,079	1,1	0,0148492	1,264	1,15	0,0806102	1,112	1,06	0,0367696						
	CSF2RA_ex10	1,052	1,3	0,1753625	1,099	1,05	0,0346482	1,576	1,58	0,0028284	1,056	1,17	0,0806102	1,111	1,11	0,0007071	1,036	1,07	0,0240416						
	IL3RA_ex01	1,054	1,11	0,039598	1,145	1,15	0,0035355	1,45	1,43	0,0141421	1,069	1,19	0,0855599	0,856	0,96	0,0735391	1,007	1,11	0,072832						
	P2RY8_ex02	1,065	1,29	0,159099	1,121	1,05	0,0502046	1,44	1,37	0,0494975	1,106	1,17	0,0452548	1,037	0,97	0,0473762	1,21	1,19	0,0141421						
	ZFY_ex04	1,098	1,39	0,2064752	0	0	0	0	0	0,938	1	0,0438406	0	0	0	0,954	0,94	0,0098995							
EBF1 gen	EBF1_ex16	1,151	1,12	0,0219203	1,137	1,11	0,0190919	1,131	1,05	0,0572756	1,064	1,05	0,0098995	0,904	0,92	0,0113137	1,082	1,13	0,0339411						
	EBF1_ex14	1,114	1,18	0,046669	1,193	1,19	0,0021213	1,258	1,16	0,0692965	1,092	1,1	0,0056569	1,07	1,1	0,0212132	1,127	1,17	0,0304056						
	EBF1_ex10	1,115	1,04	0,053033	1,003	1	0,0021213	1,171	1,05	0,0855599	0,98	0,96	0,0141421	1,036	1,01	0,0183848	1,083	1,09	0,0049497						
	EBF1_ex01	1,062	1,1	0,0268701	1,084	0,98	0,0735391	1,177	1	0,1251579	1,122	1,06	0,0438406	1,11	0,96	0,106066	1,214	1,08	0,0947523						
IKZF1 gen	IKZF1_ex01	0,584	0,62	0,0254558	0,586	0,58	0,0042426	0,71	0,63	0,0565685	0,859	0,85	0,006364	1,321	1,23	0,0643467	0,734	0,71	0,0169706						
	IKZF1_ex02	0,617	0,7	0,0586899	0,066	0,06	0,0042426	0,663	0,61	0,0374767	0,824	0,79	0,0240416	1,32	1,21	0,077817	0,453	0,41	0,0304056						
	IKZF1_ex03	0,603	0,6	0,0021213	0	0,07	0,0494975	0,721	0,67	0,0360624	1,074	1,05	0,0169706	1,052	1,02	0,0226274	0,535	0,53	0,0035355						
	IKZF1_ex04	0,631	0,68	0,0346482	0,62	0,58	0,0282843	0,693	0,65	0,0304056	0,932	0,93	0,0014142	1,151	1,08	0,0502046	0,758	0,73	0,019799						
	IKZF1_ex05	0,589	0,7	0,0784889	0,634	0,53	0,0735391	0,622	0,55	0,0509117	1,096	1,07	0,0183848	1,031	0,9	0,092631	0,874	0,8	0,0523259						
	IKZF1_ex06	0,557	0,59	0,0233345	0,519	0,55	0,0219203	0,656	0,6	0,039598	1,091	1,06	0,0219203	0,924	0,94	0,0113137	0,822	0,85	0,019799						
	IKZF1_ex07	0,568	0,57	0,0014142	0,571	0,58	0,006364	0,68	0,64	0,0282843	0,781	0,79	0,006364	1,303	1,28	0,0162635	0,65	0,65	0						
	IKZF1_ex08	0,571	0,55	0,0148492	0,614	0,53	0,059397	0,545	0,5	0,0318198	1,196	1,17	0,0183848	1,055	0,99	0,0459619	0,978	0,99	0,0084853						
CDKN2A/B gen	JAK2_ex23	0,575	0,71	0,0954594	1,114	1,01	0,0735391	1,137	1,04	0,0685894	0,529	0,53	0,0007071	0,983	0,88	0,072832	1,005	0,93	0,053033						
	CDKN2A_ex05	0,54	0,52	0,0141421	0,635	0,55	0,0601041	0,468	0,45	0,0127279	0,183	0,2	0,0120208	0	0	0	1,177	1,21	0,0233345						
	CDKN2A_ex02	0,652	0,69	0,0268701	0	0,07	0,0494975	0,73	0,66	0,0494975	0,18	0,18	0	0,169	0,15	0,013435	1,062	1,02	0,0296985						
	CDKN2B_ex02	0	0,11	0,0777817	0	0,06	0,0424264	0,547	0,51	0,026163	0,208	0,22	0,0084853	0	0,15	0,106066	1,245	1,22	0,0176777						
PAX5 gen	PAX5_ex10	0,567	0,59	0,0162635	0,534	0,54	0,0042426	1,074	1,01	0,0452548	0,591	0,59	0,0007071	0,983	0,98	0,0021213	1,083	1,1	0,0120208						
	PAX5_ex08	0,596	0,64	0,0311127	0,684	0,64	0,0311127	1,12	1,03	0,0636396	0,707	0,69	0,0120208	1,042	1	0,0296985	1,155	1,1	0,0388909						
	PAX5_ex07	0,565	0,58	0,0106066	0,664	0,63	0,0240416	1,234	1,14	0,066468	0,601	0,63	0,0205061	1,244	1,23	0,0098995	1,082	1,1	0,0127279						
	PAX5_ex06	0,617	0,67	0,0374767	0,593	0,57	0,0162635	1,175	1,02	0,1096016	0,591	0,58	0,0077782	1,271	1,1	0,1209153	1,003	0,91	0,0657609						
	PAX5_ex05	0,522	0,6	0,0551543	0,572	0,59	0,0127279	0,876	0,91	0,0240416	0,58	0,65	0,0494975	0,753	0,8	0,033234	0,928	1,04	0,079196						
	PAX5_ex02	0,578	0,65	0,0509117	0,637	0,58	0,0403051	1,047	0,96	0,0615183	0,532	0,55	0,0127279	0,926	0,85	0,0537401	0,99	0,94	0,0353553						
	PAX5_ex01	0,563	0,65	0,0615183	0,597	0,53	0,0473762	0,983	0,93	0,0374767	0,608	0,61	0,0014142	0,981	0,89	0,0643467	0,927	0,86	0,0473762						
ETV6 gen	ETV6_ex01A	1,001	0,99	0,0077782	0,547	0,55	0,0021213	0,912	0,93	0,0127279	1,068	1,17	0,0721249	1,172	1,21	0,0268701	0,805	0,89	0,0601041						
	ETV6_ex01B	0,933	0,96	0,0190919	0,594	0,58	0,0098995	0,773	0,84	0,0473762	1,055	1,21	0,1096016	1,051	1,2	0,1053589	0,783	0,9	0,0827315						
	ETV6_ex10	1,051	1,12	0,0487904	0,938	1,03	0,0650538	1,123	1,07	0,0374767	0,973	0,99	0,0120208	1,285	1,34	0,0388909	0,488	0,51	0,0155563						
	ETV6_ex03	0,983	1,17	0,132229	1,151	1,1	0,0360624	1,125	1,07	0,0388909	1,117	1,17	0,0374767	1,215	1,18	0,0247487	0,595	0,6	0,0035355						
	ETV6_ex05	0,999	1,07	0,0502046	0,991	1,04	0,0346482	1,081	1,02	0,0431335	1,134	1,16	0,0183848	1,233	1,33	0,0685894	0,565	0,61	0,0318198						
	ETV6_ex08	1,051	1,26	0,1477853	1,05	1,02	0,0212132	1,105	1,05	0,0388909	1,026	1,08	0,0381838	1,381	1,34	0,0289914	0,521	0,53	0,006364						
BTG1 gen	BTG1-AREA_1	1,182	1,23	0,0339411	1,058	1,02	0,0268701	1,254	1,12	0,0947523	1,05	1,04	0,0070711	1,598	1,45	0,1046518	1,126	1,04	0,0608112						
	BTG1-AREA_2	0,634	0,67	0,0254558	0,632	0,65	0,0127279	1,254	1,21	0,0311127	0,733	0,76	0,0190919	1,479	1,54	0,0431335	0,792	0,83	0,0268701						
	BTG1_ex02	0,573	0,57	0,0021213	0,614	0,61	0,0028284	0,932	0,91	0,0155563	0,979	1,02	0,0289914	1,188	1,21	0,0155563	0,995	1,06	0,0459619						
	BTG1_ex01	1,164	1,23	0,046669	1,093	1,05	0,0304056	1,295	1,22	0,053033	0,915	0,95	0,0247487	1,706	1,62	0,0608112	1,032	1,06	0,019799						
RB1 gen	RB1_ex06	1,052	1,09	0,0268701	1,064	0,94	0,0876812	1,035	0,96	0,053033	1,181	1,17	0,0077782	0,93	0,87	0,0424264	1,158	1,08	0,0551543						
	RB1_ex14	1,043	1,08	0,026163	1,14	1,12	0,0141421	1,102	1,01	0,0650538	1,25	1,23	0,0141421	0,931	0,9	0,0219203	1,105	1,08	0,0176777						
	RB1_ex19	1,065	1,14	0,053033	1,149	1,16	0,0077782	1,163	1,09	0,0516188	0,911	0,91	0,0007071	1,096	1,1	0,0028284	0,815	0,84	0,0176777						
	RB1_ex24	1,063	1,03	0,0233345	1,034	1,06	0,0183848	0,899	0,91	0,0077782	1,119	1,22	0,0714178	0,8	0,88	0,0565685	0,889	0,99	0,0714178						
	RB1_ex26	1,049	1,06	0,0077782	0,982	1	0,0127279	0,913	0,87																

	Genemarker	Coffalyser.net		Genemarker	Coffalyser.net		Genemarker	Coffalyser.net		Genemarker	Coffalyser.net		Genemarker	Coffalyser.net		Genemarker	Coffalyser.net		
			[3 NC ALL6 1004423DF] [Final ratio]			[3 NC ALL6 GC481309 20xverdund] [Final ratio]			[3 NC ALL6 482770M] [Final ratio]			[3 NC ALL6 483860MC] [Final ratio]			[3 NC ALL4 20xVG486746] [Final ratio]			[3 NC ALL6 484627VST] [Final ratio]	
	MLPA probe	1004423DF (t.o.v. cellijn)		Standaardafwijking tussen de beide software's	481309GC (t.o.v. cellijn)		Standaardafwijking tussen de beide software's	482770M (t.o.v. cellijn)		Standaardafwijking tussen de beide software's	483860MC (t.o.v. cellijn)		Standaardafwijking tussen de beide software's	486746 VG (t.o.v. cellijn)		Standaardafwijking tussen de beide software's	484627VST (t.o.v. cellijn)		Standaardafwijking tussen de beide software's
PAR1 regio	SHOX-AREA	1,288	1,26	0,019799	0,913	1,04	0,0898026	1,63	1,79	0,1131371	1,17	1,3	0,0919239	1,057	1,05	0,0049497	1,489	1,62	0,092631
	CRLF2_ex04	1,01	1,07	0,0424264	0,972	1,18	0,1470782	1,341	1,36	0,013435	1,044	1,1	0,039598	1,093	1,1	0,0049497	1,265	1,26	0,0035355
	CSF2RA_ex10	0,744	0,79	0,0325269	1,007	1,13	0,0869741	1,202	1,3	0,0692965	1,33	1,44	0,0777817	1,039	1,09	0,0360624	1,096	1,17	0,0523259
	IL3RA_ex01	0,82	0,81	0,0070711	1,017	1,06	0,0304056	1,266	1,38	0,0806102	1,397	1,53	0,0940452	0,996	1,04	0,0311127	1,237	1,31	0,0516188
	P2RY8_ex02	0,741	0,75	0,006364	0,924	1,05	0,0890955	1,476	1,5	0,0169706	1,483	1,53	0,033234	1,003	0,99	0,0091924	1,362	1,36	0,0014142
	ZFY_ex04	1,03	1,11	0,0565685	1,153	1,32	0,1180868	0	0	0	0,917	0,99	0,0516188	0	0	0	0,862	0,89	0,019799
EBF1 gen	EBF1_ex16	0,992	0,93	0,0438406	1,037	1,04	0,0021213	1,06	1,05	0,0070711	0,967	0,97	0,0021213	1,022	1	0,0155563	1,116	1,09	0,0183848
	EBF1_ex14	1,144	1,1	0,0311127	1,121	1,25	0,0912168	0,986	0,98	0,0042426	0,983	0,98	0,0021213	1,042	1,07	0,019799	1,008	0,99	0,0127279
	EBF1_ex10	0,884	0,9	0,0113137	1,072	1,01	0,0438406	1,06	1,03	0,0212132	0,885	0,88	0,0035355	1,134	1,01	0,0876812	1,036	1	0,0254558
	EBF1_ex01	1,019	0,98	0,0275772	1,004	0,97	0,0240416	1,121	1,03	0,0643467	1,103	1,05	0,0374767	1,013	0,97	0,0304056	1,11	1	0,0777817
IKZF1 gen	IKZF1_ex01	0,997	1,01	0,0091924	1,15	1,16	0,0070711	0,908	0,86	0,0339411	1,015	1	0,0106066	1,07	0,99	0,0565685	0,897	0,88	0,0120208
	IKZF1_ex02	0,938	0,89	0,0339411	1,145	1,19	0,0318198	0,853	0,8	0,0374767	0,967	0,95	0,0120208	1,127	1,11	0,0120208	0,807	0,75	0,0403051
	IKZF1_ex03	0,959	0,89	0,0487904	0,985	1	0,0106066	1,004	0,98	0,0169706	0,964	0,93	0,0240416	0,923	0,92	0,0021213	1,081	1,05	0,0219203
	IKZF1_ex10	0,892	0,86	0,0226274	1,061	1,12	0,0417193	0,939	0,94	0,0007071	1,007	1,01	0,0021213	1,025	0,99	0,0247487	0,912	0,92	0,0056569
	IKZF1_ex05	1,045	0,99	0,0388909	0,887	1	0,0799031	0,968	0,95	0,0127279	0,922	0,91	0,0084853	0,923	0,88	0,0304056	1,051	0,99	0,0431335
	IKZF1_ex06	1,042	0,99	0,0367696	0,959	1,05	0,0643467	1,006	0,98	0,0183848	1,114	1,1	0,0098995	1,013	0,97	0,0304056	1,008	1,01	0,0014142
	IKZF1_ex07	0,862	0,87	0,0056569	1,127	1,11	0,0120208	0,777	0,77	0,0049497	0,834	0,83	0,0028284	1,039	1,04	0,0007071	0,762	0,76	0,0014142
	IKZF1_ex08	1,165	1,07	0,0671751	0,92	0,89	0,0212132	1,186	1,17	0,0113137	1,215	1,22	0,0035355	0,953	0,9	0,0374767	1,196	1,15	0,0325269
CDKN2A/B	JAK2_ex23	1,071	1,07	0,0007071	1,037	1,15	0,0799031	0,824	0,8	0,0169706	0,913	0,91	0,0021213	1,08	1,05	0,0212132	0,907	0,87	0,026163
	CDKN2A_ex05	0,85	0,77	0,0565685	0,492	0,48	0,0084853	1,223	1,23	0,0049497	1,297	1,32	0,0162635	1,07	0,97	0,0707107	1,071	1,07	0,0007071
	CDKN2A_ex02	0,67	0,68	0,0070711	0,683	0,71	0,0190919	1,046	0,99	0,039598	0,998	0,99	0,0056569	1,107	1,05	0,0403051	0,976	0,93	0,0325269
	CDKN2B_ex02	1,097	1,05	0,033234	0,51	0,57	0,0424264	1,058	1,09	0,026274	1,132	1,15	0,0127279	0,99	0,94	0,0353553	1,072	1,06	0,0084853
PAX5 gen	PAX5_ex10	0,956	0,94	0,0113137	0,565	0,62	0,0388909	1,171	1,16	0,0077782	1,109	1,09	0,013435	0,991	0,97	0,0148492	1,074	1,06	0,0098995
	PAX5_ex08	1,081	1,06	0,0148492	0,556	0,59	0,0240416	1,202	1,14	0,0438406	1,079	1,09	0,0077782	0,949	0,93	0,013435	1,2	1,14	0,0424264
	PAX5_ex07	1,168	1,13	0,0268701	0,627	0,63	0,0021213	1,081	1,08	0,0007071	1,205	1,19	0,0106066	1,056	1	0,039598	1,064	1,03	0,0240416
	PAX5_ex06	0,937	0,96	0,0162635	0,663	0,68	0,0120208	0,988	0,94	0,0339411	1,03	0,99	0,0282843	1,04	0,99	0,0353553	0,973	0,93	0,0304056
	PAX5_ex05	0,655	0,72	0,0459619	0,588	0,65	0,0438406	0,838	0,92	0,0579828	0,817	0,92	0,072832	0,842	0,9	0,0410122	0,897	0,96	0,0454777
	PAX5_ex02	0,672	0,67	0,0014142	0,562	0,59	0,019799	0,943	0,94	0,0021213	0,922	0,96	0,0268701	1,003	0,96	0,0304056	1	0,99	0,0070711
	PAX5_ex01	0,701	0,68	0,0148492	0,552	0,62	0,0480833	0,966	0,97	0,0028284	0,967	0,97	0,0021213	0,966	0,99	0,0169706	1,067	1,03	0,026163
ETV6-gen	ETV6_ex01A	1,105	1,14	0,0247487	0,615	0,61	0,0035355	0,967	1,04	0,0516188	0,997	1,09	0,0657609	0,943	0,94	0,0021213	0,941	1	0,0417193
	ETV6_ex01B	1,17	1,13	0,0282843	0,546	0,57	0,0169706	0,966	1,11	0,1018234	0,941	1,09	0,1053589	0,963	0,92	0,0304056	0,961	1,11	0,1053589
	ETV6_ex02	0,917	0,99	0,0516188	0,663	0,72	0,0403051	0,908	0,92	0,0084853	0,788	0,81	0,0155563	1,022	1,06	0,0268701	0,911	0,91	0,0007071
	ETV6_ex03	1,152	1,19	0,0268701	0,582	0,66	0,0551543	0,966	1,01	0,0311127	1,005	1,02	0,0106066	1,018	1,03	0,0084853	0,995	1,01	0,0106066
	ETV6_ex05	1,023	1	0,0162635	0,548	0,62	0,0509117	1,238	1,22	0,0127279	1,132	1,16	0,019799	0,89	0,87	0,0141421	1,176	1,2	0,0169706
	ETV6_ex08	0,969	1,02	0,0360624	0,913	1,03	0,0827315	0,936	0,99	0,0381838	0,785	0,85	0,0459619	0,929	0,96	0,0219203	0,984	0,98	0,0028284
BTG1-gen	BTG1-AREA_1	0,977	1	0,0162635	1,111	1,09	0,0148492	1,047	1	0,033234	1,047	1,02	0,0190919	1,092	1,05	0,0296985	1,05	0,97	0,0565685
	BTG1-AREA_2	0,877	0,88	0,0021213	1,165	1,25	0,061041	0,702	0,71	0,0056569	0,686	0,7	0,0098995	1,077	1,12	0,0304056	0,713	0,72	0,0049497
	BTG1_ex02	1	1,01	0,0070711	0,95	0,94	0,0070711	1,025	1,06	0,0247487	0,994	1,04	0,0325269	1,006	1,02	0,0098995	0,979	1,03	0,0360624
	BTG1_ex01	0,959	0,99	0,0219203	1,085	1,11	0,0176777	1,02	1,03	0,0070711	0,969	1	0,0219203	1,095	1,11	0,0106066	0,969	1	0,0219203
RB1-gen	RB1_ex06	1,094	1,08	0,0098995	0,955	0,93	0,0176777	1,14	1,11	0,0212132	1,168	1,18	0,0084853	0,963	0,91	0,0374767	1,158	1,12	0,0268701
	RB1_ex14	1,102	1,1	0,0014142	0,957	0,98	0,0162635	1,061	1,05	0,0077782	1,038	1,04	0,0014142	0,925	0,96	0,0247487	1,088	1,09	0,0014142
	RB1_ex19	1,038	1,05	0,0084853	1,112	1,14	0,019799	0,833	0,82	0,0091924	0,96	0,96	0	1,054	1,09	0,0254558	0,868	0,87	0,0014142
	RB1_ex24	1,168	1,17	0,0014142	0,961	0,99	0,0205061	0,966	1,04	0,0523259	0,881	0,96	0,0558614	0,909	0,91	0,0007071	0,939	1	0,0431335
	RB1_ex26	1,04	1,03	0,0070711	0,999	1,06	0,0431335	0,973	1	0,0190919	0,973	1,01	0,026163	0,968	1,02	0,0367696	0,973	1	0,0190919

Amplificatie monoallelische deletie biallelische deletie

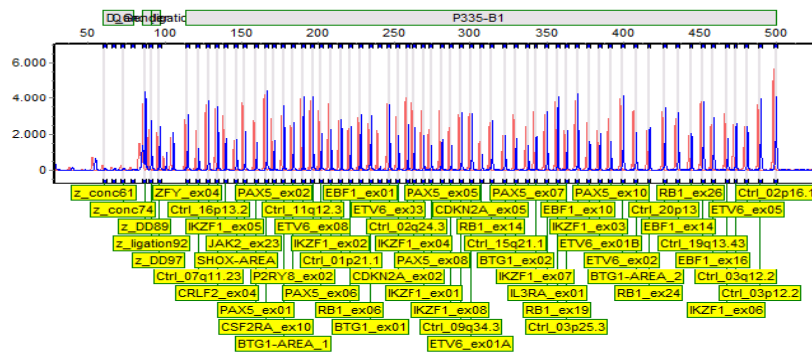
Bijlage E: Diagnostische informatie van de 12 onderzochte patiënten

naam patient	Geslacht	geboortejaar	soort staal	Diagnose	Moleculaire resultaten (2010 - 2014)			BCR-ABL e1a2	% blasts	Extra info diagnose
					t(12;21) (ETV6-RUNX1)	t(4;11) (MLL-AF4)	t(1;19) (TCF3-PBX)			
AE	M	28/03/1998	bloed	PRE-B-ALL	neg	neg	neg	pos	89	partiële deletie van 9p
BA	F	30/08/2001	bloed	PRECURSOR B-ALL	neg	neg	neg		91	monoallelische deletie CDKN2A + breekpunt op 14q32 waarschijnlijk t(X:14) (p22;q34)
BS	F	11/03/2010	BM	PRE-B-ALL	neg	neg	neg		98	hyperdiploidie (trisomie 14q32 en 21q22) + deletie van CDKN2A
CR	M	18/06/2008	BM	PRE-B-ALL	neg	neg	neg		90	afwijkingen in 9p + deletie van CDKN2A
DCJ	F	12/07/1985	BM	pre B-ALL		neg	neg		93	partiële trisomie 9 + deletie in CDKN2A
DCT	M	22/07/2010	bloed	pre-B-ALL	neg	neg	neg		53	pseudodiploid karyotype
DLF	M	17/10/2011	BM	PRECURSOR B-ALL	neg	neg	neg		93	hyperdiploid signaal
GC	M	11/09/2010	BM	PRE-B-ALL	pos	neg	neg		86	t(12;21) + extra kopie van chromosoom 21
JM	F	2/07/2010	BM	PRE-B-ALL	neg	neg	neg		93	hyperdiploid signaal
MC	M	21/09/2008	BM	PRE-B-ALL	pos	neg	neg		62	normaal
VG	F	30/12/1948	bloed	B-ALL		neg	neg	pos	19	normaal
VST	M	14/05/2009	BM	PRE-B-ALL	neg	neg	neg		67	hyperdiploidie

Bijlage F: De validatierapporten uit GeneMarker van de acht BCP-ALL-patiënten waarbij verschillende CNA's gedetecteerd werden

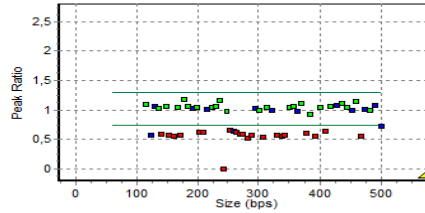
MLPA Analysis Report - SoftGenetics	
Software: GeneMarker V1.91	Analysis Type: MLPA
Project: ALL8.SGF	Compare Type: MLPA Ratio
Technician:	Normalization By: Population Normalization
Report Time: 05/19/2014 - 16:22:15	Quantification By: Peak Height
Panel: P335-B1	Classification: Loss < 0.75 <= Equivalent <= 1.30 < Gain
Control: 3_NC_ALL5_DLD1_20xverdud_B01_1.fsa	Report Value Type: Peak Ratio

3_NC_ALL5_AE483125_20xverdud_A02_1.fsa



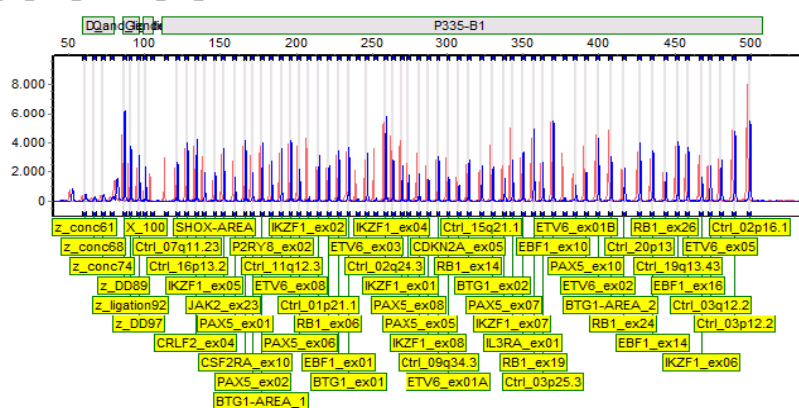
Sample Name: 3_NC_ALL5_AE483125_20xverdud
 Machine: AB13730-23171-010
 Run Time: 04/18/2014 - 15:19:27 -> 04/18/2014 - 16:05:10
 Statistics # Probes Mean StdDev
 Control/Sample 13/43 0.94/0.84 0.177/0.25

Conclusion		
	Date	Initial
Authorization 1		
Authorization 2		



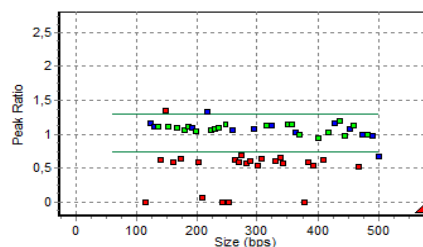
MLPA Analysis Report - SoftGenetics	
Software: GeneMarker V1.91	Analysis Type: MLPA
Project: ALL8.SGF	Compare Type: MLPA Ratio
Technician:	Normalization By: Population Normalization
Report Time: 05/19/2014 - 16:09:35	Quantification By: Peak Height
Panel: P335-B1	Classification: Loss < 0.75 <= Equivalent <= 1.30 < Gain
Control: 3_NC_ALL8_DLD1_A01_1.fsa	Report Value Type: Peak Ratio

3_NC_ALL8_BA482022_B02_1.fsa



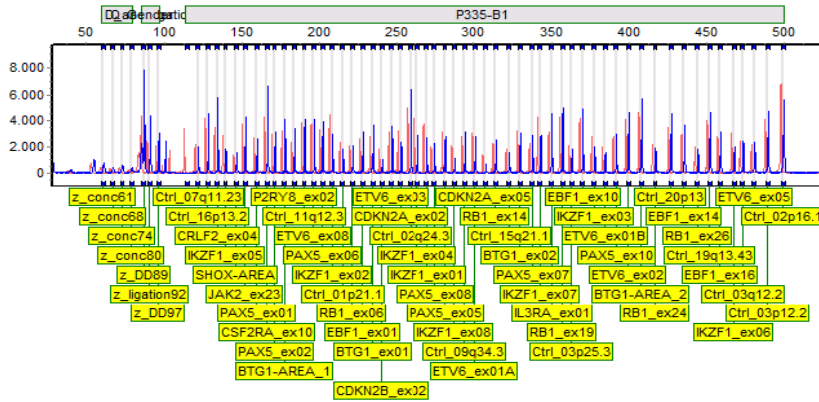
Sample Name: 3_NC_ALL8_BA482022
 Machine: AB13730-23171-010
 Run Time: 05/15/2014 - 10:24:19 -> 05/15/2014 - 11:20:17
 Statistics # Probes Mean StdDev
 Control/Sample 13/40 1.07/0.85 0.15/0.29

Conclusion		
	Date	Initial
Authorization 1		
Authorization 2		



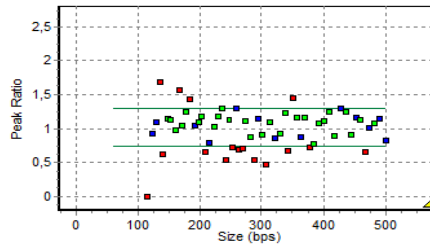
MLPA Analysis Report - SoftGenetics	
Software: GeneMarker V1.91	Analysis Type: MLPA
Project: ALL6.SGF	Compare Type: MLPA Ratio
Technician:	Normalization By: Population Normalization
Report Time: 05/19/2014 - 16:20:58	Quantification By: Peak Height
Panel: P335-B1	Classification: Loss < 0.75 <= Equivalent <= 1.30 < Gain
Control: 3_NC_ALL6_DLD1_A01_1.fsa	Report Value Type: Peak Ratio

3_NC_ALL6_483680BS_H01_1.fsa



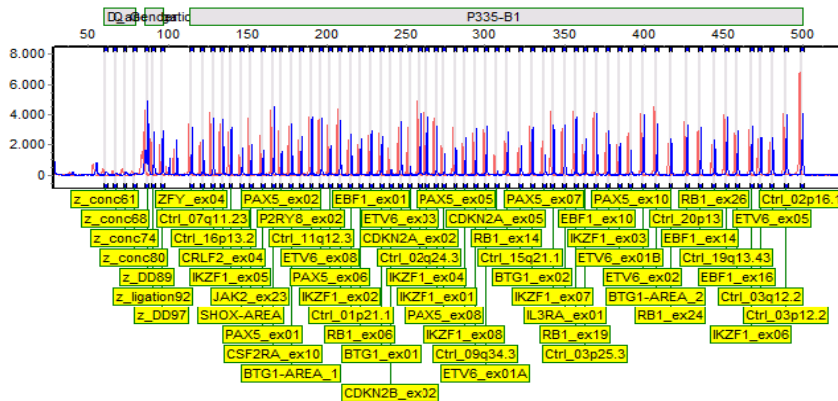
Sample Name: 3_NC_ALL6_483680BS
Machine: ABI3730-23171-010
Run Time: 04/23/2014 - 19:30:37 -> 04/23/2014 - 20:14:14
Statistics # Probes Mean StdDev
Control/Sample 13/43 1.04/1.02 0.17/0.28

Conclusion	Date	Initial
Authorization 1		
Authorization 2		



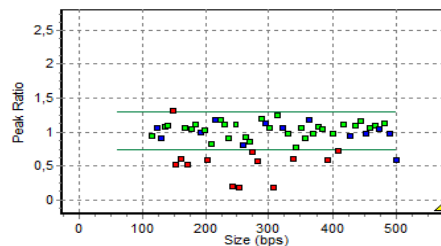
MLPA Analysis Report - SoftGenetics	
Software: GeneMarker V1.91	Analysis Type: MLPA
Project: ALL6.SGF	Compare Type: MLPA Ratio
Technician:	Normalization By: Population Normalization
Report Time: 05/19/2014 - 16:20:58	Quantification By: Peak Height
Panel: P335-B1	Classification: Loss < 0.75 <= Equivalent <= 1.30 < Gain
Control: 3_NC_ALL6_DLD1_A01_1.fsa	Report Value Type: Peak Ratio

3_NC_ALL6_484385CR_A02_1.fsa



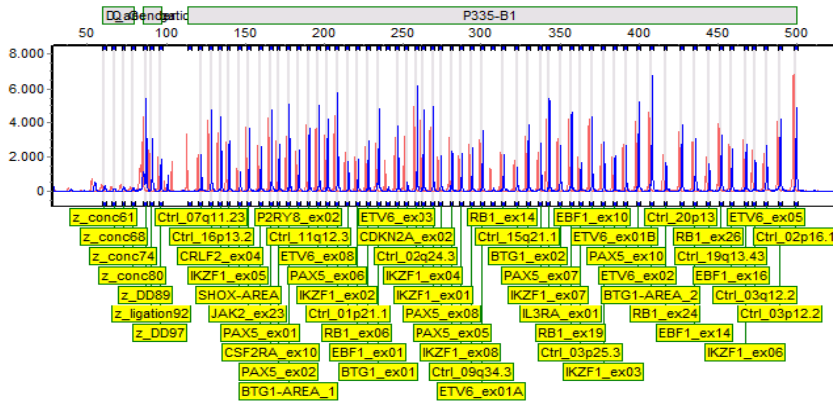
Sample Name: 3_NC_ALL6_484385CR
Machine: ABI3730-23171-010
Run Time: 04/23/2014 - 19:30:37 -> 04/23/2014 - 20:14:14
Statistics # Probes Mean StdDev
Control/Sample 13/44 0.99/0.90 0.16/0.28

Conclusion	Date	Initial
Authorization 1		
Authorization 2		



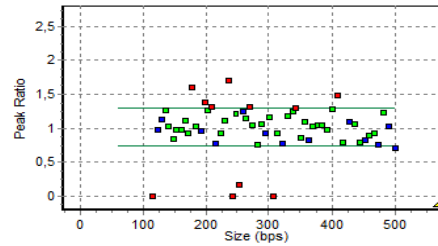
MLPA Analysis Report - SoftGenetics	
Software: GeneMarker V1.91	Analysis Type: MLPA
Project: ALL6.SGF	Compare Type: MLPA Ratio
Technician:	Normalization By: Population Normalization
Report Time: 05/19/2014 - 16:20:57	Quantification By: Peak Height
Panel: P335-B1	Classification: Loss < 0.75 <= Equivalent <= 1.30 < Gain
Control: 3_NC_ALL6_DLD1_A01_1.fsa	Report Value Type: Peak Ratio

3_NC_ALL6_481372DCJ_D01_1.fsa



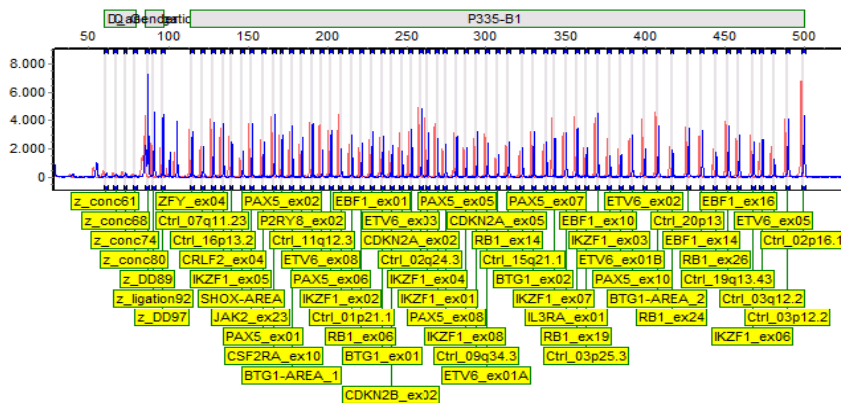
Sample Name: 3_NC_ALL6_481372DCJ
Machine: ABI3730-23171-010
Run Time: 04/23/2014 - 19:30:37 -> 04/23/2014 - 20:14:14
Statistics # Probes Mean StdDev
Control/Sample 13/41 0.93/1.09 0.17/0.26

Conclusion	Date	Initial
Authorization 1		
Authorization 2		



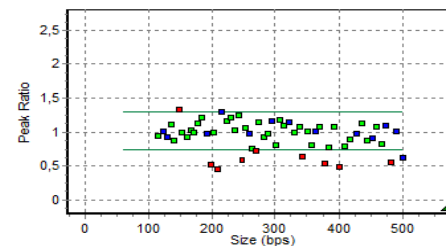
MLPA Analysis Report - SoftGenetics	
Software: GeneMarker V1.91	Analysis Type: MLPA
Project: ALL6.SGF	Compare Type: MLPA Ratio
Technician:	Normalization By: Population Normalization
Report Time: 05/19/2014 - 16:20:58	Quantification By: Peak Height
Panel: P335-B1	Classification: Loss < 0.75 <= Equivalent <= 1.30 < Gain
Control: 3_NC_ALL6_DLD1_A01_1.fsa	Report Value Type: Peak Ratio

3_NC_ALL6_482862DCT_G01_1.fsa



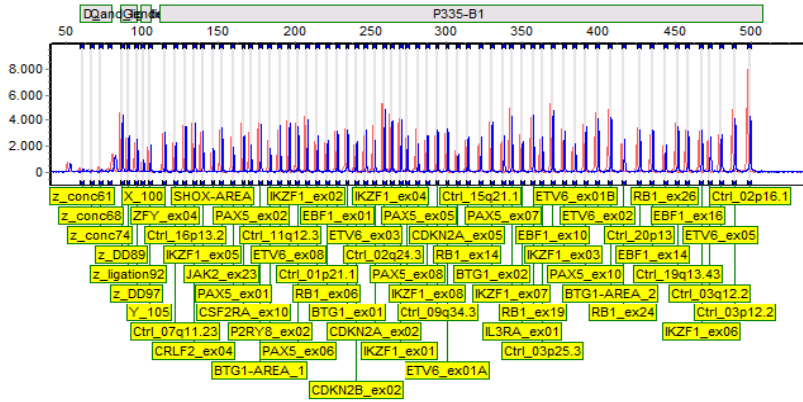
Sample Name: 3_NC_ALL6_482862DCT
Machine: ABI3730-23171-010
Run Time: 04/23/2014 - 19:30:37 -> 04/23/2014 - 20:14:14
Statistics # Probes Mean StdDev
Control/Sample 13/44 1.01/0.94 0.16/0.22

Conclusion	Date	Initial
Authorization 1		
Authorization 2		



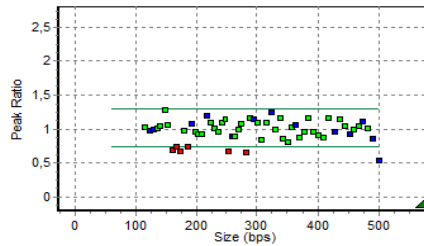
MLPA Analysis Report - SoftGenetics	
Software: GeneMarker V1.91	Analysis Type: MLPA
Project: ALL8.SGF	Compare Type: MLPA Ratio
Technician:	Normalization By: Population Normalization
Report Time: 05/19/2014 - 16:09:36	Quantification By: Peak Height
Panel: P335-B1	Classification: Loss < 0.75 <= Equivalent <= 1.30 < Gain
Control: 3_NC_ALL8_DLD1_A01_1.fsa	Report Value Type: Peak Ratio

3_NC_ALL8_DLF486986_C02_1.fsa



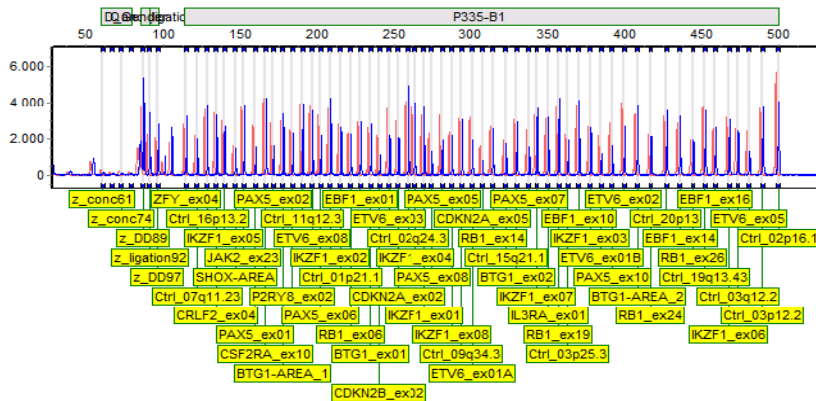
Sample Name: 3_NC_ALL8_DLF486986
Machine: ABI3730-23171-010
Run Time: 05/15/2014 - 10:24:19 -> 05/15/2014 - 11:20:17
Statistics # Probes Mean StdDev
Control/Sample 13/44 1.00/0.98 0.18/0.15

Conclusion	Date	Initial
Authorization 1		
Authorization 2		



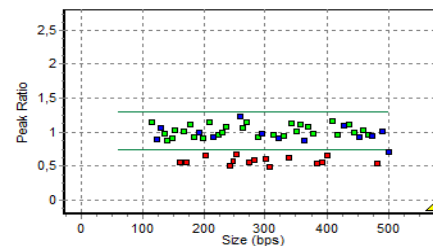
MLPA Analysis Report - SoftGenetics	
Software: GeneMarker V1.91	Analysis Type: MLPA
Project: ALL5.SGF	Compare Type: MLPA Ratio
Technician:	Normalization By: Population Normalization
Report Time: 05/19/2014 - 16:22:15	Quantification By: Peak Height
Panel: P335-B1	Classification: Loss < 0.75 <= Equivalent <= 1.30 < Gain
Control: 3_NC_ALL5_DLD1_20xverdud_B01_1.fsa	Report Value Type: Peak Ratio

3_NC_ALL5_GC481309_20xverdud_G01_1.fsa



Sample Name: 3_NC_ALL5_GC481309_20xverdud
Machine: ABI3730-23171-010
Run Time: 04/18/2014 - 15:19:27 -> 04/18/2014 - 16:05:10
Statistics # Probes Mean StdDev
Control/Sample 13/44 0.97/0.87 0.13/0.22

Conclusion	Date	Initial
Authorization 1		
Authorization 2		



Auteursrechtelijke overeenkomst

Ik/wij verlenen het wereldwijde auteursrecht voor de ingediende eindverhandeling:

Gebruik van MLPA bij de diagnostische work-up van B-cel precursor acute lymfoblastische leukemie

Richting: **master in de industriële wetenschappen: biochemie**

Jaar: **2014**

in alle mogelijke mediaformaten, - bestaande en in de toekomst te ontwikkelen - , aan de Universiteit Hasselt.

Niet tegenstaand deze toekenning van het auteursrecht aan de Universiteit Hasselt behoud ik als auteur het recht om de eindverhandeling, - in zijn geheel of gedeeltelijk -, vrij te reproduceren, (her)publiceren of distribueren zonder de toelating te moeten verkrijgen van de Universiteit Hasselt.

Ik bevestig dat de eindverhandeling mijn origineel werk is, en dat ik het recht heb om de rechten te verlenen die in deze overeenkomst worden beschreven. Ik verklaar tevens dat de eindverhandeling, naar mijn weten, het auteursrecht van anderen niet overtreedt.

Ik verklaar tevens dat ik voor het materiaal in de eindverhandeling dat beschermd wordt door het auteursrecht, de nodige toelatingen heb verkregen zodat ik deze ook aan de Universiteit Hasselt kan overdragen en dat dit duidelijk in de tekst en inhoud van de eindverhandeling werd genotificeerd.

Universiteit Hasselt zal mij als auteur(s) van de eindverhandeling identificeren en zal geen wijzigingen aanbrengen aan de eindverhandeling, uitgezonderd deze toegelaten door deze overeenkomst.

Voor akkoord,

Cordie, Natasja

Datum: **11/06/2014**