

# TruSight™ Tumor 170

Ein umfassender Sequenzierungs-Assay der nächsten Generation, der DNA- und RNA-Varianten aus derselben formalinfixierten, in Paraffin eingebetteten Tumorprobe (FFPE) abdeckt.

### Vorteile

- **Umfassende Abdeckung krebsrelevanter Varianten**  
Einzel-Assay-Effizienz, bei der DNA und RNA zur Auswertung kleiner Varianten, Amplifikationen, Spleißvarianten und Fusionen verwendet werden
- **Integrierter, optimierter Workflow**  
DNA- und RNA-Bibliotheken werden parallel über einen integrierten Workflow nach dem Schneiden der DNA bzw. der Synthese der cDNA vorbereitet
- **Genauere Ergebnisse aus Proben mit schlechter Qualität**  
Variantenerkennung mit 40 ng DNA-/RNA-Zugabe und bei einer Mutantallelhäufigkeit von nur 5 % aus FFPE-Proben

Um Forscher bei der Bewältigung dieser Herausforderung zu unterstützen, bietet Illumina TruSight Tumor 170, einen Sequenzierungs-Assay der nächsten Generation. Der Assay wurde für die Abdeckung von 170 Genen entwickelt, die mit soliden Tumoren in Zusammenhang stehen. TruSight Tumor 170 ist ein anreicherungs-basiertes Zielpanel, das gleichzeitig DNA und RNA analysiert und ein großes Spektrum von Genen und Variantentypen abdeckt. Das Panel ist für die Verwendung mit den Sequenzierungssystemen NextSeq™ 500, NextSeq 550 oder HiSeq™ 2500 konzipiert (Abbildung 1).

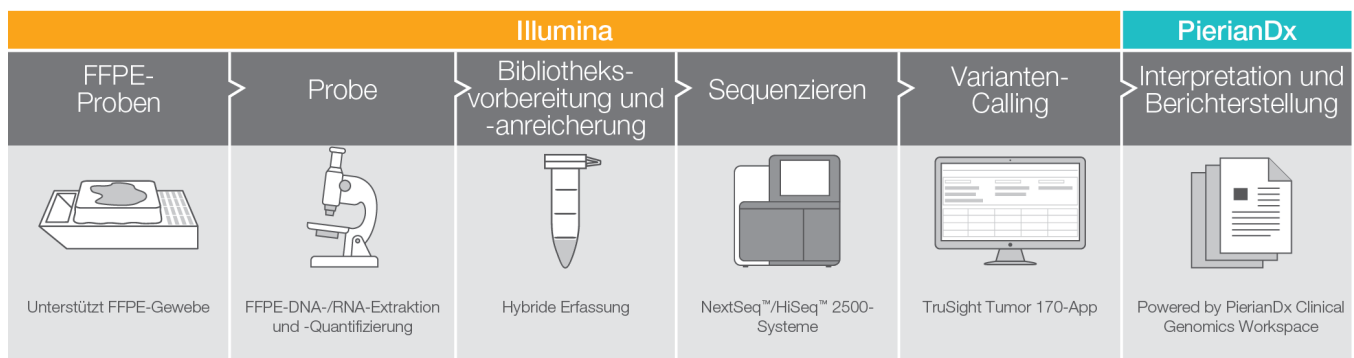
### Umfassendes krebsrelevantes inhaltliches Design

TruSight Tumor 170 deckt alle codierenden Exons gemäß der aktuellen RefSeq-Datenbank<sup>2</sup> von 170 Genen (Tabelle 1) ab. Die Gene und Variantentypen für jedes Gen wurden sorgfältig ausgewählt und umfassen Inhalte, die von Branchenorganisationen wie dem National Comprehensive Cancer Network (NCCN) und der European Society for Medical Oncology (ESMO) zitiert werden.<sup>3,4</sup>

Publikationen unabhängiger Arbeitsgemeinschaften und marktnahe pharmazeutische Forschungen haben das Design von TruSight Tumor 170 ebenfalls beeinflusst. Der Inhalt umfasst 55 Gene für Fusionen und Spleißvarianten, 148 SNVs und Indels und 59 Amplifikationen. TruSight Tumor 170 nutzt die Fachkompetenz anerkannter Autoritäten im Bereich der Onkologie und bietet Forschern eine umfassende Abdeckung der Varianten, die am wahrscheinlichsten eine Rolle in der Tumorgenese spielen.

### Einleitung

Krebs ist eine der Haupttodesursachen weltweit und kann sich potenziell in jedem Gewebe entwickeln.<sup>1</sup> Die Analyse der genetischen Basis eines bestimmten Tumors ist wichtig, um zu verstehen, wie er sich entwickelt, und um neue Behandlungsmethoden zu finden. Zahlreiche Gene können jedoch die Tumorentwicklung verursachen oder beeinflussen und viele heterogene Tumore können mehrere Mutationen enthalten. Des Weiteren kann die Funktion eines Gens durch mehrere Variantentypen geändert werden, darunter Einzelnukleotid-Varianten (SNV, Single-Nucleotide Variant), Mehrfachnukleotid-Varianten (MNV, Multiple-Nucleotide Variant), kleine Insertionen oder Deletionen (Indels), Amplifikationen, Spleißvarianten und Genfusionen. Daher fällt es Forschern schwer, Tumore effizient zu analysieren, wenn die verfügbaren Methoden nur einen Teil dieser Variationen abdecken und bei sequenziellen Testen kostbares Gewebe sowie kostbare Zeit und Ressourcen verbraucht werden.



**Abbildung 1: TruSight Tumor 170-Workflow** – TruSight Tumor 170 ist für die Integration in bestehende Laborabläufe optimiert. Das komplette Verfahren von der Nukleinsäuren-Extraktion bis zum Varianten-Calling dauert weniger als 4 Tage. Der Assay kann auf Systemen der NextSeq-Serie oder auf dem HiSeq 2500-System ausgeführt werden.

Tabelle 1: Geninhalte im TruSight Tumor 170-Assay

SNVs und Indels (aus DNA)									
AKT1	BRIP1	CREBBP	FANCI	FGFR2	JAK3	MSH3	PALB2	RAD51D	TSC1
AKT2	BTK	CSF1R	FANCL	FGFR3	KDR	MSH6	PDGFRA	RAD54L	TSC2
AKT3	CARD11	CTNNB1	FBXW7	FGFR4	KIT	MTOR	PDGFRB	RB1	VHL
ALK	CCND1	DDR2	FGF1	FLT1	KMT2A (MLL)	MUTYH	PIK3CA	RET	XRCC2
APC	CCND2	DNMT3A	FGF2	FLT3	KRAS	MYC	PIK3CB	RICTOR	
AR	CCNE1	EGFR	FGF3	FOXL2	MAP2K1	MYCL1	PIK3CD	ROS1	
ARID1A	CD79A	EP300	FGF4	GEN1	MAP2K2	MYCN	PIK3CG	RPS6KB1	
ATM	CD79B	ERBB2	FGF5	GNA11	MCL1	MYD88	PIK3R1	SLX4	
ATR	CDH1	ERBB3	FGF6	GNAQ	MDM2	NBN	PMS2	SMAD4	
BAP1	CDK12	ERBB4	FGF7	GNAS	MDM4	NF1	PPP2R2A	SMARCB1	
BARD1	CDK4	ERCC1	FGF8	HNF1A	MET	NOTCH1	PTCH1	SMO	
BCL2	CDK6	ERCC2	FGF9	HRAS	MLH1	NOTCH2	PTEN	SRC	
BCL6	CDKN2A	ERG	FGF10	IDH1	MLL3	NOTCH3	PTPN11	STK11	
BRAF	CEBPA	ESR1	FGF14	IDH2	MPL	NPM1	RAD51	TERT	
BRCA1	CHEK1	EZH2	FGF23	INPP4B	MRE11A	NRAS	RAD51B	TET2	
BRCA2	CHEK2	FAM175A	FGFR1	JAK2	MSH2	NRG1	RAD51C	TP53	
Amplifikationen (aus DNA)									
AKT2	BRCA2	CHEK1	ERCC2	FGF5	FGF14	FGFR4	MDM4	NRG1	RAF1
ALK	CCND1	CHEK2	ESR1	FGF6	FGF19	JAK2	MET	PDGFRA	RET
AR	CCND3	EGFR	FGF1	FGF7	FGF23	KIT	MYC	PDGFRB	RICTOR
ATM	CCNE1	ERBB2	FGF2	FGF8	FGFR1	KRAS	MYCL1	PIK3CA	RPS6KB1
BRAF	CDK4	ERBB3	FGF3	FGF9	FGFR2	LAMP1	MYCN	PIK3CB	TFRC
BRCA1	CDK6	ERCC1	FGF4	FGF10	FGFR3	MDM2	NRAS	PTEN	
Fusionen und Spleißvarianten (aus RNA)									
ABL1	BRAF	EML4	ETV4	FGFR4	KIF5B	MYC	NTRK2	PIK3CA	TMPRSS2
AKT3	BRCA1	ERBB2	ETV5	FLI1	KIT	NOTCH1	NTRK3	PPARG	
ALK	BRCA2	ERG	EWSR1	FLT1	KMT2A (MLL)	NOTCH2	PAX3	RAF1	
AR	CDK4	ESR1	FGFR1	FLT3	MET	NOTCH3	PAX7	RET	
AXL	CSF1R	ETS1	FGFR2	JAK2	MLL3	NRG1	PDGFRA	ROS1	
BCL2	EGFR	ETV1	FGFR3	KDR	MSH2	NTRK1	PDGFRB	RPS6KB1	

## Kombinierter Workflow für DNA und RNA

Bei der Bibliotheksvorbereitung für TruSight Tumor 170 wird eine Anreicherungsverfahren verwendet, die gleichzeitig auf aus der Probe entnommene DNA und RNA angewendet werden kann. Nach den ersten Schritten, bei denen genomische DNA geschnitten und RNA in cDNA umgewandelt wird, geht die Bibliotheksvorbereitung in einen kombinierten Workflow über (Abbildung 2).

- Die geschnittene DNA und die cDNA werden in sequenzierbare Bibliotheken umgewandelt.
- Regionen von Interesse werden an biotinylierte Sonden hybridisiert, magnetisch mit Streptavidin-beschichteten Beads heruntergezogen und eluiert, um den Bibliothekenpool anzureichern.
- Bibliotheken werden vor dem Pooling und der Sequenzierung mithilfe von Bead-basierten Protokollen normalisiert.

## TruSight Tumor 170-Datenanalyse

Die Sequenzierungssysteme von Illumina bieten die Möglichkeit der Verbindung mit BaseSpace® Sequence Hub, der Genomik-Computerumgebung von Illumina für die Analyse und Verwaltung der Sequenzierungsdaten. Forscher können Sequenzierungsdaten

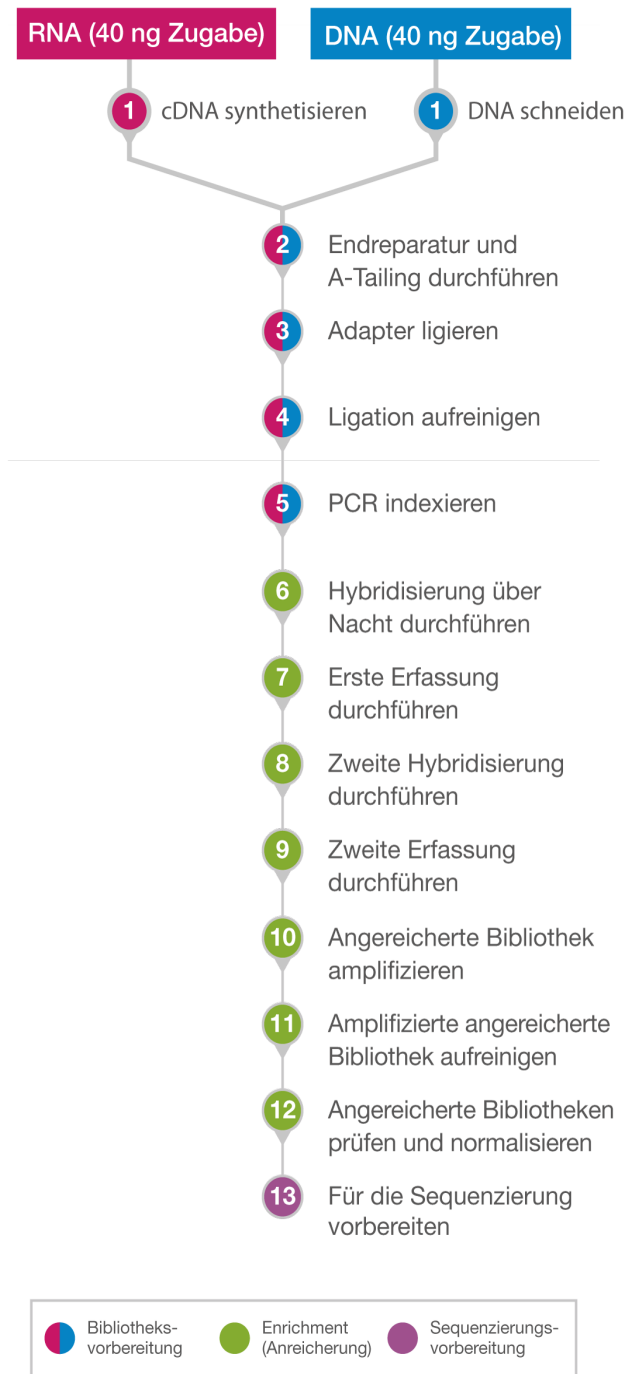
sicher speichern, analysieren, archivieren und gemeinsam nutzen. Die TruSight Tumor 170-App wurde für das Erstellen von Varianten-Calls entwickelt, die nachgelagerte Berichte in einem leicht zu lesenden Format ermöglichen. Rohdatenausgaben für kleine Varianten, Amplifikationen, Fusionen und Spleißvarianten sowie benutzerfreundliche, zielgerichtete Ausgaben für zuverlässige RNA-Varianten und Fusionsergebnisse werden bereitgestellt.

Die TruSight Tumor 170-App ist in BaseSpace Sequence Hub verfügbar. Für Benutzer, die eine lokale Sekundäranalyse wünschen, bietet Illumina ein Docker-basiertes Image der App. Wenden Sie sich an Ihren zuständigen Vertriebsbeauftragten oder Supportmitarbeiter, wenn Sie weitere Informationen benötigen.

## Empfindliche, hochgradig zuverlässige Variantenerkennung

Die Tiefensequenzierung mit NGS bietet die hohe Empfindlichkeit, die zur Erkennung somatischer Varianten in Tumorsubpopulationen notwendig ist. Die Chemie zur Sequenzierung durch Synthese (SBS) von Illumina ist die branchenweit am meisten verwendete NGS-Technologie, mit der mehr als 90 % der Sequenzierungsdaten weltweit erzeugt werden.\* In Verbindung mit einer hochwertigen

Sequenzierung auf dem NextSeq- und dem HiSeq-System bietet TruSight Tumor 170 eine einheitliche Abdeckung der Zielregionen, bei der somatische Mutationen bei einer Mutantenallelhäufigkeit von nur 5 % mit einer  $\geq 250$ -fachen Mindestabdeckung identifiziert werden (Tabelle 2).



**Abbildung 2: Kombinerter Workflow für die Bibliotheksvorbereitung** – Für die DNA- und RNA-Proben wird nach dem cDNA-Syntheseschritt (für RNA) und dem Schneideschritt (für DNA) derselbe Workflow angewandt.

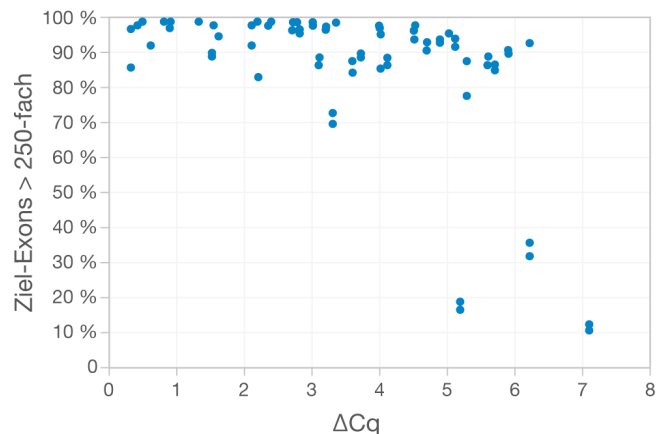
\* Archivierte Datenberechnungen, Illumina, Inc., 2015.

**Tabelle 2: Spezifikationen**

Parameter	Details
System	NextSeq- oder HiSeq 2500-System
Panelgröße	533 kb DNA 358 kb RNA
Mindest-Insertgröße	79 bp DNA 63 bp RNA
Erforderliche DNA-Zugabe	40 ng insgesamt
Erforderliche RNA-Zugabe	40 ng insgesamt
Bibliotheksvorbereitungsdauer	32 Stunden
Laufzeit der Sequenzierung	24 Stunden (NextSeq-Systeme) oder 27 Stunden (HiSeq 2500-System)
Sequenzierungslauf	2 x 101 Zyklen
Kit-Größe	24 Proben (DNA und RNA)
Probendurchsatz	Acht Proben je Lauf (NextSeq-Systeme) oder sechs Proben je Schnelllauf (HiSeq 2500-System)
Empfindlichkeit	Mutantenallelhäufigkeit von 5 % Über 95-prozentige Empfindlichkeit und Genauigkeit

### Hohe Abdeckung bei Zielen aus Proben schlechter Qualität

Bei Nucleinsäuren, die aus FFPE-Gewebe extrahiert werden, besteht das Risiko, dass sie die Qualitätssicherungsprüfungen nicht bestehen und eine schlechte Zielabdeckung ergeben. Dies führt zu einer niedrigen analytischen Sensitivität. TruSight Tumor 170 geht dieses Problem an, indem Bibliotheken aus Nucleinsäuren mit kleiner Fragmentgröße erstellt werden – mit nur 79 bp für DNA und 63 bp für RNA. Dies ermöglicht eine umfassende Abdeckung von FFPE-Proben, selbst wenn die Qualität der extrahierten Nucleinsäuren schlecht ist (Abbildung 3).



**Abbildung 3: Zielabdeckung aus FFPE-Proben** – Die DNA wurde aus den FFPE-Tumorproben von unterschiedlicher Qualität extrahiert und anschließend mit dem TruSight Tumor 170-Assay bewertet und auf dem NextSeq 500-System sequenziert. Die Qualität jeder Probe wurde auch mithilfe von qPCR zum Messen von DNA-Amplifikationspotenzial bewertet. Der  $\Delta Cq$ -Wert gibt die Differenz zwischen dem Ct-Wert (Schwellenwert-Zyklus) jeder DNA-Probe und dem Ct-Wert eines DNA-Standardwerts an.

## Zuverlässige Erkennung kleiner Varianten aus Proben von guter und schlechter Qualität

TruSight Tumor 170 bietet die erforderliche Empfindlichkeit und Genauigkeit zum Identifizieren von seltenen Varianten in Proben mit unterschiedlicher Qualität. Die hohe Zielabdeckung ermöglicht das zuverlässige Calling seltener Varianten in charakterisierten Zelllinien (Tabelle 3). TruSight Tumor 170 ermöglicht die Variantenerkennung in FFPE-Tumorproben mit einer Mutantallelhäufigkeit von nur 5 % (Tabelle 4).

**Tabelle 3: Calling kleiner Varianten mit charakterisierten Zelllinien**

Gen	Mutation	Berichtete Häufigkeit	Erkannte Häufigkeit	Abdeckung
APC	R2714C	0,33	0,31	2.547-fach
ARID1A	P1562fs	0,34	0,31	419-fach
BRAF	V600E	0,10	0,11	2.282-fach
BRCA2	A1689fs	0,33	0,30	1.097-fach
EGFR	G719S	0,24	0,22	2.207-fach
EP300	K291fs	0,08	0,06	1.359-fach
FBXW7	G667fs	0,34	0,30	2.870-fach
FGFR1	P150L	0,08	0,08	1.102-fach
FLT3	S985fs	0,10	0,10	1.925-fach
FLT3	V197A	0,12	0,10	1.908-fach
IDH1	S261L	0,10	0,09	2.052-fach
KIT	D816V	0,10	0,15	1.239-fach
KRAS	G13D	0,15	0,14	1.507-fach
KRAS	G12D	0,06	0,07	1.503-fach
MET	V237fs	0,06	0,06	3.700-fach
MLH1	L323M	0,08	0,09	1.725-fach
NF1	L626fs	0,08	0,10	1.270-fach
NOTCH1	P668S	0,32	0,32	1.637-fach
NRAS	Q61K	0,12	0,14	1.824-fach
PDGFRA	G426D	0,34	0,29	2.018-fach
PI3KCA	E545K	0,09	0,16	773-fach
PI3KCA	H1047R	0,18	0,15	1.694-fach

Die DNA aus HD200, einer formalinfixierten Zelllinie (Horizon Diagnostics) mit bekannten Varianten, wurde mit dem TruSight Tumor 170-Assay bewertet und mit dem NextSeq 500-System sequenziert. Eine 100%ige Übereinstimmung wurde mit der erwarteten Häufigkeit bei allen HD200-Varianten beobachtet.

**Tabelle 4: Erkennung kleiner Varianten mit FFPE-Tumorproben**

Probe	Berichtete Mutation	Erkannte Mutation	Erkannte Häufigkeit	Abdeckung
FFPE_Colon	TP53 R158C	TP53 R158C	0,057	1.545-fach
FFPE_Bone	TP53 P72R	TP53 P72R	0,059	515-fach
FFPE_Brain1	PIK3CA E545G	PIK3CA E545G	0,078	289-fach
FFPE_Brain2	PIK3CA H1047R	PIK3CA H1047R	0,076	531-fach
FFPE_Breast	KRAS G12D	KRAS G12D	0,049	1.671-fach
FFPE_Lung1	KRAS G12D	KRAS G12D	0,059	575-fach
FFPE_Lung2	TP53 C242F	TP53 C242F	0,080	691-fach
FFPE_Skin	TP53 R248Q	TP53 R248Q	0,050	1.240-fach

Die DNA wurde aus den FFPE-Tumorproben extrahiert und anschließend mit dem TruSight Tumor 170-Assay bewertet und auf dem NextSeq 500-System sequenziert. Alle acht FFPE-Proben hatten eine Übereinstimmung von 100 % mit berichteten Mutationen.

**Tabelle 5: Amplifikations-Calling mit FFPE-Tumorproben**

Probe	Berichtete Amplifikation	Berichtetes Amplifikationsniveau	Erkannte Amplifikation	Erkanntes Amplifikationsniveau
FFPE_Bone	FGF19	1,4	FGF19	2,9
FFPE_Brain2	PDGFRA	2,3	PDGFRA	2,9
FFPE_Breast	RPS6KB1	2,4	RPS6KB1	2,4
FFPE_Colon	BRCA2	2,2	BRCA2	2,0
FFPE_Lung1	PIK3CA	2,4	PIK3CA	2,7
FFPE_Lung2	FGFR1	2,4	FGFR1	2,9
FFPE_Lung3	MYC	2,2	MYC	2,8
FFPE_Lung4	CCNE1	2,1	CCNE1	2,2
FFPE_Lung5	EGFR	2,2	EGFR	4,5
FFPE_Lung6	CCND1	2,3	CCND1	2,9
FFPE_Stomach1	CDK6	2,3	CDK6	1,7
FFPE_Stomach2	MET	1,5	MET	1,4

Die DNA wurde aus den FFPE-Tumorproben extrahiert und anschließend mit dem TruSight Tumor 170-Assay bewertet und auf dem NextSeq 500-System sequenziert. Alle 12 FFPE-Proben hatten eine Variantenübereinstimmung von 100 %.

**Tabelle 6: Calling von Fusionen und Spleißvarianten mit FFPE-Gewebe und Zelllinien**

Probe	DV200	Berichtete Variante	Erkannte Variante
FFPE_Brain Tissue	n. z.	EGFR VIII-Spleißvariante	EGFR VIII-Spleißvariante
FFPE_Breast Tissue	81	RPS6KB1-VMP1-, RPS6KB1-DIAPH3-, CCDC170-ESR1-Fusionen	RPS6KB1-VMP1-, RPS6KB1-DIAPH3-, CCDC170-ESR1-Fusionen
FFPE_Ewing's Tissue	48,9	EWSR1-FLI1-Fusion	EWSR1-FLI1-Fusion
FFPE_Gastric Cell Line	93	MET Exon 14 Skipping-Spleißvariante	MET Exon 14 Skipping-Spleißvariante
FFPE_Lung CellLine	93	CCDC6-RET-Fusion	CCDC6-RET-Fusion
FFPE_Lung Tissue1	73,3	EML4-ALK-Fusion	EML4-ALK-Fusion
FFPE_Lung Tissue2	95	FGFR3-TACC3-Fusionen	FGFR3-TACC3-Fusionen
FFPE_Prostate Cell Line	95,5	ARv7-Spleißvariante	ARv7-Spleißvariante
FFPE_Prostate Tissue	28,7	TMPRSS2-ERG-, TMPRSS2-GNPT-Fusionen	TMPRSS2-ERG-, TMPRSS2-GNPT-Fusionen

Die RNA wurde aus den FFPE-Tumorproben extrahiert und anschließend mit dem TruSight Tumor 170-Assay bewertet und auf dem NextSeq 500-System sequenziert. Alle neun FFPE-Proben hatten eine Variantenübereinstimmung von 100 %. Der DV200-Wert wird zur Bewertung der Qualität der RNA verwendet, die für das Vorbereiten der Sequenzierungsbibliotheken verwendet wird, und entspricht dem Prozentsatz von RNA-Fragmenten > 200 Nukleotide.

## Zuverlässiges Calling von Amplifikationen, Fusionen und Spleißvarianten aus FFPE-Proben

TruSight Tumor 170 vereint die Empfindlichkeit der Illumina-Sequenzierungssysteme mit neuen Software-Plattformen, wodurch das gleichzeitige Calling von Amplifikationen, Fusionen und Spleißvarianten ermöglicht wird. Die TruSight Tumor 170-App umfasst neue Algorithmen für das Varianten-Calling, die genaue Calls für Spleißvarianten, Fusionen und Genamplifikationen aus rohen Sequenzierungsdaten in Proben mit unterschiedlicher Qualität erzeugen (Tabelle 5 und Tabelle 6).

## Zusammenfassung

TruSight Tumor 170 bietet eine integrierte Workflow-Lösung zur Erkennung der häufigsten somatischen Varianten in soliden Tumoren. DNA- und RNA-Bibliotheken werden gleichzeitig vorbereitet, sequenziert und analysiert, um eine effiziente Auswertung zahlreicher Typen von somatischen Varianten zu ermöglichen. Das Panel wurde anhand evidenzbasierter Richtlinien und mit Input von wichtigen Meinungsführern sowie marktnaher pharmazeutischer Forschung entwickelt und bietet Laboren eine umfassende Sicht auf krebsrelevante Gene und genaue Analysen seltener Varianten aus FFPE-DNA und RNA. Durch die Auswertung von 170 Genen und verschiedener Variantentypen in einem einzelnen Assay bietet TruSight Tumor 170 eine umfassende genetische Untersuchung von Tumorproben in einer optimierten Lösung.

## Weitere Informationen

Weitere Informationen zu TruSight Tumor 170 finden Sie unter [www.illumina.com/TruSightTumor170](http://www.illumina.com/TruSightTumor170)

## Quellen

1. American Cancer Society. [www.cancer.org](http://www.cancer.org). Aufgerufen am 17. Oktober 2017.
2. O'Leary NA, Wright MW, Brister JR, et al. (2016) [Reference sequence \(RefSeq\) database at NCBI: current status, taxonomic expansion, and functional annotation](#). *Nucleic Acids Res.* 44(D1):D733-45.
3. National Comprehensive Cancer Network. [www.nccn.org](http://www.nccn.org). Aufgerufen am 17. Oktober 2017.
4. European Society for Medical Oncology. [www.esmo.org](http://www.esmo.org). Aufgerufen am 17. Oktober 2017.

## Bestellinformationen

Bibliotheksvorbereitungs-Kits	Anz. Proben	Katalog-Nr.
TruSight Tumor 170 Kit	24	OP-101-1004
TruSight Tumor 170 Kit mit PierianDx	24	20032628
TruSight Tumor 170 Kit mit NextSeq v2.5-Reagenzien	24	20028821
TruSight Tumor 170 Kit mit NextSeq v2.5-Reagenzien und PierianDx	24	20032629

**Illumina, Inc.** • Tel. USA (gebührenfrei) 1.800.809.4566 • Tel. außerhalb Nordamerikas +1.858.202.4566 • [techsupport@illumina.com](mailto:techsupport@illumina.com) • [www.illumina.com](http://www.illumina.com)

© 2019 Illumina, Inc. Alle Rechte vorbehalten. Alle Marken sind Eigentum von Illumina, Inc. bzw. der jeweiligen Eigentümer. Weitere Informationen zu Marken finden Sie unter [www.illumina.com/company/legal.html](http://www.illumina.com/company/legal.html). Pub.-Nr. 1170-2016-017-E-DEUQB5414

