

Molekularpathologie

HANDLE Classic NGS Panel



Nachweis von Genfusionen und Mutationen bei NSCLC, Kolonkarzinom und GIST

Neue Target-Regionen im AmoyDx® HANDLE Classic NGS Panel

Das bisher 32 Gene umfassende HANDLE Classic NGS Panel unserer Partnerfirma AmoyDx® wurde um Target-Regionen in weiteren vier Genen für den Nachweis von SNVs und InDels ergänzt:

- *FGFR4*: Exon 3, 6, 9, 12, 13, 15, 16
- *HRAS*: Exon 2 - 4
- *KEAP1*: Exon 2 - 6
- *STK11*: Exon 1 - 9

Zusätzlich wurde mit dem Update ein Markerset von 29 Mononukleotid-Markern zur Detektion der Mikrosatelliteninstabilität (MSI) in das HANDLE Classic NGS Panel integriert. Die Auswertung der MSI-Marker erfolgt automatisch in der ANDAS-Analysesoftware wobei die Patientenproben als „MSI“ (Microsatellite Instable) oder „MSS“ (Microsatellite Stable) klassifiziert werden.

Das Panel umfasst weiterhin therapierelevante Biomarker für aktuelle oder in der Entwicklung befindliche zielgerichtete Therapien für solide Tumoren, wie z. B. *NTRK1/2/3* oder *NRG-1* Fusionen. Das Kit wurde auf dem ESMO Meeting 2019 als Me-

thode für den *NTRK*-Fusionsnachweis empfohlen (Marchiò *et al.* 2019).

Die Herstellung der NGS-Library basiert auf dem HANDLE-Verfahren (Halo-shape ANnealing and Defer-Ligation Enrichment). Dieses schnelle Protokoll besteht aus lediglich sechs Schritten und kann an nur einem Arbeitstag abgearbeitet werden. Alle Reaktionen finden in nur einem Tube pro Patienten-Probe statt. Als Ausgangsmaterial für den Fusionsnachweis wird RNA, für den Mutationsnachweis genomische DNA aus FFPE-Gewebe verwendet. Wird kein Fusionsnachweis benötigt, so kann nur mit DNA gearbeitet werden, der für den Fusionsnachweis erforderliche vorgeschaltete cDNA-Synthese-Schritt entfällt dann.

Die Analyse der mit dem HANDLE Classic NGS Panel generierten Daten erfolgt mit dem AmoyDx® NGS Data Analysis System (ANDAS), bestehend aus einer Workstation mit vorinstallierter Analysesoftware. Die Auswertung der Sequenzdaten erfolgt damit lokal und in wenigen Schritten.

Vorteile des AmoyDx® HANDLE Classic NGS Panels

- ▶ Library Preparation in nur einem Arbeitstag!
- ▶ Geringer Arbeitsaufwand durch Library Preparation in nur 6 Schritten!
- ▶ Nur eine PCR-Aufreinigung am Ende der Library Preparation nötig!
- ▶ Verwendung von UID- (unique identifier) Sequenzen zur effizienten Identifizierung von PCR-Fehlern während der Datenanalyse.
- ▶ Analyse auf der ANDAS Workstation als unabhängiges lokales stand-alone System für hohe Datensicherheit!
- ▶ Für viele gängige Illumina-Sequenzierplattformen geeignet!

Spezifikationen des AmoyDx® HANDLE Classic NGS Panels

Anzahl erfasster Gene	36 Gene + 29 MSI Marker
Genomische Abdeckung	ca. 30 kb
Probenmaterial	DNA und RNA aus FFPE Gewebe
Geeignete Sequenzier-Plattform	Illumina MiniSeq®, MiSeq®, NextSeq® Serie
Benötigte DNA Menge / RNA Menge	50 – 100 ng DNA / 30 – 400 ng RNA
Erfasste Varianten	SNVs, InDels, Fusions, CNAs; MSI
Anzahl der PCR Pools pro Probe	1
Amplicon-Größe	80 – 200 bp
Sensitivität	2 % für Hotspot-Mutationen
Output pro Probe	0,6 Gb
Arbeitstage für die Library-Herstellung	1
Technologie	HANDLE-Verfahren
Daten-Analyse	Lokale Workstation mit AmoyDx® Analysesoftware (ANDAS)

MiniSeq®, MiSeq®, NextSeq® sind eingetragene Markennamen der Firma Illumina, Inc., 92122, San Diego, US

Produktinformation

Library Preparation Kit

Bezeichnung	CE/IVD	Format	Menge	Bestell-Nr.
AmoyDx® HANDLE Classic NGS Panel Nachweis von Fusionen und Mutationen in 36 therapierelevanten Genen an humaner RNA und genomischer DNA aus FFPE Gewebe	-	Bulk	1 Kit (24 Tests)	ADX-HCNP01-R

Literatur

Marchiò C *et al.* ESMO recommendations on the standard methods to detect *NTRK* fusions in daily practice and clinical research.

Ann Oncol 30:1417-1427, 2019

Molekularpathologie

HANDLE Classic NGS Panel



► Gene und Target-Regionen im AmoyDx® HANDLE Classic NGS Panel

Gen	Transkript	Variante	Erfasste Exons
AKT1	NM_001014431.1	SNV, InDel	Exon 3,4
ALK	NM_004304.4	Fusion, SNV, InDel	Exon 19-25
BRAF	NM_004333.4	SNV, InDel	Exon 11,12,15,18
CTNNB1	NM_001904.3	SNV, InDel	Exon 3
DDR2	NM_006182.2	SNV, InDel	Exon 5,8,13-18
EGFR	NM_005228.3	SNV, InDel	Exon 3,7,12,14,18-22
ERBB2	NM_004448.3	SNV, InDel, CNA	Exon 3,8,9,11,16-21,23,25,27
FGFR1	NM_001174067.1	Fusion, SNV, InDel	Exon 2,7,9,13
FGFR2	NM_000141.4	Fusion, SNV, InDel	Exon 12,17
FGFR3	NM_000142.4	Fusion, SNV, InDel	Exon 9,13,14,17,18
FGFR4	NM_213647.2	SNV, InDel	Exon 3,6,9,12,13,15,16
HRAS	NM_001130442.1	SNV, InDel	Exon 2-4
IDH1	NM_005896.3	SNV, InDel	Exon 4
IDH2	NM_002168.3	SNV, InDel	Exon 4
KEAP1	NM_203500.1	SNV, InDel	Exon 2-6
KIT	NM_000222.2	SNV, InDel	Exon 9,11,13,14,17,18
KRAS	NM_033360.3	SNV, InDel	Exon 2,3,4
MAP2K1	NM_002755.3	SNV, InDel	Exon 2,3,6
MET	NM_000245.4	Exon14 Skipping, CNA	Exon 14
MSH6	NM_000179.2	SNV, InDel	Exon 5
NRAS	NM_002524.4	SNV, InDel	Exon 2,3,4
NRG1	NM_013956	Fusion	Exon 2,3,4,6
NTRK1	NM_002529.3	Fusion	Exon 9-14,16
NTRK2	NM_006180.4	Fusion	Exon 12,13,15,16,17
NTRK3	NM_001012338.2	Fusion	Exon 11-16
PDGFRA	NM_006206.4	SNV, InDel	Exon 12,15,18
PIK3CA	NM_006218.2	SNV, InDel	Exon 2,5,6,8,10,11,14,21
POLE	NM_006231.3	SNV, InDel	Exon 8
PTEN	NM_000314.4	SNV, InDel	Whole CDS
RB1	NM_000321.2	SNV, InDel	Exon 5,10,11,15-20,24
RET	NM_020975.4	Fusion, SNV, InDel	Exon 8,10,11,12,16
RICTOR	NM_152756.4	CNA	-
ROS1	NM_002944.2	Fusion, SNV, InDel	Exon 32,34,35,36,38,40,41
SMAD4	NM_005359.5	SNV, InDel	Whole CDS
STK11	NM_000455.4	SNV, InDel	Exon 1-9
TP53	NM_000546.5	SNV, InDel	Exon 2,4,5-11
MSI			29 Mononukleotid-Marker



► Workflow des HANDLE Classic NGS Panels: 6 Schritte - 6 Stunden - 1 Tube

1	Reverse Transkription	Proben RNA, Puffer, RT-Enzym für cDNA-Synthese	40 min
2	Hybridisierung	Zugabe von genomischer DNA, Puffer, CP-Probes für die Hybridisierung	125 min
3	Extension/Ligation	Zugabe des CP-Extension-Ligation Master Mix; Erzeugung von zirkulären Produkten	10 min
4	Exonuklease-Verdau	Zugabe von CP-Exonuklease A und B zur Entfernung nicht-zirkulärer DNA	40 min
5	PCR-Amplifikation	Zugabe von CP-PCR Master Mix, H ₂ O, CP-S5 und CP-N7 Primer zur Library-Amplifikation	40 min
6	Aufreinigung	Aufreinigung über „Magnetic Beads“	40 min



Gesamt: ca. 6 h

QC & Sequenzierung