

Gezielter Forschungsworkflow für die Onkologie mit Pillar Biosciences und Illumina

Schnelle, genaue Ergebnisse mit
oncoReveal®-Panels auf der MiSeq™
i100 Series sowie der Analyse und
Befunderstellung mit DRAGEN™ Amplicon
und Illumina Connected Insights



Genaue Varianten-Calling-
Analyse von Proben für die
onkologische Forschung in
nur 24 Stunden



Nachweis von
Veränderungen mit
Variantenallelfrequenzen
unter 5 %



Optimierte, konsistente
Bioinformatik und
Befunderstellung im
gesamten Portfolio von
Illumina für die onkologische
Forschung

Überblick

NGS (Next-Generation Sequencing, Sequenzierung der nächsten Generation) ermöglicht in der onkologischen Forschung tätigen Laboren die Anreicherung von Reads in Regionen von Interesse zum Nachweis von mit niedrigen Variantenallelfrequenzen (VAF) auftretenden Mutationen. Dank gezielter NGS-Panels können Labore die Analyse zudem auf genetische Varianten konzentrieren, deren Auftreten in Anbetracht der Herkunft der Tumorprobe am wahrscheinlichsten ist, was die Effizienz und den Durchsatz verbessert.

oncoReveal-Panels von Pillar Biosciences

Die oncoReveal-Panels von Pillar Biosciences wurden im Hinblick auf bekannte Krebsgene entwickelt und eignen sich für unterschiedliche Probenotypen, darunter DNA aus Gewebe, Blut oder formalinfixiertem, in Paraffin eingebettetem Gewebe (FFPE-Gewebe) sowie RNA aus normalem Gewebe und FFPE-Gewebe. Bei diesen Panels kommt die proprietäre sogenannte **SLIMamp®-Technologie (Semel-Loop Inhibition-Mediated Amplification)** zum Einsatz, die die gezielte, amplikonbasierte Bibliotheksvorbereitung in einem einzelnen Röhrchen mit hoher Sensitivität und kurzer Durchlaufzeit ermöglicht.

MiSeq i100 Series

Mit der MiSeq i100 Series ermöglicht Illumina die einfache, genaue und schnelle Sequenzierung auf einem Tischgerät. Bahnbrechende Fortschritte bei Systemdesign, XLEAP-SBS™-Chemie und integrierter Datenanalyse sorgen für eine verbesserte Bedienung, hohe Datengenauigkeit und außergewöhnliche Geschwindigkeit.

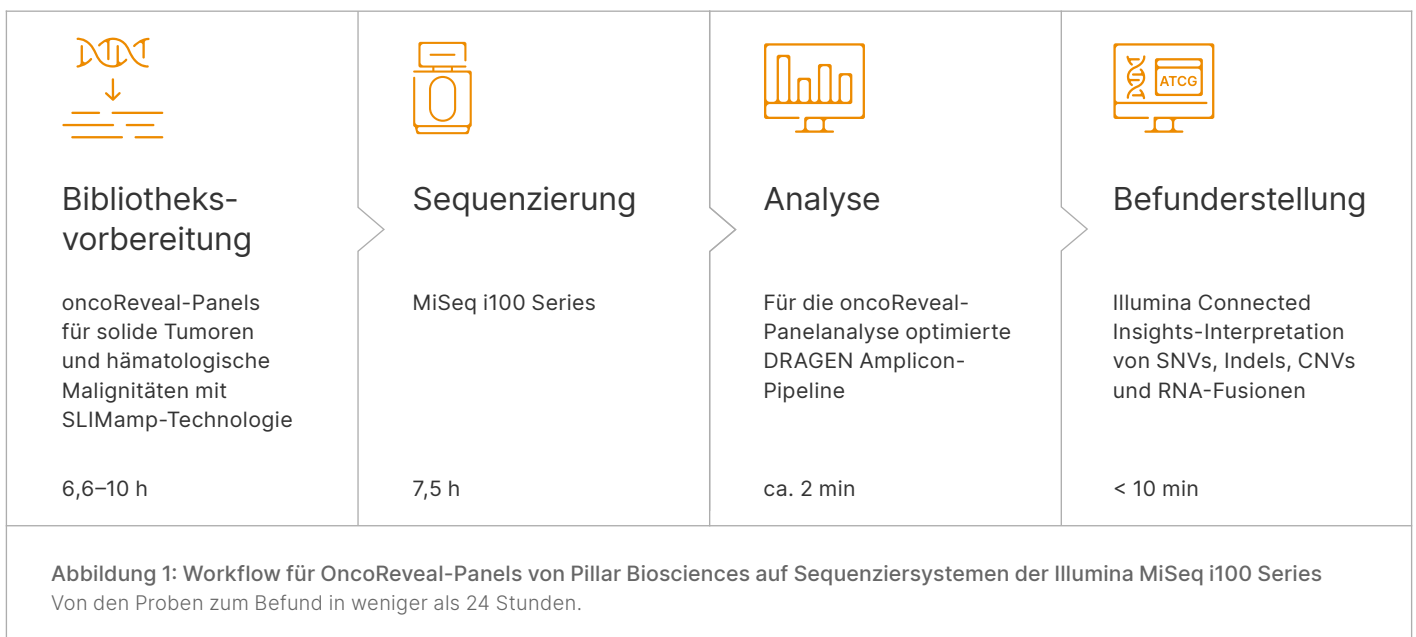
Die MiSeq i100 Series liefert im Rahmen einer NGS-Komplettlösung innerhalb eines Tages Ergebnisse für die gezielte onkologische Forschung (**Abbildung 1**).

DRAGEN Amplicon-Pipeline

Die DRAGEN Amplicon-Software ermöglicht die Hochperformance-Analyse von Amplikonsequenzierungsdaten aus DNA- und RNA-Proben. Die Software lässt sich flexibel und sicher über BaseSpace™ Sequence Hub, einen lokalen DRAGEN-Server oder auf dem Gerät bereitstellen. Die Sekundäranalyse von Sequenzen für oncoReveal-Panels ist in DRAGEN Amplicon integriert. Labore erhalten so problemlos Ergebnisse mit konsistenter Bioinformatik für das gesamte Onkologieportfolio von Illumina.

Illumina Connected Insights

Bei Illumina Connected Insights handelt es sich um eine Cloudplattform zur Rationalisierung von Tertiäranalyse und Berichterstattung bei Anwendungen in der onkologischen Forschung. Illumina Connected Insights eignet sich für die Interpretation von Einzelnukleotidvarianten (SNV, Single Nucleotide Variant), Insertionen und Deletionen (Indels), Kopienzahlvarianten (CNV, Copy Number Variant), RNA-Fusionen und Biomarkern. Die anpassbaren Befunde lassen sich in mehreren Sprachen erstellen. Illumina Connected Insights lässt sich nahtlos in DRAGEN Amplicon-Pipelines integrieren und kann VCF-Dateien, Qualitätssicherungsmetriken (QC, Quality Control) und Metadaten verarbeiten.



Mit Verbesserungen wie der Qualitätsbewertung für Fusionen und der Integration externer Datenbanken eignet sich Illumina Connected Insights für skalierbare Genomanalyse-Workflows bei zahlreichen Anwendungen.

Integrierter Workflow für oncoReveal-Panels

Durch die Kombination aus oncoReveal-Panels von Pillar Biosciences, der MiSeq i100 Series von Illumina, der DRAGEN Amplicon-Sekundäranalyse und Illumina Connected Insights steht Anwendern ein vollständig integrierter Workflow zur Verfügung, der innerhalb von nur 24 Stunden hochgradig präzise Ergebnisse liefert ([Abbildung 1](#)). Dank des integrierten Workflows behalten Anwender die Kontrolle über Proben und profitieren zugleich von einem zuverlässigen Variantennachweis bei geringer VAF, ohne dass UMIs (Unique Molecular Identifiers, eindeutige molekulare Identifikatoren) erforderlich sind. Dies gilt selbst bei der Arbeit mit geringen DNA-Zugabemengen oder suboptimaler Probenqualität ([Tabelle 1](#)). Im vorliegenden Anwendungshinweis wird die Performance der oncoReveal-Panels von Pillar Biosciences bei Sequenzierung auf einem System der MiSeq i100 Series und der Analyse mit der DRAGEN Amplicon-Pipeline für die Sekundäranalyse mit Illumina Connected Insights zur Befunderstellung gezeigt.

Methoden

Proben

Pillar oncoReveal-Panels sind für eine Vielzahl von Anwendungen und Probentypen geeignet. Für diese Analyse wurden Humanforschungsproben und im Handel erhältliche sowie intern für Forschungszwecke erstellte Proben verwendet, die klinisch relevanten Onkologiezielen entsprechen. Bei diesen Zielen handelte es sich um SNVs, Indels, repräsentative RNA-Fusionen, CNV-Ereignisse und *FLT3*-ITDs. Insgesamt wurden 28 Proben verwendet, um die Performance der sechs Pillar oncoReveal-Panels zu evaluieren. In [Tabelle 2](#) werden die für die einzelnen getesteten Panels verwendeten Proben aufgeführt.

Bibliotheksvorbereitung

Bibliotheken wurden für die oncoReveal-Panels von Pillar Biosciences gemäß den Anweisungen des Herstellers vorbereitet, wobei für alle Assays eine Zugabemenge von 20 ng verwendet wurde. Für RNA-Workflows wurde cDNA generiert.

Tabelle 1: Mit der DRAGEN Amplicon-Pipeline kompatible oncoReveal-Panels von Pillar Biosciences

Panel	Katalog-Nr.	Probentyp	Anzahl der Gene/ Amplikons	Variantentypen	Empfohlene Paired- End-Reads je Probe
oncoReveal Multi-Cancer with CNV & RNA Fusion Panel	HNA-HS-1001-48	DNA aus Gewebe-, Blut- oder FFPE-Proben	60/341	SNVs, kleine und mittlere Indels, CNVs	2 Mio.
oncoReveal Multi-Cancer RNA Fusion v2 Panel	HRA-HS-1002-24	RNA aus FFPE oder Gewebe	18 Gene und > 80 Fusionspartner, <i>MET</i> Exon 14 Skipping	RNA-Fusionstranskripte (einschließlich <i>MET</i> Exon 14 Skipping)	2 Mio.
oncoReveal Solid Tumor v2 Panel	HDA-CH-3003-24	DNA aus Gewebe-, Blut- oder FFPE-Proben	48/246	SNVs, kleine und mittlere Indels	2 Mio.
oncoReveal BRCA1 & BRCA2 + CNV Panel	HDA-BR-1003-24	DNA aus Gewebe-, Blut- oder FFPE-Proben	2/283	CNVs, SNVs, kleine und mittlere Indels auf Ebene des Exons	2 Mio.
oncoReveal Myeloid Panel	HDA-MY-1001-24	DNA aus Vollblut oder PBMCs	58/766	SNVs, Indels, ITDs	4 Mio.
oncoReveal Essential MPN Panel	HDA-MY-1002-48	DNA aus Vollblut oder PBMCs	3/7	SNVs, kleine und mittlere Indels	30.000

CNV: Copy Number Variant, Kopienzahlvariante; Indel: Insertion-Deletion; ITD: Internal Tandem Duplication, interne Tandemduplikation; PBMC: Peripheral Blood Mononuclear Cells, periphere mononukleäre Blutzellen; SNV: Single Nucleotide Variant, Einzelnukleotidvariante.

Tabelle 2: Zur Evaluierung der Performance von DRAGEN Amplicon mit Pillar oncoReveal-Panels verwendete Proben

Getestetes Panel	Verwendete Proben
oncoReveal Multi-Cancer with CNV & RNA Fusion Panel	<ul style="list-style-type: none"> • ODC4 (Oncology DNA Control 4), von Illumina zu Forschungszwecken erstellte gDNA-Referenzprobe¹ • Zwei Zelllinienproben mit CNVs: HCC-1954 (Brust), NCI-H716 (Dickdarm) • Eine FFPE-Lungenkarzinomprobe mit bekannter <i>FGFR3</i>-Amplifikation
oncoReveal Multi-Cancer RNA Fusion v2 Panel	<ul style="list-style-type: none"> • Horizon HD784-Referenzprobe • Drei FFPE-Normalproben aus normalem Lungen-, Leber- und Pankreasgewebe
oncoReveal Solid Tumor v2 Panel	<ul style="list-style-type: none"> • Mimix OncoSpan, gDNA Reference Standard (Horizon Discovery, Katalog-Nr. HD827) • ODC4 (Oncology DNA Control 4), von Illumina zu Forschungszwecken erstellte gDNA-Referenzprobe¹ • Eine FFPE-Probe aus Dickdarmkarzinomgewebe • Eine FFPE-Normalprobe aus Lebergewebe
oncoReveal BRCA1 & BRCA2 + CNV Panel	<ul style="list-style-type: none"> • ODC4 (Oncology DNA Control 4), von Illumina zu Forschungszwecken erstellte gDNA-Referenzprobe¹ • Zwei FFPE-Proben aus Ovarialkarzinomgewebe • Eine Normalprobe, NA12878 (HG001)
oncoReveal Myeloid Panel	<ul style="list-style-type: none"> • Horizon, HD829 Myeloid gDNA Reference Standard-Probe² • Seraseq Myeloid Mutation DNA Mix (SeraCare, Katalog-Nr. 0710-0408) • Zelllinien MV-4-11 (CRL-9591), MOLM-13 und PL-21 • FFPE-Probe mit <i>FLT3</i>-ITD-Nachweis durch PINDEL • gDNA aus zwei Buffy-Coat-Proben von gesunden Spendern
oncoReveal Essential MPN Panel	<ul style="list-style-type: none"> • Seraseq Myeloid Mutation DNA Mix (SeraCare, 0710-0408) • Myeloid gDNA Reference Standard (Horizon Discovery, Katalog-Nr. HD829) • Eine FFPE-Probe aus Pankreasgewebe • gDNA aus zwei Buffy-Coat-Proben von gesunden Spendern

Anschließend wurde für alle Workflows eine genspezifische PCR-(GS-PCR)-Amplifikationsreaktion mit 18–26 Zyklen durchgeführt, wie für die einzelnen Panels angegeben. Im Anschluss an die GS-PCR wurden die Primer mit Exonuklease und einem anschließenden Bead-basierten Reinigungsschritt verarbeitet. Abschließend wurden Bibliotheken mit 5–6 Zyklen PCR-Amplifikation indiziert, gefolgt von Bead-basierter Reinigung, Quantifizierung sowie Normalisierung vor dem Pooling zur Sequenzierung.

Die DRAGEN Amplicon-Pipeline enthält auch eine Metrik für das 3'/5'-Imbalance-Verhältnis für RNA-Assays. Das 3'/5'-Imbalance-Verhältnis dient dem Nachweis von Fusionsonkogenen, insbesondere solchen mit Treibergenen wie *ALK* und *ROS1*. Durch die Auswertung der relativen Expressionsniveaus an den 3'- und 5'-Enden der Transkripte kann diese Metrik die Bestimmung von Imbalancen verbessern, die auf Fusionsereignisse hindeuten.

Sequenzierung

Bibliotheken wurden mit einem System der MiSeq i100 Series mit Paired-End-Reads (150 bp) sequenziert.

Sekundäranalyse

Das Calling der Genotypen für die einzelnen getesteten oncoReveal-Panels erfolgte mit der DRAGEN Amplicon v4.4.6-Sekundäranalyse, was den Nachweis von SNVs und kleinen bis mittleren Indels mit einer VAF unter 5 % ermöglichte. Neben SNVs und Indels wurde die Pipeline auch zum Nachweis von CNVs, ITDs wie *FLT3*-ITD sowie von RNA-Fusionen und Spleißvariantenereignissen verwendet.

Normalpanel

Für die gezielte Analyse von CNVs ist ein Normalpanel (PON, Panel of Normals) zur Tiefennormalisierung erforderlich. Für jedes im Rahmen dieser Studie bewertete oncoReveal-Panel wurde ein PON mit 18–25 Proben erstellt. Diese Normalproben wurden mit demselben Bibliotheksvorbereitungs- und Sequenzierungsworkflow vorbereitet und sequenziert wie die Fallproben. Dies ermöglichte dem Algorithmus, nicht probenspezifische Abweichungen auf Systemebene herauszurechnen. DRAGEN enthält ein Standard-CNV-Paket mit einem ergänzenden PON, das von der DRAGEN Amplicon-Pipeline für jedes Panel verwendet wird, das die CNV-Erkennung unterstützt.

Für optimale Leistung wird jedoch empfohlen, dass Anwender ein eigenes PON mit ca. 20 Normalproben erstellen, mit dem ein Baseline-Niveau für das genaue CNV-Calling festgelegt wird.

Tertiäranalyse und Befundstellung

Connected Insights wandelt im Rahmen der Tertiäranalyse verarbeitete Sequenzierungsdaten in Forschungsdaten für Befunde um. Die Varianten-Calls aus der DRAGEN Amplicon-Pipeline werden verarbeitet und die Varianten anhand fortschrittlicher Algorithmen annotiert, klassifiziert und priorisiert. Connected Insights ermöglicht anhand von mehreren redaktionell betreuten Datenbanken, Literaturquellen und klinischen Leitlinien evidenzbasierte Interpretationen. Im Rahmen der vorliegenden Studie wurden mit Connected Insights die Pathogenität, praktische Implikationen und Biomarker-Assoziationen zur Erstellung onkologischer Befunde überprüft.

Ergebnisse

oncoReveal Multi-Cancer with CNV & RNA Fusion Panel

Beim oncoReveal Multi-Cancer with CNV & RNA Fusion Panel handelt es sich um ein DNA-RNA-Kombipanel zur Untersuchung relevanter Gene bei unterschiedlichen Arten solider maligner Tumoren. Der Assay vereint das DNA-basierte oncoReveal Multi-Cancer v4 with CNV Panel mit dem oncoReveal Multi-Cancer RNA Fusion v2 Panel, wodurch eine kombinierte Sequenzierung möglich wird. Das oncoReveal Multi-Cancer v4 with CNV Panel und das oncoReveal Multi-Cancer RNA Fusion v2 Panel wurden als Komponenten dieses Kombipanels evaluiert.

oncoReveal Multi-Cancer v4 with CNV Panel

Das oncoReveal Multi-Cancer v4 with CNV Panel wurde anhand einer intern zu Forschungszwecken erstellten Probe mit einer mittleren Target-Coverage von über 4.000-fach evaluiert. Alle 48 überlappenden SNV- und Indel-Varianten (mit gemessener VAF zwischen 8 und 43 %) wurden mit der DRAGEN Amplicon-Pipeline nachgewiesen ([Abbildung 2](#)). Anhand einer FFPE-Normalprobe wurde eine Genombasenspezifität von > 99,9 % ermittelt. Der CNV-Nachweis, einschließlich *ERBB2*-, *FGFR2*- und *FGFR3*-Amplifikationen ([Tabelle 3](#)) wurde anhand von FFPE- und Zelllinienproben validiert. In zwei zusätzlichen FFPE-Normalproben gab es keine falsch positiven Ergebnisse.

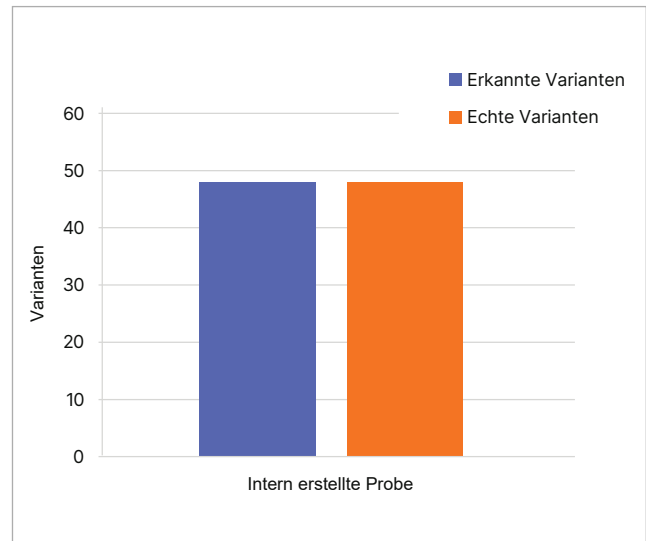


Abbildung 2: Varianten-Calling-Performance mit der DRAGEN Amplicon-Pipeline für die Analyse mit dem oncoReveal Multi-Cancer v4 with CNV Panel

Alle in einer intern zu Forschungszwecken erstellten Probe erwarteten 48 Varianten wurden mit dem oncoReveal Multi-Cancer with CNV & RNA Fusion Panel und der DRAGEN Amplicon-Pipeline nachgewiesen.

Tabelle 3: Zur Evaluierung des oncoReveal Multi-Cancer v4 with CNV Panel verwendete Genamplifikationen

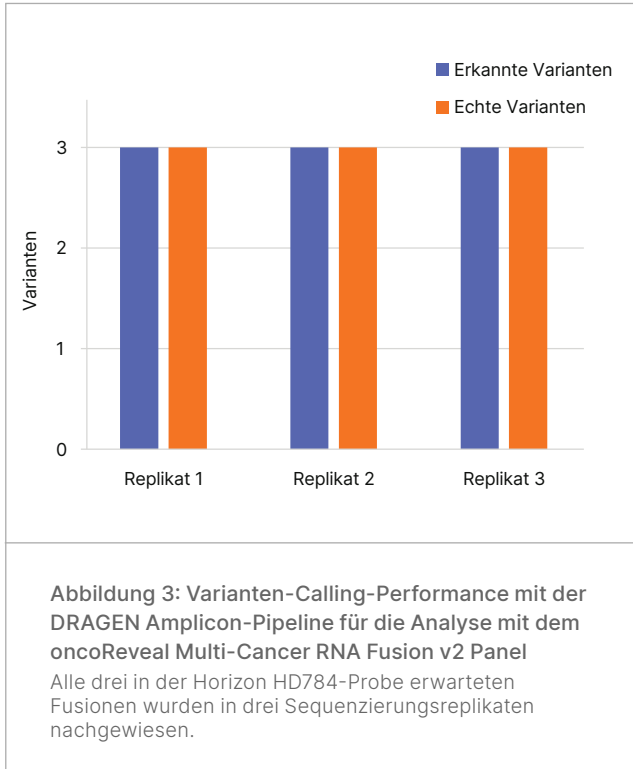
Gen	Variante- typ	Probentyp	Nach- gewiesen?
<i>ERBB2</i>	Amplifikation	HCC1954-Zelllinie	Ja, PASS in CNV VCF
<i>FGFR2</i>	Amplifikation	NCI-H716-Zelllinie	Ja, PASS in CNV VCF
<i>FGFR3</i>	Amplifikation	FFPE	Ja, PASS in CNV VCF

oncoReveal Multi-Cancer RNA Fusion v2 Panel

Das oncoReveal Multi-Cancer RNA Fusion v2 Panel dient der Untersuchung von 18 Treibergenen und 83 Fusionspartnern mit Relevanz für zahlreiche Arten solider Tumoren anhand von aus FFPE-Proben isolierter RNA.

Das oncoReveal Multi-Cancer RNA Fusion v2 Panel wurde mit drei FFPE-Normalproben (hinsichtlich Spezifität) und drei Sequenzierungsreplikaten der Horizon HD784-Referenzprobe evaluiert, die drei bekannte Fusionen (hinsichtlich Sensitivität) enthält. Die Gesamtzahl der Reads nach Filterung lag bei > 900.000.

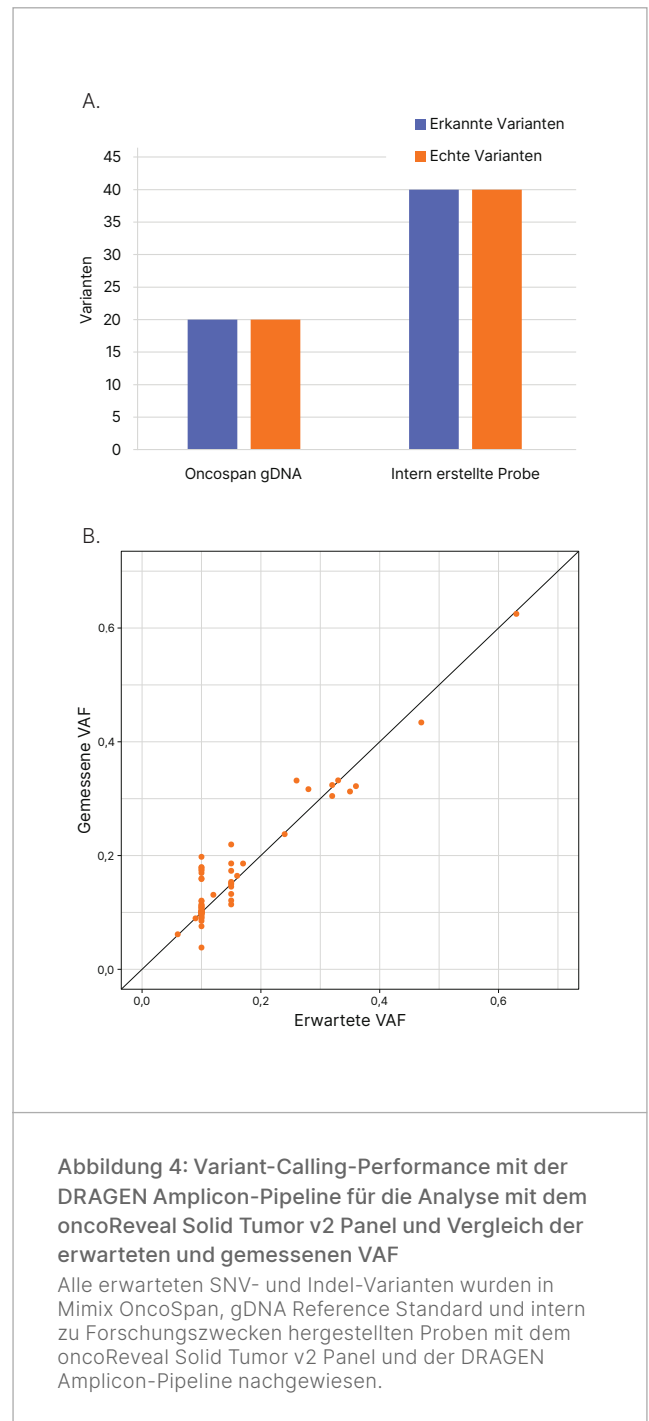
Alle drei erwarteten Fusionen wurden in der Horizon HD784-Probe bei allen drei Sequenzierungsreplikaten nachgewiesen (Abbildung 3). In den drei FFPE-Normalproben gab es keine falsch positiven Ergebnisse.



oncoReveal Solid Tumor v2 Panel

Beim oncoReveal Solid Tumor v2 Panel handelt es sich um einen 48-Gen-Assay zum Test auf wichtige DNA-Mutationen bei soliden Tumoren, darunter nicht kleinzellige Lungenkarzinome, kolorektale Karzinome, Melanome, Endometriumkarzinome, Pankreaskarzinome, gastrointestinale Stroma-, Blasen- und Schilddrüsentumoren sowie Gliome. Zusätzlich enthält das Panel Gene wie *POLD1* und *POLE*, die potenziell bedeutsam für die Immunonkologie sind.

Das oncoReveal Solid Tumor v2 Panel wurde mit dem Mimix OncoSpan gDNA Reference Standard und intern zu Forschungszwecken erstellten Proben mit einer mittleren Target-Coverage von 7.000-fach bewertet. Alle abgedeckten SNV- und Indel-Varianten wurden mit der DRAGEN Amplicon-Pipeline erfolgreich nachgewiesen (Abbildung 4). Konkret wurden 40 Varianten in der intern zu Forschungszwecken erstellten Probe und 20 im Mimix OncoSpan gDNA Reference Standard nachgewiesen. Zusätzlich wurden zwei FFPE-Proben untersucht: eine Normalprobe und eine Probe mit einer bekannten *KRAS*-Variante. Die *KRAS*-Variante wurde bei einer VAF von 30 % nachgewiesen. Bei der Normalprobe gab es keine falsch positiven Ergebnisse.



oncoReveal BRCA1 & BRCA2 + CNV Panel

Beim oncoReveal BRCA1 & BRCA2 + CNV Panel handelt es sich um ein gezieltes Panel zur Untersuchung von CNVs auf Exonebene, SNVs sowie kleinen und mittleren Indels in *BRCA1* und *BRCA2*.

Das oncoReveal BRCA1 & BRCA2 + CNV Panel wurde anhand einer intern zu Forschungszwecken erstellten Kontrollprobe (mit sechs erwarteten kleinen Varianten) und einer FFPE-Probe (mit einer bekannten *BRCA1*-Variante) evaluiert, wobei eine mittlere Target-Coverage von über 5.000-fach erreicht wurde. Alle sechs abgedeckten SNV- und Indel-Varianten wurden mit der DRAGEN Amplicon-Pipeline nachgewiesen (Abbildung 5, Tabelle 4).

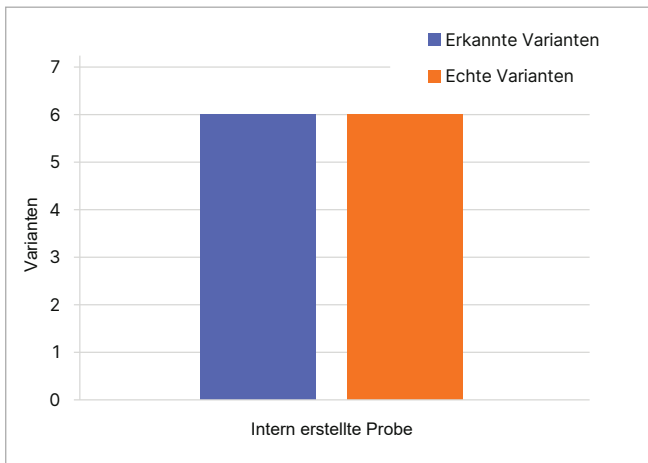


Abbildung 5: Varianten-Calling-Performance mit der DRAGEN Amplicon-Pipeline für die Analyse mit dem oncoReveal BRCA1 & BRCA2 + CNV Panel

Sechs erwartete SNVs und Indels wurden in intern zu Forschungszwecken erstellten Kontroll- und FFPE-Proben mit dem oncoReveal BRCA1 & BRCA2 + CNV Panel und der DRAGEN Amplicon-Pipeline nachgewiesen. Nachgewiesene Varianten und die VAF sind [Tabelle 4](#) zu entnehmen.

Eine bekannte *BRCA1*-Deletion (*BRCA1*. c.3008_3009del mit einer VAF von 0,48) wurde ebenfalls nachgewiesen. Es wurde eine Spezifität der Genomposition von > 99,9 % ermittelt. In der FFPE-Probe wurde bei einem niedrigeren CNV-Schwellenwert in *BRCA1* eine CNV mit einer Deletion der Exons 7–9 nachgewiesen. Wird dieser Schwellenwert erhöht, steigt die Anzahl falsch positiver Ergebnisse in der FFPE-Normalprobe.

oncoReveal Myeloid Panel

Das oncoReveal Myeloid Panel dient der Untersuchung von 58 Genen, die in Bezug auf Knochenmarkkrebs relevant sind.

Das oncoReveal Myeloid Panel wurde mit einer Horizon Myeloid HD829 DNA Reference Standard-Probe², einer Sereq Myeloid Mutation DNA Mix-Probe und PBMC-Normalproben (Peripheral Blood Mononuclear Cells, periphere mononukleäre Blutzellen) evaluiert, wobei eine mittlere Target-Coverage von über 5.000-fach erreicht wurde. Alle 20 abgedeckten SNV- und Indel-Varianten mit gemessener VAF zwischen 3 und 69 % wurden in beiden Proben nachgewiesen (Abbildung 6). Mit gesunden PBMC-Proben wurde eine Genombasenspezifität von > 99,99 % ermittelt. Der *FLT3*-ITD-Nachweis wurde anhand von FFPE-Proben, Zelllinien und für Forschungszwecke erstellten Proben validiert. Bei PBMC-Normalproben gab es keine falsch positiven Ergebnisse. In [Tabelle 5](#) werden die bei allen Probenotypen nachgewiesenen *FLT3*-ITD-Varianten aufgeführt, wobei eine Sensitivität von 100 % erreicht wurde. Die Tabelle enthält die spezifische Variantennotation, die Länge in Basenpaaren und die entsprechende Probenquelle.

Tabelle 4: Mit dem oncoReveal BRCA1 & BRCA2 + CNV Panel nachgewiesene Varianten

Gen	HGVS-Nomenklatur	Protein	Gemessene VAF	Mutationstyp
<i>BRCA2</i>	c.1114A>C	p.Asn372His	8 %	SNV
<i>BRCA2</i>	c.7934del	p.Arg2645fs	12 %	Deletion
<i>BRCA2</i>	c.9090dupA	p.T3030fs	22 %	Insertion
<i>BRCA1</i>	c.3203dup	p.Gln1756fs	2 %	Insertion
<i>BRCA1</i>	c.4327C>T	p.Arg1443Ter	11 %	SNV
<i>BRCA1</i>	c.1961_1962del	p.Lys654fs	22 %	Deletion

HGVS: Human Genome Variation Society

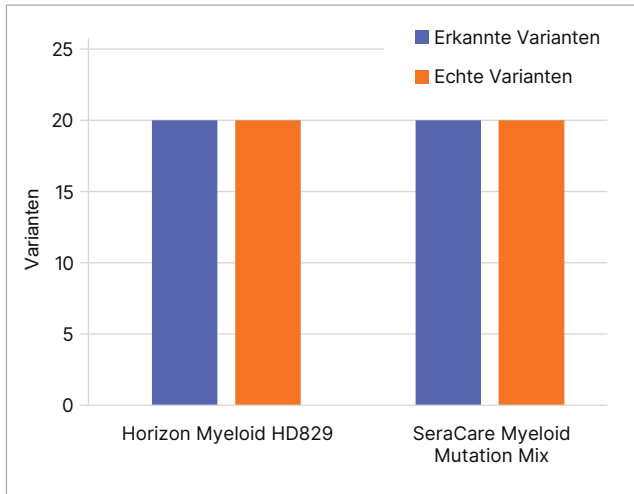


Abbildung 6: Varianten-Calling-Performance mit der DRAGEN Amplicon-Pipeline für die Analyse mit dem oncoReveal Myeloid Panel

Alle 20 abgedeckten SNVs und Indels wurden in Proben aus Horizon Myeloid HD829 DNA Reference Standard und Seraseq Myeloid Mutation DNA Mix mit dem oncoReveal Myeloid Panel und der DRAGEN Amplicon-Pipeline nachgewiesen.

oncoReveal Essential MPN Panel

Das oncoReveal Essential MPN Panel dient der Untersuchung wichtiger Mutationen innerhalb der mit myeloproliferativen Neoplasien (MPN) assoziierten Gene *MPL*, *JAK2* und *CALR*.

Das oncoReveal Essential MPN Panel wurde mit Seraseq Myeloid Mutation DNA Mix und dem Horizon HD829 Myeloid gDNA Reference Standard evaluiert, wobei eine mittlere Target-Coverage von über 2.500-fach erreicht wurde. Alle abgedeckten SNVs und Indels wurden mit DRAGEN Amplicon nachgewiesen (Abbildung 7, Tabelle 6). Bei gesunden PBMC- und FFPE-Normalproben gab es keine falsch positiven Ergebnisse.

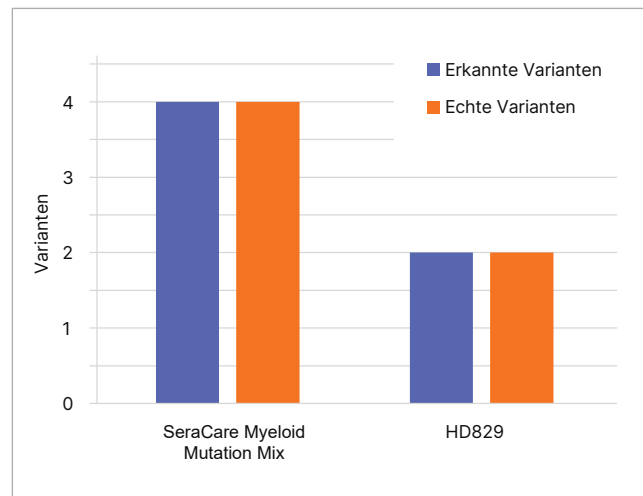


Abbildung 7: Varianten-Calling-Performance mit der DRAGEN Amplicon-Pipeline für die Analyse mit dem oncoReveal Essential MPN Panel

Alle vier abgedeckten SNVs und Indels wurden in Seraseq Myeloid Mutation DNA Mix nachgewiesen und zwei erwartete Varianten wurden in Horizon, HD829 Myeloid gDNA Reference Standard mit der DRAGEN Amplicon-Pipeline nachgewiesen. In Tabelle 6 sind die getesteten Varianten sowie die zugehörige gemessene VAF aufgeführt.

Tabelle 5: Mit dem oncoReveal Myeloid Panel probentypübergreifend nachgewiesene FLT3-ITD-Varianten

FLT3 ITD-Variante	Länge	Probentyp	Gemessene VAF
<i>FLT3</i> :c.1835_1836insCTCATATGATCTCAAATGGGAGTTTCCAAGAGAAAA TTTAGAGTT	45 bp	FFPE-Gewebe	45 %
<i>FLT3</i> :c.1799_1800insATTCATATTCTCTGAAATCAA	21 bp	Zelllinie MOLM-13	61 %
<i>FLT3</i> :c.1837+15_1837+16insTCAAAACGGTACAGGTGACCGGCTCCTCAG ATAATGAGTACTTCTACGTTGATTTTCAGAGAATATGAATATGATCTCAAATG GGAGTTTCCAAGAGAAAAATTTAGAGTTTGGAAGAATGGAATGT	396 bp	Zelllinie PL-21	< 1 %
<i>FLT3</i> :c.1772_1801dup	30 bp	Zelllinie MV4-11	61 %
<i>FLT3</i> :c.1806_1807insGGGGCTTTCAGAGAATATGAATATGATCTCAAA	33 bp	SeraSeq Myeloid Mutation Mix	14 %
<i>FLT3</i> :c.1759_1800dup	42 bp	SeraSeq Myeloid Mutation Mix	8 %

Tabelle 6: Mit dem oncoReveal Essential MPN Panel bei ermittelter VAF getestete Varianten

Gen	HGVS-Nomenklatur	Protein	Gemessene VAF	Mutationstyp	Probe
JAK2	c.1611_1616del	p.Val537_Phe539del	5 %	Deletion	HD829
JAK2	c.1849G>T	p.Val617Phe	4 %	SNV	HD829
MPL	c.1544G>T	p.Trp515Leu	6 %	SNV	Seraseq Myeloid Mutation Mix
JAK2	c.1624_1629del	p.Asn542_Glu543del	9 %	Deletion	Seraseq Myeloid Mutation Mix
JAK2	c.1849G>T	p.Val617Phe	7 %	SNV	Seraseq Myeloid Mutation Mix
CALR	c.1099_1150del	p.Leufs*46	4 %	Deletion	Seraseq Myeloid Mutation Mix

HGVS: Human Genome Variation Society

Zusammenfassung

Illumina hat gemeinsam mit Pillar Biosciences einen vollständig integrierten Sequenzierungsworkflow entwickelt, der oncoReveal-Panels, die Sequenzierung auf der Illumina MiSeq i100 Series, die DRAGEN Amplicon-Pipeline und Illumina Connected Insights für die Forschung im Bereich Präzisionsonkologie umfasst. Die oncoReveal-Panels von Pillar Biosciences bieten Optionen für die gezielte NGS in der onkologischen Forschung für eine Reihe von Krebsarten und Gewebetypen. Die oncoReveal-Panels liefern dank der SLiMamp-Technologie optimale Amplifikationsspezifität und Genauigkeit. Die Evaluierung der Performance von oncoReveal-Panels mithilfe der Illumina-Sequenzierung hat bestätigt, dass die Assays bei einer Vielzahl von Probenotypen und Variantenklassen wie erwartet funktionieren.

Die Analyse mit der DRAGEN Amplicon-Pipeline ergab für die oncoReveal-Panels eine hohe Sensitivität und Spezifität beim Nachweis von SNVs, Indels, CNVs, ITDs (z. B. *FLT3*-ITD) und RNA-Fusionen sowohl in für Forschungszwecke erstellten Proben als auch in solchen aus der klinischen Forschung, einschließlich schwieriger Probenotypen wie FFPE-Gewebe. Optimierte DRAGEN Amplicon-Algorithmen ermöglichten den Nachweis von SNVs und Indels bei niedriger VAF. Zusätzliche Verbesserungen wie die CNV-Normalisierung mit einem PON und 3'/5'-Imbalance-Metriken für die RNA-Fusionserkennung erhöhen die Analyseperformance des integrierten Workflows weiter, ohne die Durchlaufzeit von unter 24 Stunden zu beeinträchtigen.

Weitere Informationen →

[DRAGEN-Sekundäranalyse](#)

[Pillar oncoReveal Multi-Cancer CNV + RNA Fusion Panel](#)

[Pillar oncoReveal Multi-Cancer RNA Fusion v2 Panel](#)

[Pillar oncoReveal Solid Tumor v2 Panel](#)

[Pillar oncoReveal BRCA1 & BRCA2 + CNV Panel](#)

[Pillar oncoReveal Myeloid Panel](#)

[Pillar oncoReveal Essential MPN Panel](#)

[Illumina Connected Insights](#)

Quellen

1. Illumina. TruSight™ Oncology Controls Package Insert. support.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/chemistry_documentation/trusight/oncology-comp/trusight-oncology-controls-package-insert-200009919_00.pdf. Veröffentlicht im November 2021. Aufgerufen am 29. September 2025
2. Revvity Health Sciences Inc. Horizon Myeloid HD829, Myeloid gDNA Reference Standard. horizondiscovery.com/-/media/Files/Horizon/resources/IFUs/HD829-IVD-Mimix-Myeloid-Cancer-Panel-gDNA-Reference-Standard-Instructions-for-Use.pdf?sc_lang=en. Veröffentlicht 2025. Aufgerufen am 12. September 2025.



1 800 8094566 (USA, gebührenfrei) | +1 858 2024566 (Tel. außerhalb der USA)
techsupport@illumina.com | www.illumina.com

© 2025 Illumina, Inc. Alle Rechte vorbehalten. Alle Marken sind Eigentum von Illumina, Inc. bzw. der jeweiligen Inhaber. Spezifische Informationen zu Marken finden Sie unter www.illumina.com/company/legal.html.
M-GL-03642 DEU v1.0