

Analise as CNVs de linha genética com o TruSightTM Hereditary Cancer Panel

- A redução da temperatura durante a hibridização otimiza o ensaio para a determinação da CNV.
- Os dados normais do painel de referência para determinação de CNV economizam tempo e recursos.



Introdução

Embora o câncer em si não seja uma doença hereditária, genes com mutações que podem levar a uma predisposição a um tipo específico de câncer são herdados. Na verdade, 5-10% de todos os cânceres diagnosticados estão ligados a fatores genéticos hereditários.¹⁻⁴ Das mutações hereditárias observadas, variações do número de cópias (CNVs) são prevalentes em 8,3% entre variantes patogênicas.⁵ Há muito se suspeita que as CNVs da linhagem germinativa desempenhem um papel nos tipos de câncer hereditários, incluindo os de mama, próstata, ovário, pâncreas, cólon, reto, endométrio, pulmão, e melanoma.⁶ Com essa alta prevalência, é crucial que qualquer protocolo projetado para triagem de risco de câncer hereditário seja otimizado para detecção de CNV.

Para simplificar a detecção de CNV de linhagem germinativa em cânceres hereditários, a Illumina está fornecendo arquivos de linha de base de um “painel de amostras normais” para permitir a comparação de determinações de CNV ao usar o TruSight Hereditary Cancer Panel nas plataformas da Illumina. O painel de dados normais está disponível para todos os usuários do TruSight Hereditary Cancer Panel e minimiza a necessidade de os clientes adquirirem, sequenciarem e analisarem suas próprias amostras “normais” para uso ao analisar o DNA do tumor.

Esta nota técnica discute as amostras usadas para criar o painel de dados normais, a preparação otimizada da biblioteca usando o TruSight Hereditary Cancer Panel, o sequenciamento em quatro plataformas diferentes da Illumina e a análise de dados usando o DRAGEN™ Enrichment app (Figura 1). Também são fornecidas informações sobre como os usuários podem acessar os dados resultantes.

Materiais e métodos

Amostras

Um total de 72 amostras foi caracterizado para este estudo (Tabelas 1-3). As amostras de caso têm uma CNV conhecida dentro de um gene de interesse. O painel de amostras normais não contém uma CNV com patogenicidade conhecida em nenhum dos genes de interesse.

Tabela 1: 72 amostras selecionadas para caracterizar o desempenho do TruSight Hereditary Cancer Panel

Tipo de amostra	N.º de amostras	Origem
Amostras de casos com verdade conhecida	30	Coriell Institute ^a
Painel de amostras normais	42	Coriell Institute ^b

a. Detalhes na Tabela 2.
b. Detalhes na Tabela 3.



Figura 1: visão geral do fluxo de trabalho usado para analisar amostras com o TruSight Hereditary Cancer Panel.

Tabela 2: amostras de casos com verdade conhecida do Coriell Institute

Amostra	Evento	Gene	Amostra	Evento	Gene
NA10401	DUP	chr2	NA11570	DEL	APC
NA12606	DUP	13q11.q21.2	NA20539	DEL	PALB2
NA04127	DUP	3p26.3p21.31	HG03857	DEL	PALB2
NA07216	DUP	3pter.q21	NA08039	DUP	PALB2
NA00343	DEL	rs11940551	NA09711	DUP	BRCA2
NA01555	DUP	BRCA2	NA07045	DEL	ATM
NA02718	DEL	BRCA2	NA08618	DUP	ATM
NA07150	DUP	BRCA2		DEL	MSH2
NA03330	DUP	BRCA2	NA13451	DEL	EPCAM
NA14238	DEL	APC		DEL	MSH6
NA14234	DEL	APC		DUP	EPCAM
NA11571	DEL	APC	NA07503	DEL	MSH6
Amostras de casos com eventos de pseudogenes					
HG00343	DEL	CHEK2	NA14626	DUP	BRCA1
NA07106	DUP	CHEK2	NA18949	DEL	BRCA1
NA05047	DUP	BMPRI1A	NA18540	DUP/DEL	PMS2
	DUP	BMPRI1A	HG00451	DUP	PMS2
NA20125	DUP	PTEN	HG01503	DUP	PMS2

DEL, deleção; DUP, duplicação

Tabela 3: amostras do Coriell Institute usadas para gerar o painel de dados normais

NA02250	NA11410	NA12144	NA14090	NA21677	NA24143	NA24694
NA07078	NA11602	NA12154	NA14091	NA21730	NA24149	NA24695
NA07414	NA11630	NA12155	NA14170	NA21781	NA24385	NA25504
NA09373	NA12006	NA12872	NA16533	NA21833	NA24465	NA25581
NA10080	NA12043	NA12874	NA21070	NA23249	NA24590	NA25582
NA11409	NA12044	NA12878	NA21660	NA23251	NA24631	NA25591

Preparação da biblioteca

As bibliotecas foram preparadas usando 50 ng de DNA, o TruSight Hereditary Cancer Panel (Illumina, Catálogo número 20029551) e o fluxo de trabalho Illumina DNA Prep with Enrichment (Illumina, Catálogo número 20025524). O TruSight Hereditary Cancer Panel é um painel de sequenciamento direcionado projetado para avaliar mutações na linhagem germinativa. O painel foi projetado em colaboração com especialistas em genômica do câncer e contém 10.341 sondas que têm como alvo 113 genes e 125 polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) para fins de identificação e pontuação de risco poligênico.⁷ O Illumina DNA Prep with Enrichment aproveita a tagmentação na esfera para um fluxo de trabalho rápido e simplificado.⁸

 Os protocolos foram seguidos conforme declarado no Guia de referência 9 do Illumina DNA Prep with Enrichment, com uma exceção: a hibridização foi realizada a 58 °C e 62 °C (temperatura recomendada no protocolo).

Sequenciamento

O sequenciamento foi realizado em quatro sistemas de sequenciamento diferentes, os sistemas de sequenciamento MiSeq, NextSeq, NextSeq, 550, NextSeq 2000 e NovaSeq, 6000 usando um comprimento de leitura de 2 × 150 bp a 100×–500× de cobertura ([Tabela 4](#)). Duas réplicas foram executadas para cada amostra.

 Recomenda-se cobertura de 300×; no entanto, testes internos com amostras de alta qualidade demonstram boa sensibilidade com cobertura de 100×. Os clientes devem validar a cobertura de acordo com a qualidade da amostra.

Análise

Os dados de sequenciamento foram analisados usando o DRAGEN Enrichment App v3.1010 acessível no BaseSpace™ Sequence Hub após o pipeline DRAGEN CNV.¹ O DRAGEN Baseline Builder foi usado com configurações padrão. O aplicativo realiza pequenas determinações de variantes, determinações de CNV e determinações de variantes estruturais, entre outras aplicações.

Resultados

Reduzindo a temperatura de hibridização

A temperatura de hibridização e lavagem recomendada para o TruSight Hereditary Cancer Panel é de 62 °C. A redução dessa temperatura para 58 °C resultou em maior especificidade para o painel de amostras normais e maior sensibilidade para as amostras do caso ([Tabela 4](#)). Para determinar a especificidade, o painel de amostras normais foi analisado usando o pipeline DRAGEN CNV e medido pela fórmula (número de éxons chamados)/(número de éxons no painel) ([Figura 2](#)). Para examinar a sensibilidade, a amostra do caso foi analisada usando o pipeline DRAGEN CNV para determinar o número de éxons perdidos da amostra de verdade conhecida. Se a verdade conhecida foi posicionada em um pseudogene, as amostras foram categorizadas separadamente ([Figura 3](#), [Tabela 5](#)).

Tabela 4: determinações de CNV de alta precisão a 58 °C

Plataforma	Cobertura da amostra do caso	Painel de cobertura normal da amostra	Sensibilidade (Amostras de casos)	Especificidade (Painel de amostras normais)
MiSeq system	100×	400×	99,54	99,99
	200×	400×	99,69	99,97
	300×	400×	99,84	99,96
	400×	400×	99,69	99,98
NextSeq 2000 system	500×	500×	99,46	99,98
NextSeq 550 system	500×	500×	99,46	99,97
NovaSeq 6000 system	500×	500×	99,62	99,97

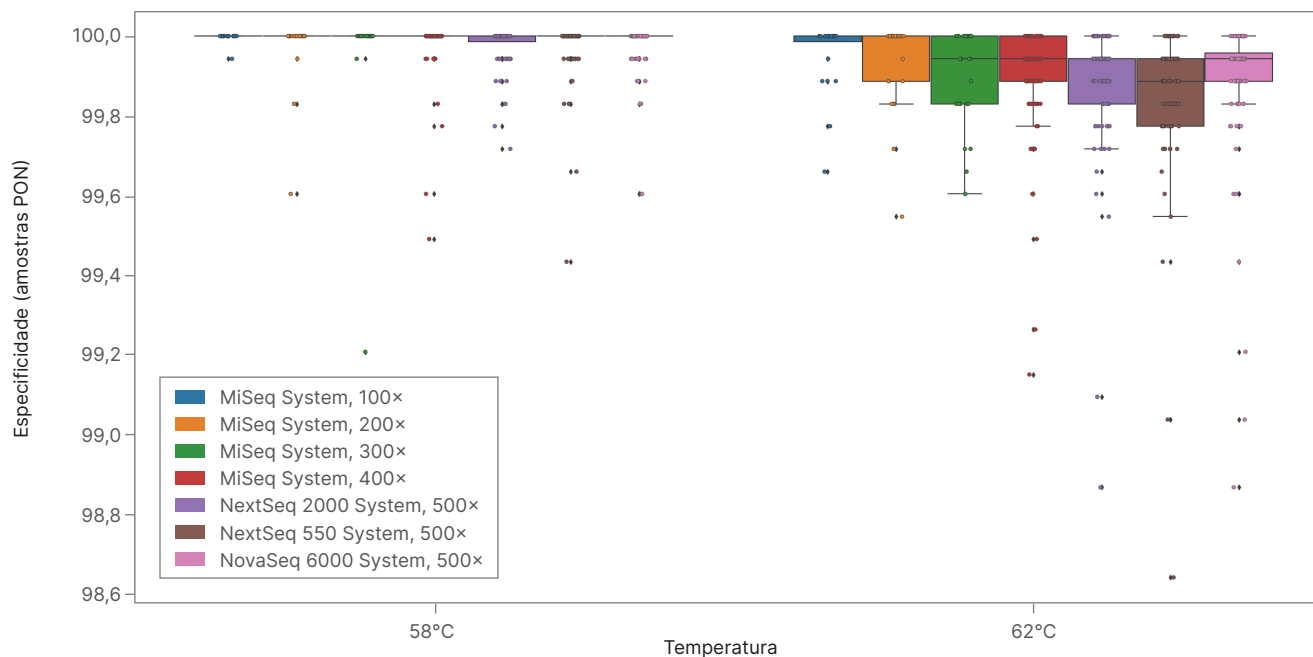


Figura 2: a maior especificidade do painel de normal observada a 58 °C. O painel de amostras normais foi hibridizado a 58 °C e 62 °C e sequenciado em quatro sistemas de sequenciamento Illumina diferentes em duplicata.

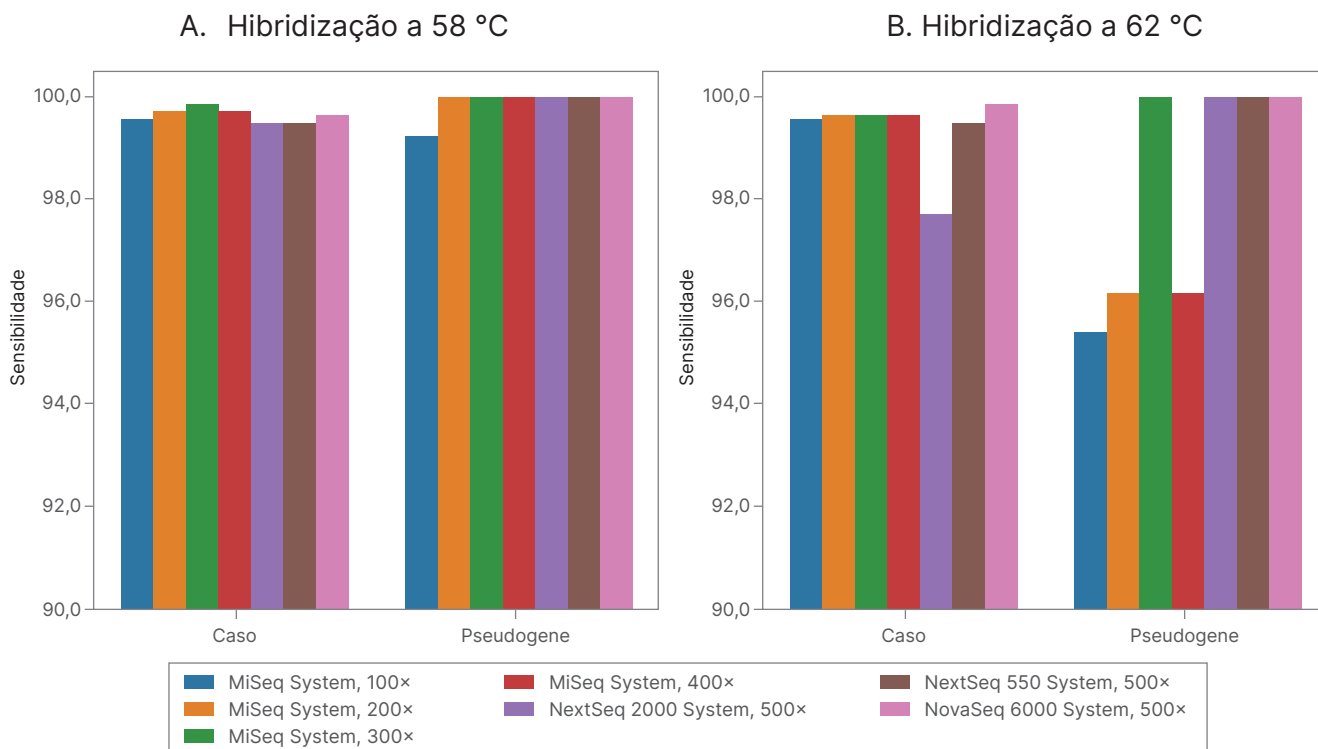


Figura 3: maior sensibilidade das amostras de caso observadas a 58 °C – As contagens de éxons nas amostras de caso foram comparadas com as amostras de verdade conhecida. As amostras incluídas nos testes de conformidade de psedógenos estão descritas na [Tabela 5](#).

Tabela 5: amostras incluídas nos testes de desempenho de pseudogenes

Amostra	Gene	Transcrição	Éxons afetados
HG00343	<i>CHEK2</i>	NM_007194.3	11-15
NA07106	<i>CHEK2</i>	NM_007194.3	11-15
NA05047	<i>BMPR1A</i>	NM_004329.2	12-13
NA20125	<i>BMPR1A</i>	NM_004329.2	12-13
	<i>PTEN</i>	NM_000314.4	9
NA14626	<i>BRCA1</i>	NM_007294.3	2
NA18949	<i>BRCA1</i>	NM_007294.3	2
NA18540	<i>PMS2</i>	NM_000535.6	6-15
HG00451	<i>PMS2</i>	NM_000535.6	1-12
HG01503	<i>PMS2</i>	NM_000535.6	1-10

Acesso ao painel de dados normais

O painel de dados normais, gerado usando amostras validadas, fornece aos pesquisadores um conjunto de dados normais conhecidos para comparação com amostras de tumor sem a necessidade de gastar tempo e recursos adquirindo, sequenciando e analisando esse conjunto de amostras. Os dados podem ser baixados do BaseSpace Sequence Hub (Figura 4) e usados como referência em estudos de CNV usando o DRAGEN Enrichment App para análise (Figura 5).



Os dados da análise de referência de CNV foram gerados usando amostras ideais e o Illumina DNA Prep with Enrichment, com hibridização ocorrendo a 58 °C. Para uma comparação precisa dos dados, as amostras tumorais precisam ter qualidade correspondente e ser sequenciadas nas mesmas condições.

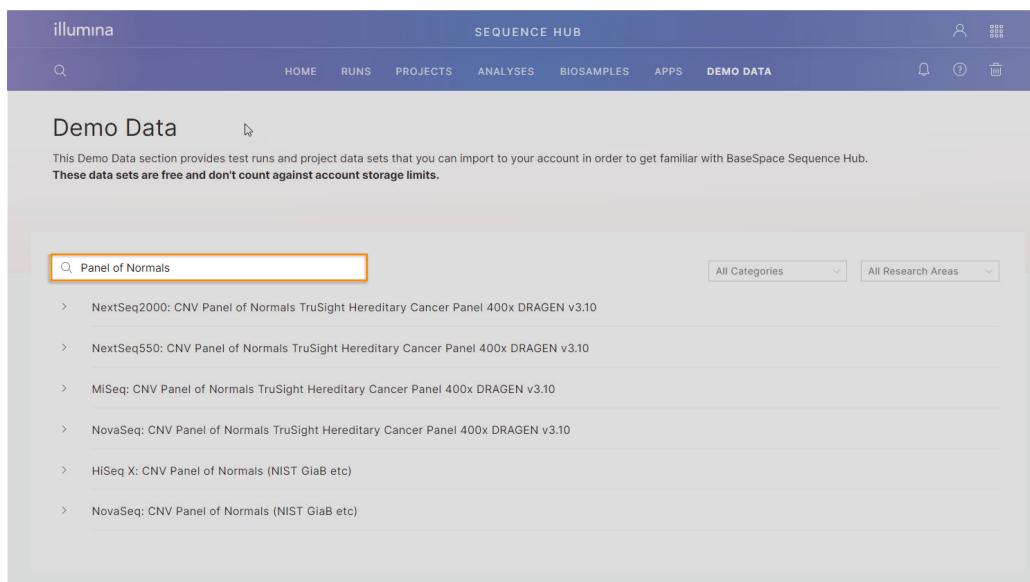
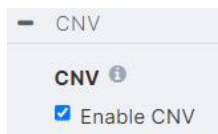
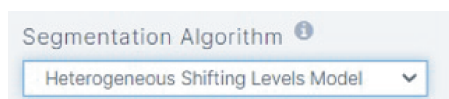


Figura 4: um acesso ao painel de dados normais – Os dados estão disponíveis no BaseSpace Sequence Hub em basespace.illumina.com/datacentral. Na tela de Dados de demonstração, digite “Panel of Normals” (Painel de normais) na barra de pesquisa (caixa laranja). Escolha o conjunto de dados gerado no sistema de sequenciamento Illumina em uso. Importe o projeto para o DRAGEN Enrichment app.

1. Habilite as CNVs.



2. Selecione o algoritmo de segmentação.



3. Selecione o painel de linha de base dos arquivos normais importados do BaseSpace Sequence Hub. Há 42 arquivos em cada pasta da plataforma.

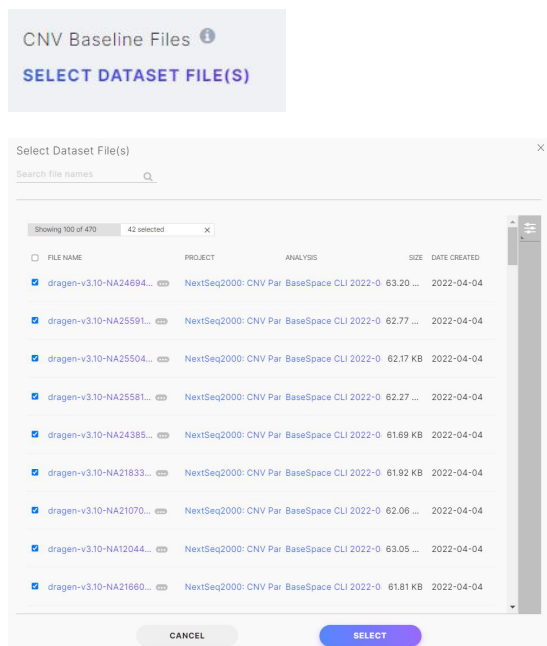


Figura 5: configure o DRAGEN Enrichment app para uso com o painel de dados normais – No aplicativo, selecione a amostra de entrada para análise. Os arquivos são descompactados para análise. Em seguida, as amostras passam pelo processo de mapeamento e alinhamento com a referência, seguido pela classificação de posições e, em seguida, pela identificação de variantes. Os usuários podem configurar o aplicativo para análise de CNV. Um arquivo VCF, gVCF e/ou BAM de saída é criado após a determinação de variante. Vários arquivos VCF serão gerados se a CNV/SV estiver ativada.

Resumo

O TruSight Hereditary Cancer Panel permite que os pesquisadores acessem um conjunto de conteúdo definido por especialistas para analisar a variação dentro de genes anteriormente ligados a uma predisposição ao câncer. Os dados demonstram que a redução da temperatura de hibridização durante a preparação da biblioteca com o Illumina DNA Prep with Enrichment otimiza a captura de regiões CNV. Para auxiliar na análise de CNV, o painel de dados normais, disponível no BaseSpace Sequence Hub, pode ser usado como comparação para dados gerados usando amostras tumorais de alta qualidade.

Saiba mais

TruSight Hereditary Cancer Panel, illumina.com/TruSightHereditaryCancer

Illumina DNA Prep with Enrichment, illumina.com/products/by-type/sequencing-kits/library-prep-kits/nextera-flex-enrichment.html

Illumina sequencing systems, illumina.com/systems

DRAGEN Enrichment app, illumina.com/products/by-type/informatics-products/basespace-sequence-hub/apps/dragen-enrichment.html

Referências

1. American Cancer Society. Family Cancer Syndromes. <https://www.cancer.org/healthy/cancer-causes/genetics/family-cancer-syndromes.html>. Atualizado em 14 de setembro de 2022. Acessado em 19 de outubro de 2022.
2. Tsaousis GN, Papadopoulou E, Apeless A, et al. Analysis of hereditary cancer syndromes by using a panel of genes: novel and multiple pathogenic mutations. *BMC Cancer*. 2019;19(1):535. Publicado em 3 de junho de 2019. doi:10.1186/s12885-019-5756-4
3. Nagy R, Sweet K, Eng C. Highly penetrant hereditary cancer syndromes. *Oncogene*. 2004;23(38):6445-6470. doi:10.1038/sj.onc.1207714

4. Garber JE, Offit K. [Hereditary cancer predisposition syndromes](#). *J Clin Oncol*. 2005;23(2):276-292. doi:10.1200/JCO.2005.10.042
5. Truty R, Paul J, Kennemer M, et al. [Prevalence and properties of intragenic copy-number variation in Mendelian disease genes](#). *Genet Med*. 2019;21(1):114-123. doi:10.1038/s41436-018-0033-5
6. Kumaran M, Cass CE, Graham K, et al. [Germline copy number variations are associated with breast cancer risk and prognosis](#). *Sci Rep*. 2017;7(1):14621. Publicado em 7 de novembro de 2017. doi:10.1038/s41598-017-14799-7
7. Illumina. TruSight Hereditary Cancer Panel Data Sheet. <https://science-docs.illumina.com/documents/LibraryPrep/trusight-hereditary-cancer-data-sheet-1170-2019-012/Content/Source/Library-Prep/TruSight/Hereditary-Cancer/trusight-hereditary-cancer-data-sheet-1170-2019-012/trusight-hereditary-cancer-data-sheet-1170-2019-012.html>. Acessado em 20 de outubro de 2022.
8. Illumina. Illumina DNA Prep with Enrichment Data Sheet. <https://www.illumina.com/content/dam/illumina/gcs/assembled-assets/marketing-literature/illumina-dna-prep-for-enrichment-770-2020-010/illumina-dna-prep-enrichment-data-sheet-770-2020-010.pdf>. Acessado em 20 de outubro de 2022.
9. Illumina. Illumina DNA Prep with Enrichment Reference Guide. https://support.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/chemistry_documentation/illumina_prep/illumina-dna-prep-with-enrichment-reference-guide-1000000048041-07.pdf. Acessado em 20 de outubro de 2022.
10. Illumina. DRAGEN Enrichment. <https://www.illumina.com/products/by-type/informatics-products/basespace-sequence-hub/apps/dragen-enrichment.html>. Acessado em 20 de outubro de 2022.
11. Illumina. Copy Number Variant Calling. https://support.illumina.com/content/dam/illumina-support/help/Illumina_DRAGEN_Bio_IT_Platform_v3_7_1000000141465/Content/SW/Informatics/Dragen/CopyNumVariantCalling_fDG_dtSW.htm. Acessado em 24 de outubro de 2022.



+1 (800) 809-4566, ligação gratuita (EUA) | tel. +1 (858) 202-4566
techsupport@illumina.com | www.illumina.com

© 2023 Illumina, Inc. Todos os direitos reservados. Todas as marcas comerciais pertencem à Illumina, Inc. ou aos respectivos proprietários. Para obter informações específicas sobre marcas comerciais, consulte www.illumina.com/company/legal.html.
M-GL-01341 PTB v1.0