Agendia NV.

MammaPrint® and BluePrint® Breast Cancer Recurrence and Molecular Subtyping Kit & ADAPT Software – Instruction for Use

Gezielte RNA-Sequenzierung aus Formalin-fixierten und in Paraffin eingebetteten Gewebeschnitten zur Bewertung des Rezidivrisikos und des molekularen Subtyps des Mammakarzinoms

Dokument-ID: **MKT-339 v7**

Zur Ansicht dieses Dokuments in anderen Sprachen gehen Sie bitte auf:
www.agendia.com/globalresources

Inhalt

Bestimmungsgemäße Verwendung/Verwendungszweck 3
Zusammenfassung und Erläuterung des Tests 4
Was wird gemessen und festgestellt? 4
Verfahrensprinzip 4
Reagenzien 5
Mitgelieferte Reagenzien 5
Erforderliche, nicht mitgelieferte Reagenzien und Ausrüstung 6
Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen 7
Aufbewahrung und Handhabung 8
Entnahme und Vorbereitung von Proben für die Analyse 9
Qualitätskontrolle 9
Analytische Qualitätsbewertung 9
QC 1: Qualitätsbewertung von gereinigter FFPE-Gesamt-RNA 9
QC 2: Qualitätsbewertung von amplifizierten, adaptorligierten cDNA-Bibliotheken 10
QC 3: Qualitätsbewertung von amplifizierten, zielangereicherten, indizierten Bibliotheken 10
Assay-Kontrollen 10
Testverfahren 11
1. Schritt: FFPE-RNA-Qualitätsbewertung und Aufbereitung 12
2. Schritt: Agendia NGS Bibliotheksvorbereitung 12
3. Schritt: Agendia NGS Zielanreicherung 18
QC 3: Qualitätsbewertung von amplifizierten, zielangereicherten, indizierten Bibliotheken 24
4. Schritt: Agendia NGS MiSeq Laden 26
5. Schritt: Analyse von FASTQ-Dateien mit ADAPT 28
Ergebnisse 29
Interpretation der Ergebnisse 29
MammaPrint 29
BluePrint 30
Verfahrensgrenzen 30
Erwartete Werte 31
MammaPrint 31

BluePrint 31
Leistungsmerkmale 32
MammaPrint 32
BluePrint 33
Unterstützung 35
Ausgabedatum 35
Maßnahmenempfehlung: 36
Literaturverzeichnis 38
Anhang A: Nukleotidsequenzen von MammaPrint BluePrint NGS 8 bp Indizes 40

MammaPrint® BluePrint®-Kit zur Erkennung des Rezidivrisikos und molekularen Subtypisierung bei Patientinnen mit Mammakarzinom

Vorgesehener Benutzer

Für den professionellen Einsatz im Labor.

Bevor der Test routinemäßig durchgeführt wird, müssen die Labors das Schulungs- und Einführungsprogramm von Agendia absolvieren. Nach erfolgreichem Abschluss wird ein Zertifikat ausgestellt.

VOR DER ANWENDUNG BITTE ALLE ANWEISUNGEN SORGFÄLTIG DURCHLESEN.

Bestimmungsgemäße Verwendung/Verwendungszweck

Das MammaPrint BluePrint-Kit zur Erkennung des Rezidivrisikos und molekularen Subtypisierung bei Patientinnen mit Mammakarzinom ist ein qualitativer, nicht automatisierter In-vitro-Diagnosetest für den Einsatz in klinischen Labors, bei dem mit Formalin-fixierten und in Paraffin eingebetteten (FFPE) Brustkrebsproben mithilfe der Zielanreicherung der Sequenzierung der nächsten Generation (NGS) die Genexpression gemessen wird, um das Risiko einer Patientin für Fernmetastasen zu beurteilen und den molekularen Subtyp zu bestimmen. Dieses Produkt ist ausschließlich für den professionellen Gebrauch im Labor bestimmt.

MammaPrint und BluePrint liefern Informationen zur Vorhersage der Größe des Nutzens einer systemischen Therapie und können bei der Behandlung von Brustkrebspatientinnen als Entscheidungshilfe dienen.

Die MammaPrint- und BluePrint-Gene messen die Eigenschaften der mehrstufigen Entwicklung von Brustkrebszellen zum Überleben, Vermehren, Ausbreiten und Metastasieren, die zu den krebsspezifischen Merkmalen gehören (Haan et.al, 2021) [1].

Der 70-Gen-MammaPrint-Test dient zur Erkennung von Patientinnen mit niedrigem oder hohem Risiko, innerhalb von 5 Jahren nach der Diagnose Fernmetastasen zu entwickeln [2] [3] [4]. Der BluePrint 80-Gen-Test dient zur Bestimmung des molekularen Subtyps von Brustkrebs und ermittelt, ob es sich um Tumoren vom Luminal-Typ, HER2-Typ oder Basal-Typ handelt [5].

Das MammaPrint- und BluePrint NGS-Kit wird bei Brustkrebspatientinnen im Stadium I oder II, die lymphknotennegativ oder lymphknotenpositiv mit bis zu 3 positiven Knoten sind, mit einer Tumorgröße von 5,0 cm oder weniger und bei Patientinnen im Stadium III durchgeführt. Das MammaPrint- und BluePrint-Ergebnis ist für die Verwendung durch Ärzte in Verbindung mit anderen klinisch-pathologischen Faktoren geeignet. [6]. Das MammaPrint BluePrint NGS-Kit wird mit dem Illumina® MiSeq®-System durchgeführt und die Ergebnisse werden mit dem Agendia Data Analysis Pipeline Tool (ADAPT) analysiert.

Zusammenfassung und Erläuterung des Tests

Was wird gemessen und festgestellt?

Das MammaPrint BluePrint NGS-Kit liefert ein individuelles Ergebnis mit niedrigem oder hohem Risiko für ein Wiederauftreten der Krankheit sowie eine individuelle Bestimmung des molekularen Subtyps eines Tumors.

MammaPrint bestimmt die Aktivität von 70 Genen in einer Tumorprobe und erstellt daraus ein Expressionsprofil oder einen „Fingerabdruck“ des Tumors. Mithilfe eines proprietären Algorithmus wird das Genexpressionsprofil zur Berechnung des MammaPrint-Index (MPI) verwendet, der das prognostische Profil für das Risiko eines Brustkrebsrezidivs angibt.

BluePrint bestimmt die Aktivität von 80 Genen in einer Tumorprobe und erstellt daraus drei Expressionsprofile. Mithilfe eines proprietären Algorithmus werden die Genexpressionsprofile zur Berechnung von BluePrint-Indizes verwendet, die zur Bestimmung des molekularen Subtyps der Probe dienen: Luminal-Typ, HER2-Typ, Basal-Typ. Die für das MammaPrint BluePrint NGS-Kit verwendeten Gene und Bewertungsalgorithmen sind identisch mit denjenigen, die für den MammaPrint- und BluePrint-Test verwendet werden, der im Diagnostic Service Laboratory von Agendia mit Microarray durchgeführt wird ([2] [3] [4] [7] [8] [9]).

Verfahrensprinzip

Das MammaPrint BluePrint NGS-Kit ist ein nicht-automatisiertes Laborverfahren, das mittels Capture Sequencing die Genexpression in RNA bestimmt, die aus FFPE-Gewebe mit einem Tumorzellgehalt von mindestens 30 % isoliert wurde.

Das NGS-Kit ermöglicht die Herstellung von zielgerichteten NGS-Bibliotheken aus FFPE-RNA unter Verwendung des Agilent SureSelect^{XT} RNA-Zielanreicherungssystems ohne einen ribosomalen Depletionsschritt. Im Arbeitsablauf der Zielanreicherung werden ultralange 120-mer biotinylierte cRNA-Köder verwendet, um MammaPrint- und BluePrint-Gene zu erfassen und sie aus einer NGS-Genomfragmentbibliothek anzureichern. Die aus dem Sequenzierungsergebnis (im FASTQ-Format) generierten Read-Count-Daten werden verwendet, um die Expressionsniveaus von MammaPrint- und BluePrint-Profilen zu bewerten und die Testergebnisse zu melden.

Das Sequenzierungsergebnis wird auf sichere Weise auf das Webportal von Agendia übertragen, und die Analyse erfolgt mit dem Agendia Data Analysis Pipeline Tool (ADAPT). Das Ergebnis des MammaPrint-Tests umfasst den MPI, der auf einer Skala von -1,000 bis +1,000 angegeben wird und das prognostische Profil der Probe bestimmt: Niedriges Risiko (MPI größer als +0,000) oder Hohes Risiko (MPI gleich oder kleiner als 0,000). Die BluePrint-Testergebnisse umfassen drei BluePrint-Indizes, wobei der höchste Index den molekularen Subtyp der Probe bestimmt.

Reagenzien

Mitgelieferte Reagenzien

Katalog Nr. 931280 wurde für bis zu 16 Reaktionen konfiguriert.

MammaPrint BluePrint NGS RNA-Bibliotheksvorbereitung (Pre-PCR) Katalog Nr. 931281 [Box 1 von 4]		**-15 °C bis -25 °C**
Komponente	**Kat.-Nr.**	**Volumen**
Agendia NGS Fragmentation Mix	931281-01	304 µL
Agendia NGS 1st Strand Master Mix	931281-02	140 µL
Agendia NGS 2nd Strand + End Repair Enzyme Mix	931281-03	400 µL
Agendia NGS 2nd Strand + End Repair Oligo Mix	931281-04	80 µL
Agendia NGS dA Tailing Master Mix	931281-05	320 µL
Agendia NGS Oligo Adaptor Mix	931281-06	80 µL
Agendia NGS Ligation Master Mix	931281-07	80 µL
Agendia NGS Forward PCR Primer	931281-08	60 µL
Agendia NGS PCR Master Mix	931281-09	800 µL
Agendia NGS Uracil DNA Glycosylase	931281-10	16 µL
Agendia NGS Reverse PCR Primer	931281-11	16 µL
Agendia NGS Nuclease-Free Water	931282-07	2,4 ml

MammaPrint BluePrint NGS Zielanreicherung (Post-PCR Box 1) Katalog Nr. 931282 [Box 2 von 4]		**15 °C bis 30 °C**
Komponente	**Kat.-Nr.**	**Volumen**
Agendia NGS Hyb 1	931282-01	400 µL
Agendia NGS Hyb 2	931282-02	1,25 ml
Agendia NGS Hyb 4	931282-03	1,25 ml
Agendia NGS Binding Buffer	931282-04	13,2 ml
Agendia NGS Wash Buffer 1	931282-05	8 mL
Agendia NGS Wash Buffer 2	931282-06	24 ml
Agendia NGS Nuclease-Free Water	931282-07	2,4 ml
Agendia NGS Elution Buffer	931282-08	5,8 ml
Agendia NGS Neutralization Buffer	931282-09	960 µL
MammaPrint BluePrint Packungsbeilage	931282-10	1x

MammaPrint BluePrint NGS Zielanreicherung (Post-PCR Box 2) Katalog Nr. 931283 [Box 3 von 4]		**-15 °C bis -25 °C**
Komponente	**Kat.-Nr.**	**Volumen**
Agendia NGS Indexing Block 1	931283-01	45 µL
Agendia NGS Block 2	931283-02	45 µL
Agendia NGS Indexing Block 3	931283-03	12 µL
Agendia NGS RNase Block	931283-04	18 µL
Agendia NGS Hyb 3	931283-05	160 µL
Agendia NGS Post-Cap PCR Primer	931283-06	16 µL
Agendia NGS PCR Master Mix	931281-09	800 µL
Agendia NGS 8bp Index Plate*	931283-07	12 µL

MammaPrint BluePrint NGS Panel Katalog Nr. 931284 [Box 4 von 4]		**-75 °C bis -85 °C**
Komponente	**Kat.-**	**Volumen**
MammaPrint BluePrint NGS Baits Library	931284	36 µL

* Die Indexsequenzen finden Sie in Anhang A: Nukleotid-Sequenzen von MammaPrint BluePrint NGS-Indizes

Erforderliche, nicht mitgelieferte Reagenzien und Ausrüstung

Reagenz	Hersteller, Katalognummer
RNA Isolation RNeasy FFPE Kit	QIAGEN, 73504
Actinomycin D	Von Streptomyces sp. (Sigma-Aldrich, A1410)
Dynabeads® MyOne™ Streptavidin T1	Invitrogen, 65601 oder 65602
Agencourt AMPure XP	Beckman Coulter Genomics, A63880 oder A63881 oder A63882
MiSeq-Reagenzien-Kit v3-Kit (150 Zyklen)	Illumina, MS-102-3001
PhiX Control Kit V3	Illumina, FC-110-3001
Dimethylsulfoxid	Molekularbiologische Qualität (Sigma-Aldrich, D8418)
Elutionsbuffer EB	QIAGEN, 19086
Ethanol (EtOH), 100 %	Molekularbiologische Qualität (VWR, 1085430250)
Tween 20	Nichtionisch (Sigma-Aldrich, P7949)
Nuklease-freies Wasser	Nuklease-frei, deionisiert, ohne chemische Zusätze (QIAGEN, 129114)
Natriumhydroxid (NaOH)	1N, Molekularbiologische Qualität (Sigma-Aldrich, 72068)
Xylol	Alle verfügbaren
Histo-Clear	Nationale Diagnostik, HS-200

Ausrüstung	Mindestanforderungen
Nukleinsäure-Analyseplattform und Verbrauchsmaterialien	RNA DV200 200 nt-4000 nt DNA 150 bp-550 bp (Quantitative Empfindlichkeit 0,5-50 ng/µl) DNA 150 bp-700 bp (Quantitative Empfindlichkeit 5-500 pg/µl)
Vortexmischer	Alle verfügbaren
Zentrifuge	Für 1,5 ml/0,5 ml-Röhrchen
Plattenzentrifuge	Passend für 0,8-ml-MIDI-Platten
Vakuumzentrifuge	Temperaturbereich: 15 °C bis 45 °C
Wärmeblöcke	37 °C für 0,8-ml-MIDI-Platten
Thermomixer	27 °C und 65 °C
Timer	NIST rückführbar
Magnetstativ	Passend für 0,80-ml-Platten (Life Technologies, AM10027) Passend für 0,2 ml 8-Streifen-Röhrchen(Life Technologies, 12331D) Passend für 1,5/2-ml-Röhrchen (Life Technologies, 12321D)
Thermocycler	Beheizter Deckel: 105 °C
Einkanalpipetten	1 µl – 1000 µl
8-Streifen-Röhrchen/Schüttler	Alle verfügbaren
Mehrkanalpipetten *(optional)*	1 µl – 1000 µl
Wiederholungspipetten *(optional)*	1 µl – 10 µl
MiSeq System	Illumina, SY-410-1003 oder Illumina, DX-410-1001 RUO-Modus

Hinweis: Die oben aufgeführten Reagenzien und allgemeine Ausrüstung wurden von Agendia für die Verwendung in Kombination mit dem MammaPrint BluePrint NGS Kit validiert. Diese Validierungen haben gezeigt, dass die Kombination dieser Reagenzien und allgemeinen Ausrüstung mit dem NGS Kit eine sichere und leistungsfähige Kombination ist (siehe Abschnitt Leistungsmerkmale).

Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen

- Zur Verwendung *in der In-vitro*-Diagnostik.
- Dieses Produkt darf nur von professionellen Labors verwendet werden, die von Agendia geschult und zertifiziert wurden.
- Die vom MammaPrint BluePrint-Kit zur Erkennung des Rezidivrisikos und molekularen Subtypisierung bei Patientinnen mit Mammakarzinom gelieferten Ergebnisse sind nur zur Verwendung durch Ärzte mit klinisch-pathologischen Standardfaktoren geeignet. Der Test ist nicht zur Krankheitsprognose konzipiert.
- Das Gerät ist für die Verwendung mit Formalin-fixierten und in Paraffin eingebetteten (FFPE) Gewebeproben von weiblichem Brustkrebs bestimmt.
- Den Inhalt des Kits nach Ablauf des auf der Außenseite der Verpackung aufgedruckten Verfallsdatums nicht mehr verwenden.
- Testkomponenten aus verschiedenen Kit-Chargen nicht untereinander austauschen. Bitte beachten, dass die Kit-Chargen auf dem Etikett der Umverpackung angegeben sind.
- Die Kitkomponenten bei den angegebenen Temperaturen in den dafür vorgesehenen Vor- und Nachamplifikationsbereichen aufbewahren.
- Um genaue Ergebnisse zu erhalten, sind die Anweisungen zum Testverfahren genau zu befolgen. Die Nichtbeachtung der Anweisungen, die Änderung der Anweisungen für das Testsystem oder die Verwendung von Reagenzien oder Instrumenten bzw. Analyse- und Reporting-Tools, die nicht von Agendia empfohlen werden, können die Testergebnisse ungültig machen. Werden die Anweisungen zur Entparaffinierung, RNA-Isolierung, Zielanreicherung oder Sequenzierung nicht befolgt, können die Testergebnisse ungültig sein.
- Der Prozentsatz der invasiven Tumorzellen muss mindestens 30 % betragen, da dies für gültige Ergebnisse erforderlich ist.
- Zur Gewährleistung der Probenintegrität werden im Labor geeignete Verfahren zur Identifizierung der Gewebe/Proben eingesetzt.
- Unzureichende oder minderwertige RNA kann zu falschen Ergebnissen führen.
- Personen ohne Erfahrung mit der RNA-Isolierung oder den Sequenzierungsverfahren der nächsten Generation sollten sich zuerst speziell schulen oder anleiten lassen.
- Informationen zu Umwelt, Gesundheit und Sicherheit können den Sicherheitsdatenblättern (SDS) auf https://diagnostic-products.agendia.com/resources/ entnommen werden.
- Die in Labors üblichen Vorsichtsmaßnahmen anwenden. Nicht mit dem Mund pipettieren. In den ausgewiesenen Laborarbeitsbereichen weder essen und trinken noch rauchen. Beim Umgang mit Proben und Testreagenzien Einweghandschuhe und Laborkittel tragen. Nach dem Umgang mit Proben und Testreagenzien gründlich die Hände waschen.
- Actinomycin D wird als Feststoff hergestellt und in einer Konzentration von 4 µg/µl in DMSO zubereitet und dann in 3 µl-Aliquoten für den einmaligen Gebrauch bei -20 °C lichtgeschützt gelagert. Die Aliquoten können bis zu einem Jahr vor der Verwendung gelagert werden. Das 4 µg/µl Actinomycin D in DMSO wird unmittelbar vor der Verwendung mit Wasser auf eine Actinomycin-D-Endkonzentration von 120 ng/µl verdünnt.
- ANMERKUNG: Das in Schritt 2 des Verfahrens verwendete Actinomycin D ist gefährlich – akute

Toxizität: oral, dermal und inhalativ.

- Bei der Arbeit im Labor eine geeignete persönliche Schutzausrüstung (PSA) tragen.

Aufbewahrung und Handhabung

Der Inhalt des Kits ist bis zu dem auf dem Etikett der Umverpackung aufgedruckten Verfallsdatum haltbar.

Jede Box bei den folgenden Temperaturen lagern:

- Box 1 und Box 3: zwischen -15 °C und -25 °C
- Box 2: zwischen 15 °C und 30 °C. Vor direktem Sonnenlicht geschützt lagern.
- Box 4: zwischen -75 °C und -85 °C

Das Produkt kann für bis zu 16 Reaktionen verwendet werden. Die Reagenzien sind für maximal 5 vor dem auf der Verpackung angegebenen Verfallsdatum stattfindende Gefrier-/Auftauzyklen stabil.

Der Test muss im Labor bei Raumtemperatur (zwischen 15 °C und 25 °C) durchgeführt werden.

Vor der Verwendung kräftig vortexen und anschließend visuell überprüfen, um sicherzustellen, dass keine Ausfällungen vorhanden sind.

Sicherstellen, dass täglich 0,2 N NaOH frisch zubereitet werden. Bei Raumtemperatur ist dies bis zu 12 Stunden stabil.

Täglich 70%iges Ethanol frisch zubereiten.

Beim Umgang mit PCR Clean-Up AMPure XP Beads und Library Streptavidin Beads und Library Streptavidin Beads die folgenden bewährten Praktiken beachten:

- Die AMPure XP PCR Beads keinesfalls einfrieren.
- Die AMPure XP Beads vor der Verwendung mindestens 30 Minuten lang auf Raumtemperatur kommen lassen.
- Unmittelbar vor der Verwendung die Perlen vortexen, bis sie gut suspendiert sind und eine homogene Farbe aufweisen.
- Die Probe nach Zugabe der Streptavidin Beads durch 10-maliges Auf- und Abpipettieren gründlich mischen.
- Die Perlen/Probenmischung bei Raumtemperatur für die gesamte angegebene Dauer einwirken lassen.

Eine PCR-Kontamination kann ungenaue und unzuverlässige Ergebnisse verursachen. Um Kontaminationen zu vermeiden, ist sicherzustellen, dass in den Vor- und Nachamplifikationsbereichen ausreichend Ausrüstung vorhanden ist (z. B. Pipetten, Pipettenspitzen, Vortexer und Zentrifuge).

Kreuzkontaminationen vermeiden. Nach jeder Probe und Abgabe von Reagenzien neue Pipettenspitzen verwenden. Die Proben mit einer Pipette mischen und die Platte zentrifugieren, wenn dies angezeigt wird. Sofern nicht anders angegeben, die Platten nicht vortexen. Aerosolfeste Spitzen verwenden, um das Risiko einer Amplifikatverschleppung und einer Kreuzkontamination von Probe zu Probe zu verringern.

Abfallbehandlung

Gebrauchte Reagenzien als chemischen Abfall behandeln und in Übereinstimmung mit den geltenden regionalen, nationalen und lokalen Gesetzen und Vorschriften entsorgen. Informationen zu Umwelt, Gesundheit und Sicherheit können den Sicherheitsdatenblättern (SDS) auf https://diagnostic-products.agendia.com/resources/ entnommen werden.

Das Produkt umfasst keine Gewebe, Zellen, Substanzen tierischen, menschlichen oder mikrobiellen Ursprungs.

Entnahme und Vorbereitung von Proben für die Analyse

Die Handhabung des Gewebes vor der Fixierung hat gemäß dem professionellen Laborprotokoll zu erfolgen.

Für jede zu verarbeitende Probe den FFPE-Tumorblock aus dem weiblichem Brustkrebsgewebe auswählen, indem eine Gewebeprobe verwendet wird, die den größten Anteil an invasivem Karzinom enthält und morphologisch mit der eingereichten Diagnose übereinstimmt. Der ausgewählte FFPE-Tumorblock sollte nicht älter als 5 Jahre sein. Sicherstellen, dass die Probe während des gesamten Prozesses eindeutig gekennzeichnet ist.

Die Lagerung der FFPE-Probe sollte gemäß einem professionellen Laborprotokoll erfolgen.

Anschließend sollten von jedem Gewebeblock 10 Präparate à 5 µm geschnitten werden mit jeweils einem 5-µm-Serienschnitt auf jedem Objektträger. Es wird empfohlen, geladene Objektträger zu verwenden, um die Gefahr zu verringern, dass Teile vom Objektträger fallen. Ein Objektträger wird für die Hämatoxylin-Eosin-Färbung (H&E) verwendet, um den Prozentsatz der Tumorzellen zu bestimmen, und die übrigen Objektträger können, je nach Größe des Gewebes, ganz oder teilweise für die RNA-Isolierung verwendet werden. Die Entparaffinierung muss entweder mit Xylol oder Histo-Clear[1] durchgeführt werden.

Der Prozentsatz der invasiven Tumorzellen muss mindestens 30 % betragen, da dies für gültige Ergebnisse erforderlich ist. Wenn nötig und möglich, kann eine Mikrodissektion durchgeführt werden, um große Bereiche von *In-situ*-Karzinomen, Nekrosen, Fettgewebe, Stroma und/oder Blutungen zu vermeiden, da diese den Gesamtanteil invasiver Tumorzellen verringern.

Qualitätskontrolle

Die in den Laborprozessen verwendeten Geräte sind auf geeignete Weise und in Übereinstimmung mit den Standardanforderungen Ihres Labors an die Qualitätskontrolle zu kalibrieren und zu warten.

Analytische Qualitätsbewertung

QC 1: Qualitätsbewertung von gereinigter FFPE-Gesamt-RNA

[1] Histo-Clear wurde für die Verwendung mit dem MammaPrint BluePrint NGS-Kit getestet.

Diese Qualitätskontrolle bewertet die Qualität der FFPE-Gesamt-RNA auf der Grundlage der DV200-Qualitätskontrollmetrik.

Der DV200-Wert wird als Prozentsatz der RNA-Fragmente mit einer Länge zwischen 200 nt und 4000 nt gemessen.

QC 2: Qualitätsbewertung von amplifizierten, adaptorligierten cDNA-Bibliotheken

Diese Qualitätskontrolle bewertet die Qualität (die cDNA-Fragmente müssen in den richtigen Größenbereich fallen, d. h. zwischen 150 und 550 bp) und die Quantität (ng/µL) der adaptorligierten cDNA-Bibliothek.

QC 3: Qualitätsbewertung von amplifizierten, zielangereicherten, indizierten Bibliotheken

Diese Qualitätskontrolle bewertet die Qualität (cDNA-Fragmente müssen in den richtigen Größenbereich fallen, d. h. zwischen 150 und 700 bp), die Menge (pg/µl) und die Stoffmengenkonzentration (pmol/l) der amplifizierten, zielangereicherten, indizierten Bibliothek.

Assay-Kontrollen

Gute Laborpraxis legt nahe, Kontrollmaterial auszuwerten, um verfahrenstechnische Unterschiede im Labor des Anwenders zu erkennen, die zu erheblichen Schwankungen oder Ungenauigkeiten bei den Ergebnissen führen können.

Es wird empfohlen, vor der erstmaligen Anwendung dieses Tests im Labor des Anwenders die Leistung des Tests zu überprüfen, indem mehrere Proben mit bekannten Leistungsergebnissen getestet werden.

Testverfahren

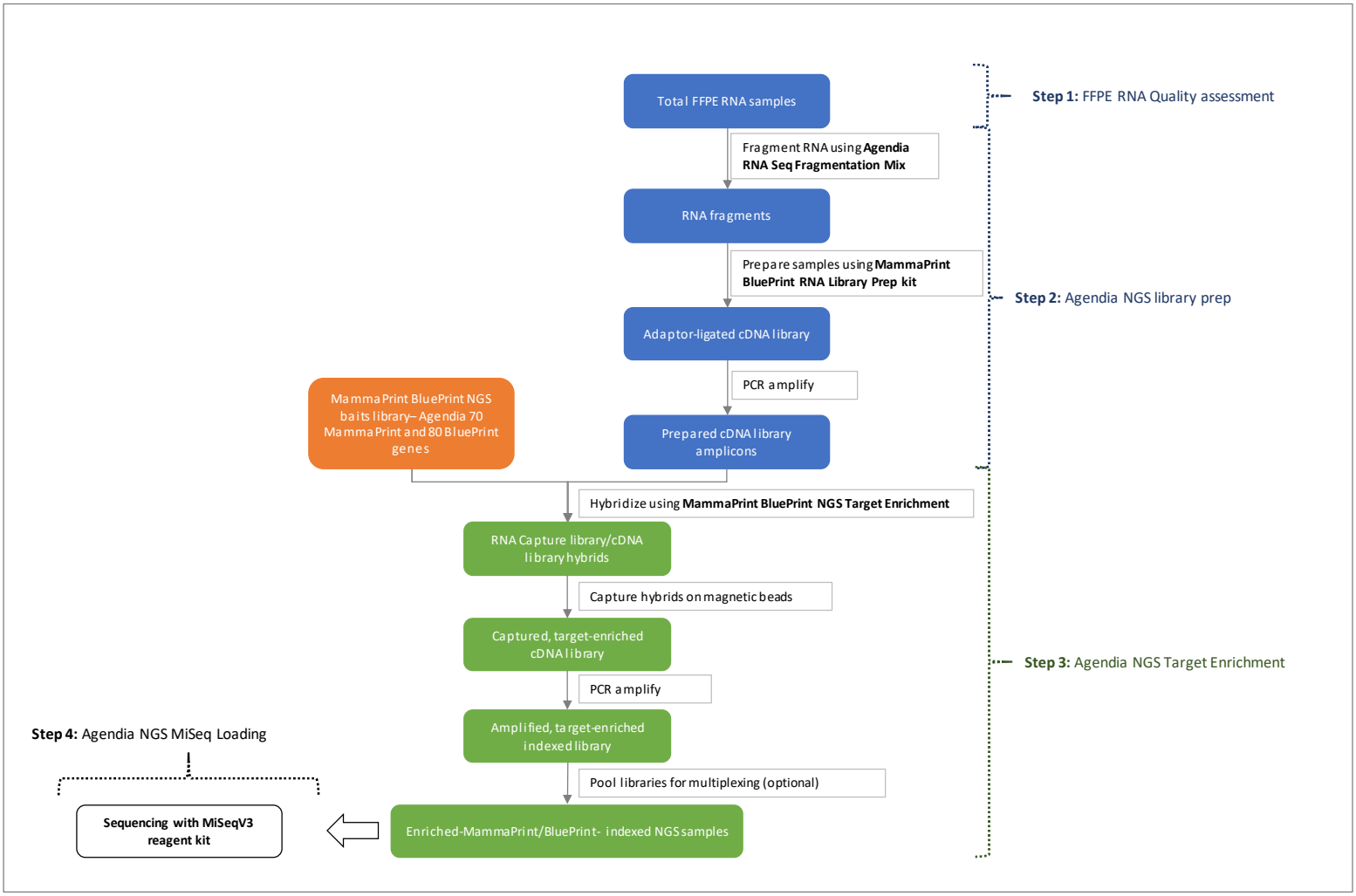

Abbildung 1: Überblick über das Verfahren mit dem MammaPrint BluePrint NGS-Kit

1. Schritt: FFPE-RNA-Qualitätsbewertung und Aufbereitung

Die RNA-Isolierung erfolgt mit dem QIAGEN RNeasy FFPE-Kit gemäß der Gebrauchsanweisung des Herstellers. Isolierte FFPE-gesamt-RNA muss ein Absorptionsverhältnis von 260/280 und 260/230 aufweisen, das bei beiden Verhältnissen nahe bei 2,0 liegt. Verhältniswerte mit einer signifikanten Abweichung von 2,0 können auf das Vorhandensein von organischen oder anorganischen Verunreinigungen hinweisen, die eine weitere Reinigung erforderlich machen oder anzeigen, dass die Probe nicht für die Verwendung mit dem MammaPrint BluePrint NGS-Kit geeignet ist.

Vor dem Beginn die gesamte RNA von jeder Probe in Nuklease-freiem Wasser aufbereiten.

FFPE-RNA-Qualitätsbewertung

1.1

Mit einer geeigneten Analyseplattform für Nukleinsäurefragmente den DV200-Wert für FFPE-RNA-Proben bestimmen.

200 ng RNA pro Probe für Standard-, gute bis mittlere und schlechte Proben aliquotieren.

Wenn keine 200 ng zur Verfügung stehen, die in der nachstehenden Tabelle angegebene RNA-Menge aliquotieren.

Kategorie	Verteilungswert (DV200)	Für Bibliotheksvorbereitung erforderliche RNA-Menge
Standard	≥70 % über 200 nt	100 ng
Gut bis mittel	≥50 % über 200 nt	150 ng
Schlecht	≥20 % über 200 nt	200 ng
Nicht empfohlen	<20 % über 200 nt	Nicht empfohlen

2. Schritt: Agendia NGS Bibliotheksvorbereitung

RNA-Fragmentierung und Primerhybridisierung	
2.1	***Agendia NGS Fragmentation Mix*** bei RT auftauen, dann auf Eis legen.
2.2	***Agendia NGS First Strand Master Mix*** auf Eis auftauen.
2.3	Die aliquotierte FFPE-RNA in einer Vakuumzentrifuge (≤45 °C) lyophilisieren. *Nicht übertrocknen*.
2.4	***Agendia NGS Fragmentation Mix*** für 10 Sekunden vortexen. Die FFPE-RNA in **19 µL *Agendia NGS Fragmentation Mix*** resuspendieren. Vortexen und kurz zentrifugieren.
2.5	Das folgende Thermocycler-Programm für Proben mit Standard- und guter/mittlerer RNA-Qualität ausführen: Deckel auf 95 °C erhitzt 1. 2 Minuten auf 94 °C 2. 3 Minuten auf 65 °C 3. Mindestens 1 Minute auf 4 °C Bei 4 °C oder auf Eis aufbewahren, bis fortgefahren werden kann.
2.6	Das folgende Thermocycler-Programm für Proben mit schlechter RNA-Qualität ausführen: Deckel auf 95 °C erhitzt 1. 5 Minuten auf 65 °C 2. Mindestens 1 Minute auf 4 °C Bei 4 °C oder auf Eis aufbewahren, bis fortgefahren werden kann.

Erststrang-cDNA-Synthese		
2.7	Frische 120 ng/µL ***Actinomycin D***-Verdünnung gemäß der nachstehenden Tabelle vorbereiten. Dieses Volumen ist ausreichend für 96 Reaktionen.	
	Agendia NGS Nuclease-Free Water	97 µL
	Actinomycin D (4 µg/µl in DMSO)	3 µL
	Gesamtvolumen	100 µL
	Mischung vortexen, kurz schleudern, bei RT aufbewahren und vor Licht schützen.	
2.8	***Agendia NGS First Strand Synthesis Mix*** gemäß der folgenden Tabelle vorbereiten. Bei der Berechnung 1 zusätzliche Reaktion berücksichtigen. **Anmerkung:** Vor dem Zusammenführen der Reagenzkomponenten den First Strand Master Mix 10 Sekunden lang vortexen.	
	Reagenz	**Volumen pro Reaktion**
	Actinomycin D (120 ng/ µl in H2O)	0,5 µl
	Agendia NGS First Strand Master Mix	8,0 µl
	Gesamtvolumen	**8,5 µl**
	Mischung vortexen, kurz schleudern und auf Eis aufbewahren.	
2.9	Auf Eis **8,5 µl *Agendia NGS First Strand Synthesis Mix*** in jede Vertiefung einer neuen Erststrang-cDNA-Platte geben.	
2.10	Die fragmentierte FFPE-RNA in die Vertiefungen der Erststrang-cDNA-Platte füllen. Die Platte verschließen, vortexen und kurz zentrifugieren.	
2.11	Das folgende Thermocycler-Programm ausführen: Deckel auf 95 °C erhitzt 1. 10 Minuten auf 25 °C 2. 40 Minuten auf 37 °C 3. Mindestens 3 Minute auf 4 °C Bei 4 °C oder auf Eis aufbewahren, bis fortgefahren werden kann.	

Zweitstrang-cDNA-Synthese und Reparatur der Enden		
2.12	***Second Strand Synthesis and End Repair Mix*** gemäß der folgenden Tabelle vorbereiten. Bei der Berechnung 1 zusätzliche Reaktion berücksichtigen. **Anmerkung:** Vor dem Zusammenführen jedes Reagenz 5 Sekunden lang vortexen.	
	Reagenz	**Volumen pro Reaktion**
	Agendia NGS Second Strand + End Repair Enzyme Mix	25,0 µl
	Agendia NGS Second Strand + End Repair Oligo Mix	5,0 µl
	Gesamtvolumen	**30,0 µl**
	Mischung vortexen, kurz schleudern und auf Eis aufbewahren.	
2.13	**30 µl *Second Strand Synthesis and End Repair Mix*** in jede Vertiefung geben.	
2.14	Die Platte verschließen, vortexen und kurz zentrifugieren.	
2.15	Das folgende Thermocycler-Programm ausführen: Keinen beheizten Deckel verwenden. Wenn der Heizdeckel nicht ausgeschaltet werden kann, sollte das Programm mit geöffnetem Deckel durchgeführt werden. 1. 60 Minuten auf 16 °C 2. Mindestens 3 Minute auf 4 °C Bei 4 °C oder auf Eis aufbewahren, bis fortgefahren werden kann.	

Aufreinigung der synthetisierten cDNA mit AMPure XP Beads	
2.16	***AMPure XP Beads*** mindestens 30 Minuten lang auf Raumtemperatur kommen lassen. Vortexen, bis die Perlensuspension homogen ist. Beim Fortfahren mit der **Adenylierung der cDNA 3'-Enden *Agendia NGS dA Tailing Master Mix*** auf Eis auftauen.
2.17	**108 µl** homogene Perlensuspension in jede Vertiefung einer neuen 0,8-mL-MIDI-Platte mit 96 Vertiefungen geben.
2.18	**57,5 µl** der Probenmischung in die jeweilige Vertiefung der 0,8-mL-MIDI-Platte mit 96 Vertiefungen füllen.
2.19	Die Platte verschließen, vortexen und kurz zentrifugieren.
2.20	Proben für 5 Minuten bei RT inkubieren.
2.21	Die Platte mindestens 5 Minuten lang bei RT auf ein Magnetstativ legen.
2.22	Während die Platte auf dem Magnetstativ liegt, vorsichtig die gereinigte Lösung aus jeder Vertiefung entnehmen und entsorgen. Die Perlen beim Entfernen der Lösung nicht berühren.
2.23	Während die Platte auf dem Magnetstativ liegt, **200 µl** frisches 70%iges Ethanol in jede Vertiefung geben.
2.24	10 Sekunden (oder bis die Lösung klar ist) warten, damit sich alle vermischten Perlen setzen können, und daraufhin das Ethanol vorsichtig entnehmen.
2.25	Diesen Vorgang für insgesamt 2 Waschgänge wiederholen.
2.26	Falls erforderlich, die MIDI-Platte kurz zentrifugieren, die Platte wieder auf das Magnetstativ legen und dann die restlichen Ethanoltropfen mit einer Pipette entnehmen.
2.27	Die Proben 3 Minuten lang bei 37 °C auf dem Heizblock trocknen. Nicht übertrocknen, aber sicherstellen, dass das gesamte Ethanol entfernt wird.
2.28	**21,5 µl** nuklease-freies Wasser in jede Probenvertiefung geben.
2.29	Die Platte verschließen, gründlich vortexen und kurz zentrifugieren, um die Flüssigkeit aufzufangen.
2.30	2 Minuten bei RT inkubieren.
2.31	Die MIDI-Platte auf das Magnetstativ legen und 5 Minuten lang – oder bis die Lösung klar ist – inkubieren.
2.32	**20 µl** des gereinigten Überstandes entnehmen und in eine neue 0,2-mL-Platte mit 96 Vertiefungen geben.
Haltepunkt: Wenn nicht mit dem nächsten Schritt fortgefahren wird, die Platte verschließen und zwischen –15 °C und –25 °C lagern.	

Adenylierung der cDNA 3'-Enden	
2.33	***Agendia NGS dA Tailing Master Mix*** auf Eis auftauen. ***Agendia NGS dA Tailing Master Mix*** für 15 Sekunden auf hoher Geschwindigkeit vortexen. **20 µl** in jede Vertiefung der Platte geben und **20 µl** des gereinigten Überstandes hinzufügen. Mischung vortexen, kurz schleudern und auf Eis aufbewahren.
2.34	Das folgende Thermocycler-Programm ausführen: Keinen beheizten Deckel verwenden. Wenn der Heizdeckel nicht ausgeschaltet werden kann, sollte das Programm mit geöffnetem Deckel durchgeführt werden. 1. 30 Minuten auf 37 °C 2. Mindestens 3 Minute auf 4 °C Bei 4 °C oder auf Eis aufbewahren, bis fortgefahren werden kann.
Adaptorligation	
2.35	***Agendia NGS Ligation Master Mix*** in Eis auftauen. ***Agendia NGS Oligo Adaptor Mix*** auf Eis auftauen. ***Adaptor Ligation Mix*** gemäß der nachstehenden Tabelle vorbereiten. **Anmerkung:** Jedes Reagenz 10 Sekunden lang vortexen.

Reagenz	**Volumen pro Reaktion**
Agendia NGS Ligation Master Mix	5,0 µl
Agendia NGS Oligo Adaptor Mix	5,0 µl
Gesamtvolumen	**10,0 µl**

	Mischung vortexen, kurz schleudern und auf Eis aufbewahren. Bei kleinen Probenchargen können die Reagenzkomponenten einzeln in jede Probenvertiefung gegeben werden. Bei individueller Zugabe Agendia NGS Ligation Master Mix langsam pipettieren, um sicherzustellen, dass das gesamte Volumen abgegeben wird.
2.36	Die Adenylierungs-/Ligationsplatte auf Eis legen und daraufhin **10 µl *Adaptor Ligation Mix*** in jede Probenvertiefung geben. Platte verschließen, vortexen und kurz zentrifugieren.
2.37	Das folgende Thermocycler-Programm ausführen: Keinen beheizten Deckel verwenden. Wenn der Heizdeckel nicht ausgeschaltet werden kann, sollte das Programm mit geöffnetem Deckel durchgeführt werden. 1. 15 Minuten auf 20 °C 2. Mindestens 3 Minute auf 4 °C Bei 4 °C oder auf Eis aufbewahren, bis fortgefahren werden kann.

Aufreinigung der adaptorligierten cDNA mit AMPure XP Beads	
2.38	***AMPure XP Beads*** mindestens 30 Minuten lang auf Raumtemperatur kommen lassen. Vortexen, bis die Perlensuspension homogen ist. ***Agendia NGS PCR Master Mix*** bei RT auftauen. Nach dem Auftauen in Eis legen. ***Agendia NGS Uracil DNA Glycosylase (UDG), Agendia NGS Forward PCR Primer*** und ***Agendia NGS Reverse PCR Primer*** in Eis auftauen
2.39	**90 µl** homogene Perlensuspension in jede Vertiefung einer neuen 0,8-mL-MIDI-Platte mit 96 Vertiefungen geben.
2.40	**50 µl** der Probenmischung in die jeweilige Vertiefung der 0,8-mL-MIDI-Platte mit 96 Vertiefungen füllen.
2.41	Die Platte verschließen, vortexen und kurz zentrifugieren.
2.42	Proben für 5 Minuten bei RT inkubieren.
2.43	Die Platte mindestens 5 Minuten lang bei RT auf ein Magnetstativ legen.
2.44	Während die Platte auf dem Magnetstativ liegt, vorsichtig die gereinigte Lösung aus jeder Vertiefung entnehmen und entsorgen. Die Perlen beim Entfernen der Lösung nicht berühren.
2.45	Während die Platte auf dem Magnetstativ liegt, **200 µl** frisches 70%iges Ethanol in jede Vertiefung geben.
2.46	10 Sekunden (oder bis die Lösung klar ist) warten, damit sich alle vermischten Perlen setzen können, und daraufhin das Ethanol vorsichtig entnehmen.
2.47	Diesen Vorgang für insgesamt 2 Waschgänge wiederholen.
2.48	Falls erforderlich, die MIDI-Platte kurz zentrifugieren, die Platte wieder auf das Magnetstativ legen und dann die restlichen Ethanoltropfen mit einer Pipette entnehmen.
2.49	Die Proben 3 Minuten lang bei 37 °C auf dem Heizblock trocknen. Die Proben nicht übertrocknen, aber sicherstellen, dass das gesamte Ethanol entfernt wird.
2.50	**23 µl** nuklease-freies Wasser in jede Probenvertiefung geben.
2.51	Die Platte verschließen, gründlich vortexen und kurz zentrifugieren, um die Flüssigkeit aufzufangen.
2.52	2 Minuten bei RT inkubieren.
2.53	Die MIDI-Platte auf das Magnetstativ legen und 5 Minuten lang – oder bis die Lösung klar ist – inkubieren.
2.54	**22 µl** des gereinigten Überstandes entnehmen und in eine neue 0,2-mL-Platte mit 96 Vertiefungen geben.

Amplifikation der adaptorligierten cDNA-Bibliothek		
2.55	Den ***Pre-Capture PCR Mix*** gemäß der folgenden Tabelle auf Eis vorbereiten. **Anmerkung: *Agendia NGS PCR Master Mix***-Reagenz für 30 Sekunden vor dem Zusammenführen vortexen.	
	Reagenz	**Volumen pro Reaktion**
	Agendia NGS PCR Master Mix	25,0 µl
	Agendia NGS Uracil DNA Glycosylase (UDG)	1,0 µl

	Agendia NGS Forward PCR Primer	1,0 µl
	Agendia NGS Reverse PCR Primer	1,0 µl
	Gesamtvolumen	**28,0 µl**
	Mischung vortexen, kurz schleudern und auf Eis aufbewahren.	
2.56	**28 µl *Pre-Capture PCR Mix*** in jede Probenvertiefung geben. Platte verschließen, vortexen und kurz zentrifugieren.	

2.57	Das folgende Thermocycler-Programm ausführen: Deckel auf 95 °C erhitzt 1. 15 Minuten auf 37 °C 2. 2 Minuten auf 95 °C 3. 30 Sekunden auf 95 °C 4. 30 Sekunden auf 65 °C 5. 1 Minute auf 72 °C 6. Die Schritte 3-5 für insgesamt 14 Zyklen wiederholen. 7. 5 Minuten auf 72 °C 8. Mindestens 3 Minute auf 4 °C Bei 4 °C oder auf Eis aufbewahren, bis fortgefahren werden kann.

Aufreinigung der amplifizierten, adaptorligierten cDNA mit AMPure XP Beads	
2.58	***AMPure XP Beads*** mindestens 30 Minuten lang auf Raumtemperatur kommen lassen. Vortexen, bis die Perlensuspension homogen ist.
2.59	**90 µl** homogene Perlensuspension in jede Vertiefung einer neuen 0,8-mL-MIDI-Platte mit 96 Vertiefungen geben.
2.60	**50 µl** der Probenmischung in die jeweilige Vertiefung der 0,8-mL-MIDI-Platte mit 96 Vertiefungen füllen.
2.61	Die Platte verschließen, vortexen und kurz zentrifugieren.
2.62	Proben für 5 Minuten bei RT inkubieren.
2.63	Die Platte mindestens 5 Minuten lang bei RT auf ein Magnetstativ legen.
2.64	Während die Platte auf dem Magnetstativ liegt, vorsichtig die gereinigte Lösung aus jeder Vertiefung entnehmen und entsorgen. Die Perlen beim Entfernen der Lösung nicht berühren.
2.65	Während die Platte auf dem Magnetstativ liegt, **200 µl** frisches 70%iges Ethanol in jede Vertiefung geben.
2.66	10 Sekunden (oder bis die Lösung klar ist) warten, damit sich alle vermischten Perlen setzen können, und daraufhin das Ethanol vorsichtig entnehmen.
2.67	Diesen Vorgang für insgesamt 2 Waschgänge wiederholen.
2.68	Falls erforderlich, die MIDI-Platte kurz zentrifugieren, die Platte wieder auf das Magnetstativ legen und dann die restlichen Ethanoltropfen mit einer Pipette entnehmen.
2.69	Die Proben 3 Minuten lang bei 37 °C auf dem Heizblock trocknen. Die Proben nicht übertrocknen, aber sicherstellen, dass das gesamte Ethanol entfernt wird.
2.70	**26 µl** nuklease-freies Wasser in jede Probenvertiefung geben.
2.71	Die Platte verschließen, gründlich vortexen und kurz zentrifugieren, um die Flüssigkeit aufzufangen.
2.72	Für 2 Minuten bei RT inkubieren.
2.73	Die MIDI-Platte auf das Magnetstativ legen und 5 Minuten lang – oder bis die Lösung klar ist – inkubieren.
2.74	**25 µl** des gereinigten Überstandes entnehmen und in eine neue 0,2-mL-Platte mit 96 Vertiefungen geben.
Haltepunkt: Wenn nicht mit dem nächsten Schritt fortgefahren wird, die Platte verschließen und zwischen –15 °C und –25 °C lagern.	
Quantifizierung und Normalisierung der amplifizierten, adaptorligierten cDNA	
2.75	Die amplifizierte, adaptorligierte Pre-Capture-Bibliothek mithilfe einer geeigneten Nukleinsäurefragment-Analyseplattform im Bereich zwischen 150 bp und 550 bp berechnen. Insgesamt 200 ng cDNA-Pre-Capture-Bibliothek aliquotieren.
2.76	Die 200 ng cDNA-Pre-Capture-Bibliothek in einer Vakuumzentrifuge lyophilisieren und in **3,4 µl** nuklease-freiem Wasser neu zusammenstellen. *Nicht übertrocknen*. Vortexen und kurz zentrifugieren.
Haltepunkt: Wenn nicht mit dem nächsten Schritt fortgefahren wird, die Röhrchen zwischen –15 °C und –25 °C aufbewahren.	

3. Schritt: Agendia NGS Zielanreicherung

Bibliothek-Hybridisierung

3.1 Einen Eiskübel vorbereiten und die Reagenzien wie unten beschrieben auftauen:

Mix A Hyb-Buffer	Mix B Vorbereitete Bibliothek	Mix C Capture Bibliothek
Agendia NGS Hyb Nr. 1 **RT**	***Agendia NGS Indexing Block Nr. 1*** **4 °C (Eis)**	***Agendia NGS RNase Block*** **Nur bei der Herstellung von Mix C von –20 °C entfernen**
Agendia NGS Hyb Nr. 2 **RT**	***Agendia NGS Block Nr. 2*** **4 °C (Eis)**	***MammaPrint BluePrint NGS Baits Library*** **4 °C (Eis)**
Agendia NGS Hyb Nr. 3 **RT**	***Agendia NGS Indexing Block Nr. 3*** **4 °C (Eis)**	-
Agendia NGS Hyb Nr. 4 **RT**	-	-

3.2 Den **Library Mix A** gemäß der **nachstehenden Tabelle**in einem 1,5-ml-Röhrchen bei RT vorbereiten.

Reagenz	**Volumen pro Reaktion**
Agendia NGS Hyb Nr. 1	6,63 µL
Agendia NGS Hyb Nr. 2	0,27 µL
Agendia NGS Hyb Nr. 3	2,65 µL
Agendia NGS Hyb Nr. 4	3,45 µL
Gesamtvolumen	**13,0 µL**

Den Mix vorsichtig vortexen, kurz schleudern und bei RT aufbewahren.

3.3 Ein neues 8-Streifen-Röhrchen vorbereiten und mit **"A"** beschriften. Anschließend **13 µl** pro Probe von ***Library Mix A*** in jede Vertiefung aliquotieren.
Röhrchen bei RT aufbewahren.

3.4 Den ***Library Mix B*** gemäß der **nachstehenden Tabelle** in einem 0,5-ml-Röhrchen auf Eis vorbereiten.

Reagenz	**Volumen pro Reaktion**
Agendia NGS Indexing Block Nr. 1	2,5 µL
Agendia NGS Block Nr. 2	2,5 µL
Agendia NGS Indexing Block Nr. 3	0,6 µL
Gesamtvolumen	**5,6 µL**

Den Mix vorsichtig vortexen, kurz schleudern und auf Eis aufbewahren.

3.5 Ein neues 8-Streifen-Röhrchen vorbereiten und mit **"B"** beschriften. Anschließend

1. **5,6 µl** von ***Library Mix B*** in jede Vertiefung aliquotieren**.**
2. **3,4 µl** der Probe in jede betreffende Vertiefung geben.
3. Vorsichtig mischen durch 10-maliges Auf- und Abpipettieren.

3.6 Das 8-Streifen-Röhrchen mit dem ***Library Mix B und der Probe*** in einen Thermocycler setzen und das folgende Programm ausführen:
Deckel auf 105 °C erhitzt; Volumen auf **29 µl** einstellen, falls zutreffend

1. 5 Minuten auf 95 °C
2. 5 Minuten auf 65 °C
3. Halten bei 65 °C

<table>
<tr><td rowspan="6">3.7</td><td colspan="2">Den Library Mix C gemäß der nachstehenden Tabelle in einem 0,5-ml-Röhrchen in 4 °C kaltem Eis vorbereiten.</td></tr>
<tr><td>Reagenz</td><td>Volumen pro Reaktion</td></tr>
<tr><td>Agendia NGS Nuclease-free water</td><td>4,5 µL</td></tr>
<tr><td>Agendia NGS RNase Block</td><td>0,5 µL</td></tr>
<tr><td>MammaPrint BluePrint NGS Baits Library</td><td>2,0 µL</td></tr>
<tr><td>Gesamtvolumen</td><td>7,0 µL</td></tr>
<tr><td colspan="3">Vorsichtig durch Auf- und Abpipettieren mischen. Sicherstellen, dass keine Luftblasen vorhanden sind.

Anmerkung: Mix C nahe der 5-Minuten-Marke bei 65 °C von Schritt 3.6 vorbereiten. Die Mischung nur kurz auf RT halten, bis Mix A zu Mix C hinzugefügt wird.
Lösungen, die die MammaPrint BluePrint NGS Baits Library enthalten, nicht über längere Zeit auf RT halten.</td></tr>
<tr><td>3.8</td><td colspan="2">Ein neues 8-Streifen-Röhrchen mit „C“ beschriften und 7 µl von Library Mix C in jede Vertiefung des 8-Streifen-Röhrchens geben.</td></tr>
<tr><td>3.9</td><td colspan="2">13 µl von Library Mix A in 8-Streifen-Röhrchen mit Library Mix C pipettieren. 5 Sekunden lang durch Vortexen gut mischen und kurz zentrifugieren. Die Mischung bis zur Verwendung in Schritt 3.10 kurz auf RT halten.</td></tr>
<tr><td>3.10</td><td colspan="2">Während der Thermocycler noch auf 65°C gehalten wird, Library Mix A+C vollständig in die Probenvertiefungen mit Library Mix B pipettieren. Sicherstellen, dass der gesamte Inhalt von Library Mix A+C in Library Mix Bübertragen wird.</td></tr>
<tr><td>3.11</td><td colspan="2">Vorsichtig mischen durch 10-maliges Auf- und Abpipettieren und den Deckel schließen. Wenn Blasen vorhanden sind, eine schnelle Drehung durchführen.</td></tr>
<tr><td>3.12</td><td colspan="2">Sicherstellen, dass alle Röhrchendeckel geschlossen sind. Den Deckel des Thermocyclers schließen und das kontinuierliche Programm ausführen:
1. 17–24 Stunden bei 65 °C
2. Halten bei 65 °C</td></tr>
</table>

<table>
<tr><td colspan="2">Streptavidin Beads vorbereiten</td></tr>
<tr><td>3.13</td><td>650 µl Agendia NGS Wash Buffer 2 pro Probe in 2-ml-Röhrchen vortexen und aliquotieren.</td></tr>
<tr><td>3.14</td><td>Aliquotierte Röhrchen für mindestens 30 Minuten in einen 65 °C heißen Heizblock stellen.</td></tr>
<tr><td>3.15</td><td>Die Dynabeads MyOne Streptavidin T1 Beads mindestens 30 Sekunden lang vortexen, um die verklumpten Beads aufzubrechen.</td></tr>
<tr><td>3.16</td><td>50 µl Perlen pro Probe in 2-ml-Röhrchen aliquotieren (maximal 200 µl Perlen, für 4 Proben, pro Röhrchen).</td></tr>
<tr><td>3.17</td><td>Die Streptavidin Beads waschen:
a. 200 µl Agendia NGS Binding Buffer PRO PROBE in das 2-ml-Röhrchen geben (maximal 800 µl Puffer, für 4 Proben, pro Röhrchen).
b. Die Perlen 5 Sekunden lang auf einem Vortexmischer mischen und kurz zentrifugieren.
c. Die 2,0-ml-Röhrchen für 2 Minuten auf einen Magnetseparator setzen, sodass sich die Lösung klären kann.
d. Den Überstand entnehmen und entsorgen.
e. Schritte a bis d für insgesamt 3 Waschgänge wiederholen.</td></tr>
<tr><td>3.18</td><td>Die Perlen in 200 µl pro Probe Agendia NGS Binding Buffer resuspendieren und in 8-Streifen-PCR-Röhrchen aliquotieren.</td></tr>
</table>

Hybrid-Capture mit Streptavidin Beads

3.19	Während die Proben auf dem Thermocycler auf 65 °C gehalten werden, **29 µl** der **Hybrid-Bibliothek nach 17-24 Stunden** Inkubation in ein 8-Strip-Röhrchen mit **200 µl** gewaschenen Streptavidin Beads geben (gewaschene Streptavidin Beads bei RT aufbewahren).
3.20	Den 8-Röhrchen-Streifen schließen und durch Umdrehen und anschließendes schnelles Drehen mischen.

3.21	Die Probe auf dem Thermomixer bei 27 °C und 1.400 U/min für 30 Minuten inkubieren. **Anmerkung:** Die Perlen nach 5 Minuten auf Verklumpung kontrollieren. Wenn sich Verklumpungen gebildet haben, das Röhrchen schnell vortexen. Nach der 30-minütigen Inkubation den Thermomixer auf 65 °C einstellen.
3.22	Röhrchen kurz zentrifugieren.
3.23	Die Platte 2 Minuten lang auf einen Magnetseparator legen, um die Perlen aus der Suspension zu sammeln.
3.24	Den Überstand entnehmen und entsorgen.
3.25	Die Perlen in **200 µl *Agendia NGS Wash Buffer 1*** durch 5 Sekunden langes Mischen auf einem Vortexmischer resuspendieren.
3.26	Die Proben für 15 Minuten bei RT inkubieren.
3.27	Die Perlen und den Puffer 2 Minuten lang in einem Magnetseparator trennen und den Überstand entnehmen.
3.28	Die Perlen mit ***Agendia NGS Wash Buffer 2*** waschen: a. Die Perlen in **200 µl** des auf 65 °C vorgewärmten Agendia NGS-Waschbuffers 2 resuspendieren. b. Die Röhrchen verschließen und 5 Sekunden lang auf einem Vortexmischer mischen, um die Perlen zu resuspendieren. Kurz abzentrifugieren. c. Die Röhrchen 10 Minuten lang bei 65 °C und 1.200 U/min auf einem Thermoshaker inkubieren. d. Wenn sich die Perlen setzen, die Röhrchen gelegentlich umdrehen, um sie zu mischen. e. Die Röhrchen kurz in einer Zentrifuge oder Mini-Plattenzentrifuge schleudern. f. Die Röhrchen für 2 Minuten auf einen Magnetseparator setzen. g. Den Überstand entnehmen und entsorgen. h. Schritte a bis g für insgesamt 3 Waschgänge wiederholen.
3.29	Die Perlen in **31,5 µl *Agendia NGS Elutionsbuffer*** für **5 Sekunden** vortexen, um die Perlen zu resuspendieren. Kurz abzentrifugieren.
3.30	Die Proben für 10 Minuten bei RT inkubieren.
3.31	Die Perlen und den Puffer 2 Minuten lang in einem Magnetseparator trennen.
3.32	**30 µl** Überstand in eine neue Platte überführen. Die Perlen entsorgen.
3.33	**30 µl *Agendia NGS Neutralization Buffer*** zu der hergestellten cDNA-Bibliothek geben.

Aufreinigung der hergestellten Bibliothek mit AMPure XP Beads	
3.34	***AMPure XP Beads*** mindestens 30 Minuten lang auf Raumtemperatur kommen lassen. Vortexen, bis die Perlensuspension homogen ist. Wenn mit der „**Amplifikation der hergestellten Bibliotheken zum Hinzufügen von Index-Tags**“ fortgefahren wird, ***Agendia NGS PCR Master Mix***, ***Agendia NGS Post-Capture PCR Primer*** und die ***Agendia NGS 8bp Index Plate*** auftauen und in Eis legen.
3.35	**108 µl** homogene Perlensuspension in jede Vertiefung einer neuen 0,8-mL-MIDI-Platte mit 96 Vertiefungen geben.
3.36	Die **60 µl** Probenmischung aus Schritt 3.33 hinzufügen.
3.37	Die Platte verschließen, vortexen und kurz zentrifugieren.
3.38	Proben für 5 Minuten bei RT inkubieren.
3.39	Die Platte mindestens 5 Minuten lang bei RT auf ein Magnetstativ legen.

3.40	Während die Platte auf dem Magnetstativ liegt, vorsichtig die gereinigte Lösung aus jeder Vertiefung entnehmen und entsorgen. Die Perlen beim Entfernen der Lösung nicht berühren.
3.41	Während die Platte auf dem Magnetstativ liegt, **200 µl** frisches 70%iges Ethanol in jede Vertiefung geben.
3.42	10 Sekunden (oder bis die Lösung klar ist) warten, damit sich alle vermischten Perlen setzen können, und daraufhin das Ethanol vorsichtig entnehmen.
3.43	Diesen Vorgang für insgesamt 2 Waschgänge wiederholen.
3.44	Falls erforderlich, die MIDI-Platte kurz zentrifugieren, die Platte wieder auf das Magnetstativ legen und dann die restlichen Ethanoltropfen mit einer Pipette entnehmen.
3.45	Die Proben 3 Minuten lang bei 37 °C auf dem Heizblock trocknen. Die Proben nicht übertrocknen, aber sicherstellen, dass das gesamte Ethanol entfernt wird.
3.46	**36 µl** nuklease-freies Wasser in jede Probenvertiefung geben.
3.47	Die Platte verschließen, gründlich vortexen und kurz zentrifugieren, um die Flüssigkeit aufzufangen.
3.48	Für 2 Minuten bei RT inkubieren.
3.49	Die MIDI-Platte auf das Magnetstativ legen und 5 Minuten lang – oder bis die Lösung klar ist – inkubieren.
3.50	**35 µl** des gereinigten Überstandes entnehmen und in eine neue 0,2-mL-Platte mit 96 Vertiefungen oder in neue Röhrchen geben.
Haltepunkt: Wenn nicht mit dem nächsten Schritt fortgefahren wird, die Platte verschließen und zwischen –15 °C und –25 °C lagern.	

Amplifikation der hergestellten Bibliotheken, um Index-Tags hinzuzufügen

3.51

Agendia NGS PCR Master Mix, ***Agendia NGS Post-Capture PCR Primer*** und die ***Agendia NGS 8bp Index Plate*** auftauen und in Eis legen.
Anmerkung: Den zähflüssigen ***Agendia NGS PCR Master Mix*** vor dem Hinzufügen von PCR-Primer **30 Sekunden** lang vortexen.

Den ***Post-Capture PCR Mix*** gemäß der **folgenden Tabelle** in einem 1,5-ml-Gefäß in Eis vorbereiten.

Reagenzien	**Volumen pro Reaktion**
Agendia NGS PCR Master Mix	25 µl
Agendia NGS Post-Capture PCR Primer	1 µL
Gesamtvolumen	**26 µl**

Die Mischung vorsichtig vortexen und drehen. Auf Eis halten.

3.52	Für jede zu amplifizierende Probe **26 µl** des ***Post-Capture PCR Mix*** in eine PCR-Plattenvertiefung geben.
3.53	5 µl des entsprechenden ***Indexierungsprimers*** (von der ***Agendia NGS 8bp Index Plate***) in jede Vertiefung mit dem Post-Capture PCR Mix geben. **Für jede zu sequenzierende Probe in derselben Bahn einen anderen Indizierungsprimer verwenden.**
3.54	**19 µl** der gereinigten Bibliothek aus Schritt 3.50 in jede Vertiefung mit dem ***Post-Capture PCR Mix*** geben. Durch 10-maliges Auf- und Abpipettieren mischen. Die Platte kurz zentrifugieren.
3.55	Die PCR-Platte in einen Thermocycler legen. Das folgende Thermocycler-Programm ausführen: **Deckel auf 105 °C erhitzt** 1. 2 Minuten auf 95 °C 2. 30 Sekunden auf 95 °C

	3. 30 Sekunden auf 57 °C 4. 1 Minute auf 72 °C 5. Die Schritte 2-4 für insgesamt 12 Zyklen wiederholen. 6. 5 Minuten auf 72 °C 7. Halten auf 4 °C

Aufreinigung der amplifizierten hergestellten Bibliothek mit AMPure XP Beads.	
3.56	***AMPure XP Beads*** mindestens 30 Minuten lang auf Raumtemperatur kommen lassen. Vortexen, bis die Perlensuspension homogen ist.
3.57	**90 µl** homogene Perlensuspension in jede Vertiefung einer neuen 0,8-mL-MIDI-Platte mit 96 Vertiefungen geben.
3.58	**50 µl** der Probenmischung in die jeweilige Vertiefung der 0,8-mL-MIDI-Platte mit 96 Vertiefungen füllen.
3.59	Die Platte verschließen, vortexen und kurz zentrifugieren.
3.60	Proben für 5 Minuten bei RT inkubieren.
3.61	Die Platte mindestens 5 Minuten lang bei RT auf ein Magnetstativ legen.
3.62	Während die Platte auf dem Magnetstativ liegt, vorsichtig die gereinigte Lösung aus jeder Vertiefung entnehmen und entsorgen. Die Perlen beim Entfernen der Lösung nicht berühren.
3.63	Während die Platte auf dem Magnetstativ liegt, **200 µl** frisches 70%iges Ethanol in jede Vertiefung geben.
3.64	10 Sekunden (oder bis die Lösung klar ist) warten, damit sich alle vermischten Perlen setzen können, und daraufhin das Ethanol vorsichtig entnehmen.
3.65	Diesen Vorgang für insgesamt 2 Waschgänge wiederholen.
3.66	Falls erforderlich, die MIDI-Platte kurz zentrifugieren, die Platte wieder auf das Magnetstativ legen und die restlichen Ethanoltropfen mit einer Pipette entnehmen.
3.67	Die Proben 3 Minuten lang bei 37 °C auf dem Heizblock trocknen. Die Proben nicht übertrocknen, aber sicherstellen, dass das gesamte Ethanol entfernt wird.
3.68	**22,5 µl *Elutionsbuffer EB*** in jede Probenvertiefung geben.
3.69	Die Platte verschließen, gründlich vortexen und kurz zentrifugieren, um die Flüssigkeit aufzufangen.
3.70	Für 2 Minuten bei RT inkubieren.
3.71	Die MIDI-Platte auf das Magnetstativ legen und 5 Minuten lang – oder bis die Lösung klar ist – inkubieren.
3.72	**21 µl** des gereinigten Überstandes entnehmen und in eine neue-Platte mit 96 Vertiefungen oder in neue Röhrchen geben.
Haltepunkt: Wenn nicht mit dem nächsten Schritt fortgefahren wird, die Platte verschließen und die **21 µl** der **indexierten** Bibliotheken zwischen –15 °C und –25 °C lagern.	

QC 3: Qualitätsbewertung von amplifizierten, zielangereicherten, indizierten Bibliotheken

Die Größenverteilung jeder amplifizierten, hergestellten, indizierten Bibliothek mit einer geeigneten Nukleinsäurefragment-Analyseplattform bestätigen. Die Fragmentgrößenverteilung sollte 150-700 bp betragen. Im Hinblick auf eine genaue Quantifizierung ist darauf zu achten, dass die Konzentration innerhalb des linearen Bereichs des Assays liegt (5-500 pg/µl).

Stoffmengenkonzentration [pmol/L]	**Konzentrationszielwert [nM]**
≥ 4000	4
2000-3999	2

1000-1999	1
<1000	Nicht ausführen, Probe fehlgeschlagen

4. Schritt: Agendia NGS MiSeq Laden

<table>
<tr><td colspan="2">Vorbereitung des Probenblattes</td></tr>
<tr><td>4.1</td><td>
Das MiSeq-Probenblatt gemäß den nachstehenden Anweisungen im CSV-Format (kommagetrennt) vorbereiten.
Es handelt sich um ein 150 bp Single-Ended-Protokoll.
Für allgemeine Anweisungen siehe bitte die Referenzanleitung von Illumina:
https://support.illumina.com/downloads/miseq_sample_sheet_quick_reference_guide_15028392.html
Ein Beispiel für ein MiSeq-Probenblatt finden Sie hier: https://diagnostic-products.agendia.com/resources/
Unter [Überschrift]
<table>
<tr><td>Name des Untersuchers</td><td>Erforderlich, vom Benutzer auszufüllen</td></tr>
<tr><td>Projektname</td><td>Erforderlich, vom Benutzer auszufüllen</td></tr>
<tr><td>Name des Experiments</td><td>Erforderlich, vom Benutzer auszufüllen</td></tr>
<tr><td>Datum</td><td>Erforderlich</td></tr>
<tr><td>Arbeitsablauf</td><td>Erforderlich [GenerateFASTQ]</td></tr>
<tr><td>Assay</td><td>Erforderlich [SureSelect]</td></tr>
<tr><td>Chemie</td><td>Erforderlich [Standard]</td></tr>
</table>
Unter [Reads]: 150
Unter [Einstellungen]
<table>
<tr><td>OnlyGenerateFASTQ</td><td>1</td></tr>
<tr><td>FilterPCRDuplicates</td><td>0</td></tr>
</table>
Unter [Daten]:
<table>
<tr><th>Proben-ID</th><th>Name der Probe</th><th>Probenplatte</th><th>Probenvertiefung</th><th>Probenprojekt</th><th>Index</th><th>I7_Index_ID</th></tr>
<tr><td>Erforderlich, vom Benutzer auszufüllen</td><td>Optional</td><td>Optional</td><td>Optional</td><td>Optional</td><td>Erforderlich [Index-Sequenz]</td><td>Optional</td></tr>
</table>
Anmerkung: Jede Probe muss eine eindeutige "Proben-ID" haben; der „Name der Probe“ fließt in die FASTQ-Dateinamen ein
Blatt speichern. Die Software fordert den Benutzer auf, das Probenblatt hochzuladen.
</td></tr>
<tr><td>4.2</td><td>Die Reagenzienkartusche gemäß den Empfehlungen von Illumina vorbereiten.</td></tr>
<tr><td colspan="2">Poolen der endgültigen Bibliotheken für die Multiplex-Sequenzierung</td></tr>
<tr><td>4.3</td><td>Das verwendete Sequenzierungsprotokoll(1 nM, 2 nM oder 4 nM) hängt von den Proben auf dem vorbereiteten Probenblatt ab. Jede Probe einzeln auf die Zielkonzentration verdünnen (d. h. 1 nM, 2 nM oder 4 nM). Wenn Proben mit unterschiedlichen Zielkonzentrationen in einem MiSeq-Lauf kombiniert werden müssen, alle Proben auf die niedrigste gemeinsame Zielkonzentration verdünnen und dann poolen.</td></tr>
<tr><td>4.4</td><td>5 µl von jeder normalisierten Probe in ein einzelnes 1,5-ml-Röhrchen geben.</td></tr>
<tr><td>4.5</td><td>Vortexen, kurz zentrifugieren und in Eis legen.</td></tr>
</table>

Denaturierung der gepoolten cDNA-Bibliothek

4.6 Ein frisches Röhrchen mit 0,2 N NaOH vorbereiten (0,2 N NaOH ist maximal 12 Stunden lang stabil)
Die gepoolte Bibliothek aus Schritt 4.5 entsprechend dem verwendeten Sequenzierungsprotokoll denaturieren:

	1 nM	**2 nM**	**4 nM**
Gepoolte Bibliothek	10 µL	5 µL	5 µL
0,2 N NaOH	10 µL	5 µL	5 µL

4.7 Zum Mischen kurz vortexen und bei 280 × g 1 Minute lang bei RT zentrifugieren.

4.8 5 Minuten bei RT inkubieren.

Verdünnung der denaturierten cDNA-Bibliothek

4.9 Die denaturierte cDNA-Bibliothek aus Schritt 4.8 mit vorgekühltem HT1-Puffer entsprechend dem verwendeten Sequenzierungsprotokoll verdünnen:
Anmerkung: HT1-Puffer zum Mischen invertieren.

	1 nM	**2 nM**	**4 nM**
Denaturierte cDNA-Bibliothek	20 µL	10 µL	10 µL
HT1	480 µL	490 µL	990 µL
Konzentration	20 pM	20 pM	20 pM

4.10 Zum Mischen mehrmals umdrehen, kurz zentrifugieren und auf Eis stellen.

4.11 Die denaturierte verdünnte Bibliothek aus Schritt 4.10 in einem neuen 1,5-mL-Röhrchen gemäß dem Sequenzierungsprotokoll weiter verdünnen, um die gewünschte endgültige Eingangskonzentration zu erhalten.

	1 nM	**2 nM**	**4 nM**
Denaturierte DNA	500 µL	500 µL	450 µL
HT1	167 µL	167 µL	150 µL
Endkonzentration:	15 pM	15 pM	15 pM

4.12 Zum Mischen mehrmals umdrehen und anschließend pulsierend zentrifugieren. Bis zum Einlegen in die MiSeq-Reagenzienkartusche in Eis legen.

Zusammenfügung von Probenbibliothek und PhiX Control (optional)

4.13 20 pM PhiX gemäß dem MiSeq-Protokoll von Illumina vorbereiten oder 20 pM PhiX-Bibliothek (falls zuvor vorbereitet) auf Eis auftauen. Zum Mischen umdrehen und kurz zentrifugieren.

4.14 Die folgenden Volumina von PhiX Control und Probenbibliothek aus Schritt 4.12 in einem 1,5-ml-Röhrchen zusammenfügen:

a. **6 µl** Denaturierte, verdünnte 20 pM PhiX-Bibliothek
b. **594 µl** Denaturierte, verdünnte Probenbibliothek (wenn kein PhiX hinzugefügt wird, **600 µl** denaturierte, verdünnte Probenbibliothek hinzufügen)

4.15 Zum Mischen mehrmals umdrehen und pulsierend zentrifugieren. Bis zum Einlegen in die MiSeq-Reagenzienkartusche in Eis beiseite legen.

Sequenzieren mit MiSeq

4.16 Auf dem Begrüßungsbildschirm der Software-Schnittstelle die Option „Sequenzieren“ wählen, um die Einrichtungsschritte für den Sequenzierungslauf zu starten.

4.17 Bei Verwendung von Windows 7:

a. Im Bildschirm „Load Reagents“ (Reagenzien laden) den Befehl „Change Sample Sheet“ (Probenblatt wechseln) wählen, um die Software auf das entsprechende Probenblatt zu verweisen.

	b. „Suchen“ wählen, um zu dem Probenblatt zu navigieren, und „Öffnen“ wählen. c. „Speichern und fortfahren“ wählen und „Weiter“ wählen, um die Laufparameter zu überprüfen. d. Mit dem Laden von MiSeq fortfahren.
4.18	Bei Verwendung von Windows 10: a. Unter dem Menüpunkt „Run Setup“ den Menüpunkt „Sample Sheet” auswählen. b. [*Optional*] BaseSpace aktivieren: „BaseSpace™ Sequence Hub für diesen Lauf verwenden“ wählen und zum Verwenden anmelden. c. Andernfalls „Weiter“ wählen und Ihre Probenblattdatei (.csv) auswählen. Die Datei wird zur Validierung oder zum Erstellen eines Laufs an den Local Run Manager gesendet. d. [Optional] „Sekundäranalyse mit Local Run Manager deaktivieren“ wählen, um die Sekundäranalyse mit dem Local Run Manager zu umgehen. e. Gegebenenfalls Fehler im Probenblatt berichtigen. f. „Weiter“ wählen und mit dem Laden der Durchflusszelle fortfahren.
4.19	Mit der Sequenzierung gemäß dem MiSeq-Sequenzierungsprotokoll von Illumina fortfahren, um FASTQ-Dateien zu erstellen. Für weitere Anleitungen zum MiSeq-System siehe die Systemanleitung von Illumina: https://support.illumina.com/sequencing/sequencing_instruments/miseq/documentation.html

5. Schritt: Analyse von FASTQ-Dateien mit ADAPT

Die vom MiSeq-Sequenzer erstellten FASTQ-Dateien werden vom Agendia Data Analysis Pipeline Tool (ADAPT) verarbeitet, einer leistungsstarken und sicherheitskonformen Cloud-basierten Genomanalyse-Plattform. ADAPT ist für die Verwendung in Kombination mit dem MammaPrint® BluePrint®-Kit zur Erkennung des Rezidivrisikos und molekularen Subtypisierung bei Patientinnen mit Mammakarzinom (MammaPrint BluePrint-Kit) vorgesehen. ADAPT liefert integrierte Analysen und Ergebnisberichte für Proben, die mit dem MammaPrint BluePrint NGS-Kit verarbeitet wurden.

Das Benutzerhandbuch für ADAPT-CE (EM-002) enthält schrittweise Anleitungen, u. a. zur Erstellung eines Kontos, zur Installation eines sicheren File Connector, zum Hochladen und Analysieren anonymisierter Patientendaten in einer sicheren Umgebung und zum Abrufen von Testergebnissen.

ADAPT ist ein sicheres, Cloud-basiertes System und ist über die unten aufgeführten Browser zugänglich.

Browser	Unterstützte Version	Betriebssystem
Google, Chrome & Mozilla Firefox	Neueste stabile Version von	Windows, Mac und Linux

Vor dem Beginn alle Anweisungen im Benutzerleitfaden zu ADAPT-CE (EM-002) lesen. Wenn Sie nach dem Lesen dieser Anleitung noch Fragen haben, wenden Sie sich bitte an den Agendia-Produktsupport (NGS.support@agendia.com).

Ergebnisse

Der Nutzer erhält zwei Dokumente pro Probe – den Technischen Bericht und die Erläuterung der Ergebnisse. Der Technische Bericht enthält Informationen über die Probe und die ADAPT-Verarbeitung, einschließlich Informationen zur Qualitätskontrolle, und die Ergebnisse des MammaPrint BluePrint NGS-Kits, die den MammaPrint Index (MPI), die Bestimmung des Rezidivrisikos (hohes Risiko oder geringes Risiko) und das BluePrint-Ergebnis (Luminal-Typ, HER2-Typ oder Basal-Typ) umfassen. Ausführlichere Informationen sind im Abschnitt „Interpretation der Ergebnisse“ zu finden. Die Erläuterung der Ergebnisse erklärt die Testergebnisse im Zusammenhang mit den veröffentlichten klinischen Daten.

Interpretation der Ergebnisse

Ein Testergebnis gilt nur dann als gültig, wenn im Feld Gesamtbewertung des Technischen Berichts „Bestanden“ steht. Wenn eines der Qualitätskriterien nicht erfüllt ist, wird die Gesamtbewertung als „Nicht bestanden“ angezeigt. Wenn die Gesamtbeurteilung „Nicht bestanden“ lautet, erscheint im Technischen Bericht im Abschnitt „Prüfergebnisse“ der Hinweis „Für diese Probe kann kein Ergebnis vorgelegt werden“ und wird das Dokument „Erläuterung der Ergebnisse“ nicht erstellt. Das Testlabor kann sich dafür entscheiden, die Probe erneut zu testen, um zu sehen, ob das nachfolgende Resultat ein gültiges Testergebnis ergibt.

MammaPrint

Das MammaPrint-Ergebnis wird als binäres Ergebnis angegeben und kann für das Rezidivrisiko „Niedriges Risiko“ oder „Hohes Risiko“ lauten. Das prognostische Profil (geringes Risiko, hohes Risiko) der Probe wird durch Berechnung des MPI auf einer Skala von -1,000 bis +1,000 (MammaPrint FFPE-Berichtsbereich, Abbildung 2) bestimmt. Ergebnisse mit hohem Risiko haben einen MammaPrint-Index (MPI) von 0,000 oder darunter, während Ergebnisse mit niedrigem Risiko einen MPI von über 0,000 haben. Fällt der MPI in einen vordefinierten Bereich um die Klassifizierungsgrenze zwischen -0,058 und +0,058, beträgt die Klassifizierungsgenauigkeit weniger als 90 %.

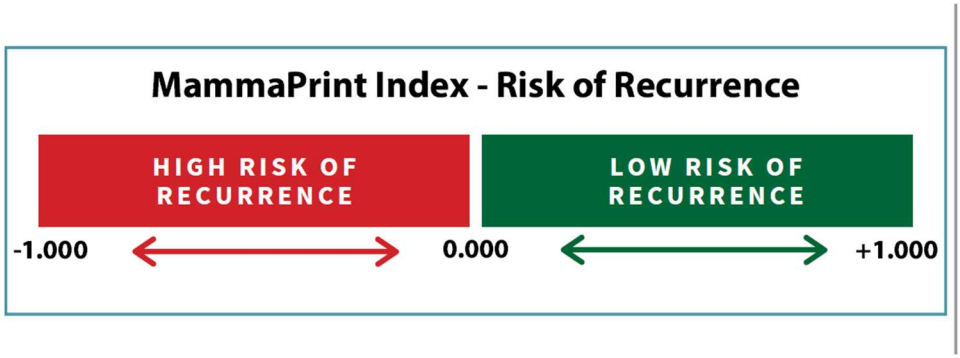

Abbildung 2: MammaPrint Index

BluePrint

BluePrint ist ein Test, der den molekularen Subtyp des Mammakarzinoms anhand des mRNA-Spiegels von 80 Genen mit dem größten Differenzierungsvermögen in einen der folgenden drei Subtypen einordnet: Luminal-Typ, HER2-Typ und Basal-Typ. Jeder dieser Subtypen weist deutliche Unterschiede in Bezug auf das langfristige Ergebnis und das Ansprechen auf eine (neo)-adjuvante Chemotherapie auf [10]. Die Kombination von MammaPrint und BluePrint ermöglicht eine Stratifizierung der Patientinnen in die folgenden Untergruppen: Luminal-Typ/MammaPrint Niedriges Risiko (ähnlich wie Luminal A); Luminal-Typ/MammaPrint Hohes Risiko (ähnlich wie Luminal B); HER2-Typ und Basal-Typ.

Verfahrensgrenzen

- Das MammaPrint BluePrint-Kit zur Erkennung des Rezidivrisikos und molekularen Subtypisierung bei Patientinnen mit Mammakarzinom wurde nur für die Verwendung mit FFPE-Brustkrebstumorgewebe von weiblichen Patienten validiert. Die Prüfung anderer Probentypen oder anderer Konservierungsmethoden wurde nicht evaluiert.
- Das RNeasy FFPE-Kit wurde für die Verwendung in diesem Test validiert. Die Verwendung anderer RNA-Isolierungskits wurde nicht evaluiert.
- Das MammaPrint BluePrint NGS-Kit wurde in Kombination mit Illumina MiSeq V3-Reagenzien für 150 Zyklen validiert. Die Verwendung anderer DNA-Sequenzer oder anderer Reagenzien wurde nicht evaluiert.
- Ein MammaPrint Low-Risk-Ergebnis ist keine Garantie dafür, dass das Mammakarzinom innerhalb von fünf Jahren nicht erneut auftritt. In gleicher Weise ist ein High-Risk-Ergebnis keine Garantie dafür, dass das Mammakarzinom erneut auftritt. Die Testergebnisse sollten in Verbindung mit klinisch-pathologischen Faktoren verwendet werden.
- Die MammaPrint BluePrint NGS-Ergebnisse sind für die Verwendung durch Ärzte vorgesehen und sollten in Verbindung mit anderen klinisch-pathologischen Faktoren interpretiert werden. Der Test ist nicht zur Krankheitsprognose konzipiert.

Erwartete Werte

MammaPrint

Klinische Daten bevölkerungsbasierter Studien haben den klinischen Nutzen des MammaPrint-Tests in der vorgesehenen Anwendungspopulation nachgewiesen. MammaPrint wurde in prospektiven klinischen Studien für den Einsatz bei Brustkrebspatientinnen im Frühstadium (I, II und III) unabhängig vom Östrogenrezeptor- (ER) oder HER2-Status, mit einer Tumorgröße ≤ 5,0 cm und 0-3 positiven Lymphknoten (LN 0-3) ohne besondere Spezifikationen für nodale Mikrometastasen klinisch validiert. In der MINDACT-Studie hat die primäre Analyse gezeigt, dass der Verzicht auf eine Chemotherapie bei Patientinnen mit klinisch hohem Risiko/Genomischem MammaPrint-Low Risk-Ergebnis (C-hoch/G-niedrig) keine nachteiligen Auswirkungen auf das Ergebnis hat. Bei MammaPrint Low Risk-Patientinnen mit 1-3 positiven Lymphknoten wurde nach 5 Jahren kein signifikanter Nutzen einer adjuvanten systemischen Chemotherapie beobachtet [11]. Aus diesen und anderen veröffentlichten Studien [8] [12] [13] [14] [15] [16] [17] [18] hat sich gezeigt, dass der MammaPrint-Test die Vorhersage der klinischen Ergebnisse bei Frauen mit Brustkrebs im Frühstadium verbessert.

BluePrint

Brustkrebsarten des Basal-Typs zeichnen sich durch die Genexpression der Basal-/Myoepithelzellen aus. Krebsarten vom Basalttyp sind in der Regel dreifach negativ für ER, PR und HER2 („basal-like“) und weisen ein spezifisches Genexpressionsprofil auf. Von Hormontherapie und anti-HER2-Therapien, wie Trastuzumab und Lapatinib, wird angenommen, dass sie gegen diese Krebsarten nicht wirksam sind, anders als Chemotherapie, die als hilfreich erachtet wird.

Brustkrebsarten vom Luminal-Typ zeichnen sich durch die Genexpression der luminalen Epithelzellen aus, welche die Milchgänge und Brustdrüsen bedecken. Die Krebsarten vom Luminal-Typ sind in der Regel Hormonrezeptor-positive Tumore und sprechen wahrscheinlich auf eine Hormontherapie an. Bei Patientinnen, die als MammaPrint Low Risk und Luminal-Typ eingestuft werden, ist ein ähnlicher klinischer Verlauf wie bei Luminal-A-Patientinnen zu erwarten, die in der Regel mit einer Hormontherapie behandelt werden, während bei Patientinnen mit MammaPrint High Risk- und Luminal-Typ-Ergebnissen ein ähnlicher klinischer Verlauf wie bei Luminal-B-Patientinnen zu erwarten ist, die in der Regel von einer aggressiveren Behandlung profitieren, die auch eine Chemotherapie umfassen kann.

Mammakarzinome vom HER2-Typ zeichnen sich durch eine Amplifikation oder Überexpression des HER2-Lokus aus und sind typischerweise in einer IHC- oder FISH-Analyse HER2-positiv (HER2/neu-positiv). Diese Krebsarten neigen dazu, schneller zu wachsen, und können wiederkehren, obwohl sie oft mit Anti-HER2-Therapien behandelt werden können.

Leistungsmerkmale

Zur Abschätzung der Präzision, Reproduzierbarkeit und laborübergreifenden Reproduzierbarkeit des MammaPrint BluePrint-Kit zur Erkennung des Rezidivrisikos und molekularen Subtypisierung wurden analytische und klinische Validierungsstudien durchgeführt, deren Ergebnisse im Folgenden vorgestellt werden.

MammaPrint

Analytische Leistung

Die Übereinstimmung zwischen dem MammaPrint-Test mit NGS und dem derzeit im Handel befindlichen MammaPrint FFPE mit Microarray-Technologie wurde anhand von RNA aus 85 FFPE-Proben bewertet. Alle Tests wurden im Labor von Agendia in Amsterdam, Niederlande, durchgeführt. Die Leistungsfähigkeit des Tests wurde durch Berechnung der positiven prozentualen Übereinstimmung (PPA), der negativen prozentualen Übereinstimmung (NPA) und der Gesamtübereinstimmung zwischen den beiden Tests ermittelt. Die PPA-, NPA- und Gesamtkonkordanz betrug 100 %, 94 % bzw. 98 %.

Die Reproduzierbarkeit des MammaPrint-Tests mit NGS wurde im Laufe der Zeit anhand von RNA bewertet, die aus drei FFPE-Gewebeproben isoliert wurde, die beide MammaPrint-Risikokategorien (MammaPrint High Risk und Low Risk) repräsentierten. Die Proben wurden mehrmals an verschiedenen Tagen von mehreren Mitarbeitern in den Agendia-Labors in Amsterdam, Niederlande, und Irvine, Kalifornien, USA, analysiert. Pro Tag wurde ein einziger Lauf durchgeführt: Bei Probe 1 wurden 25 Messungen durchgeführt, bei Probe 2 waren es 17 und bei Probe 3 14 Messungen. Die durchschnittliche relative Reproduzierbarkeit auf der Grundlage des MammaPrint-Index lag bei 98 %.

Die Reproduzierbarkeit wurde zwischen zwei Isolierungen von RNA aus derselben FFPE-Gewebeprobe (insgesamt 43 Proben) bewertet. Die beiden Isolierungen der 43 Gewebeproben wurden am selben Tag im Labor von Agendia in Amsterdam (Niederlande) analysiert. Die Übereinstimmung der MammaPrint-Ergebnisse zwischen der ersten und der zweiten Isolierung mit diesen 43 Proben betrug 98 %.

Die laborübergreifende Reproduzierbarkeit wurde an zwei externen europäischen Standorten und im Labor von Agendia in Amsterdam, Niederlande, bewertet. Insgesamt wurde die aus 16 FFPE-Proben isolierte RNA zur Untersuchung an die drei Standorte versandt. Die 16 Proben wurden auf mindestens zwei Laboranten an jedem Standort verteilt. Die laborübergreifende Reproduzierbarkeit wurde zwischen den beiden externen Standorten und Agendia ermittelt. Die Gesamtkonkordanz betrug 100 %.

Es wurden mehrere Substanzen untersucht, um eine mögliche Beeinflussung der Testergebnisse des MammaPrint- und BluePrint-NGS-Kits festzustellen (z. B. gDNA, Prot. K, Actinomicyn D, Ethanol und Natriumhydroxid). Keine der getesteten Substanzen hatte Einfluss auf die Testergebnisse von MammaPrint und BluePrint.

Die Nachweisgrenze (LoD) wurde am Post-Capture-Material bestimmt, wobei mit MiSeq unterschiedliche Stoffmengenkonzentrationen gemessen wurden, was zu einer LoD von 0,4 nM führte. Der Schwellenwert für die Stoffmengenkonzentration des erfassten Materials liegt bei 1,0 nM und damit deutlich über der LoD.

Klinische Leistung

Der MammaPrint-Test mit den klinischen NGS-Leistungsmerkmalen wurde anhand einer Studienkohorte von 316 FFPE-Brusttumorgewebeproben bewertet, die zwischen 2004 und 2006 retrospektiv von Brustkrebspatientinnen mit einer Erkrankung im Stadium I oder II, einer Tumorgröße $\leq$ 5,0 cm und Lymphknoten negativ oder 1-3 Lymphknoten positiv gesammelt und archiviert worden waren. Um die klinische Leistung des MammaPrint-Tests zu unterstützen, wurden die 316 Proben mit 5-Jahres-Ergebnisdaten für das Fernrezidiv-freie Intervall (DRFI) ausgewertet, d. h. der Zeit bis zur Diagnose einer Fernmetastasierung oder des Todes durch Brustkrebs. Wie erwartet, zeigten diese Daten einen signifikanten Unterschied zwischen den MammaPrint-Gruppen mit hohem und niedrigem Risiko für das 5-Jahres-DRFI (LogRank p = 0,002). Wichtig ist, dass die klinische Leistung des MammaPrint-Tests mit NGS sowohl für Hoch- als auch für Niedrigrisikogruppen in dieser Studienkohorte mit der Leistung des derzeit im Handel befindlichen MammaPrint FFPE mit Microarray-Technologie statistisch gleichwertig war (Hochrisiko p=0,83, Niedrigrisiko p=0,44).

Schließlich wurde eine Korrelationsstudie im Feld an zwei unabhängigen europäischen Feldstandorten durchgeführt. Von 95 Patientinnen der vorgesehenen Anwendungspopulation (d. h. Erkrankung im Stadium I oder II, Tumorgröße $\leq$ 5,0 cm und Lymphknoten negativ oder 1-3 Lymphknoten positiv) wurden prospektiv Brustkrebsproben gesammelt. Diese Proben wurden vor Ort mit dem MammaPrint-Test mit NGS verarbeitet und ein Teil des Gewebes wurde an das Labor von Agendia in Amsterdam, Niederlande, geschickt, um dort mit dem MammaPrint-Test mit NGS sowie mit dem derzeit im Handel befindlichen MammaPrint FFPE mit Microarray-Technologie getestet zu werden. Die Leistung des Tests wurde durch den Vergleich der NGS-Ergebnisse des MammaPrint-Tests, die vor Ort erzielt wurden, mit den NGS-Ergebnissen des MammaPrint-Tests und den MammaPrint FFPE-Ergebnissen bei Agendia bewertet. Die Konkordanz zwischen dem MammaPrint-Test mit NGS, der im Feld durchgeführt worden war, und dem MammaPrint-Test mit NGS, der bei Agendia auf der Grundlage von 86 Proben durchgeführt worden war, betrug 93 %. Vergleichbar betrug die Konkordanz zwischen dem MammaPrint-Test mit NGS, der im Feld durchgeführt worden war, und dem MammaPrint FFPE mit Microarray, der bei Agendia durchgeführt worden war, 91 %.

BluePrint

Analytische Leistung

Die Konkordanz zwischen dem BluePrint-Test mit NGS und dem derzeit im Handel befindlichen BluePrint FFPE mit Microarray-Technologie wurde anhand von 98 FFPE-RNA-Proben bewertet. Alle Tests wurden im Labor von Agendia in Amsterdam, Niederlande, durchgeführt. Die Leistung des Tests wurde durch Berechnung der Gesamtkonkordanz zwischen den beiden Tests ermittelt, die 100 % betrug. Ein weiterer Vergleich wurde zwischen den BluePrint-Ergebnissen der NGS- und Microarray-Plattformen anhand von

316 Proben durchgeführt. Auf der Grundlage dieses Vergleichs lag die Übereinstimmung insgesamt bei 98 %, die Übereinstimmung für die Subtypen Luminal, Her2 und Basal separat betrug 100 %, 75 % bzw. 96 %.

Die Reproduzierbarkeit des BluePrint-Tests mit NGS wurde im Laufe der Zeit anhand von RNA bewertet, die aus drei FFPE-Gewebeproben isoliert wurde, die die verschiedenen BluePrint-Ergebniskategorien repräsentierten: Luminal-Typ, HER2-Typ, Basal-Typ. Die Proben wurden mehrmals an verschiedenen Tagen von mehreren Mitarbeitern in den Agendia-Labors in Amsterdam, Niederlande, und Irvine, Kalifornien, USA, analysiert. Pro Tag wurde ein einziger Lauf durchgeführt: Bei Probe 1 wurden 25 Messungen durchgeführt, bei Probe 2 waren es 17 und bei Probe 3 14 Messungen. Die durchschnittliche relative Reproduzierbarkeit des BluePrint-Index für den Luminal-Typ lag bei 98 %, für den HER2-Typ bei 98 % und für den Basal-Typ bei 98 %.

Die Reproduzierbarkeit wurde zwischen zwei Isolierungen von RNA aus demselben FFPE-Gewebe (insgesamt 43 Proben) bewertet. Die beiden Isolierungen der 43 Gewebeproben wurden noch am selben Tag mit dem BluePrint-Test mit NGS analysiert. Die Konkordanz zwischen der ersten und der zweiten Isolierung von diesen 43 Proben betrug 100 %.

Die laborübergreifende Reproduzierbarkeit wurde an zwei externen europäischen Standorten und im Labor von Agendia in Amsterdam, Niederlande, bewertet. Aus 16 FFPE-Proben isolierte RNA wurde zur Untersuchung an die drei Standorte versandt. Die 16 Proben wurden auf mindestens zwei Laboranten an jedem Standort verteilt. Die laborübergreifende Reproduzierbarkeit wurde zwischen den beiden externen Standorten und Agendia ermittelt. Die Gesamtkonkordanz betrug 100 %.

Klinische Leistung

An zwei unabhängigen europäischen Feldstandorten wurde eine Korrelationsstudie im Feld durchgeführt. Von 95 Patientinnen der vorgesehenen Anwendungspopulation (d. h. Erkrankung im Stadium I oder II, Tumorgröße $\leq$ 5,0 cm und Lymphknoten negativ oder 1-3 Lymphknoten positiv) wurden prospektiv Brustkrebsproben gesammelt. Diese Proben wurden vor Ort mit dem BluePrint-Test mit NGS verarbeitet und ein Teil des Gewebes wurde an das Agendia-Labor
in Amsterdam, Niederlande, geschickt, um mit dem BluePrint-Tests mit NGS sowie dem derzeit im Handel befindlichen BluePrint FFPE mit Microarray-Technologie getestet zu werden. Die Leistung des Tests wurde durch den Vergleich der NGS-Ergebnisse des BluePrint-Tests, die vor Ort erzielt wurden, mit den NGS-Ergebnissen des BluePrint-Tests und BluePrint FFPE-Ergebnissen bei Agendia bewertet. Die Konkordanz zwischen dem BluePrint-Test mit NGS, der im Feld durchgeführt worden war, und dem BluePrint-Test mit NGS, der bei Agendia auf der Grundlage von 86 Proben durchgeführt worden war, betrug 100 %. Vergleichbar betrug die Konkordanz zwischen dem BluePrint-Test mit NGS, der im Feld durchgeführt worden war, und dem BluePrint FFPE mit Microarray, der bei Agendia durchgeführt worden war, 98 %.

Unterstützung

Im Falle von Fragen zur Verwendung dieses Produkts wenden Sie sich bitte an den Kundendienst von Agendia NGS. Sie erreichen ihn per E-Mail an NGS.support@agendia.com oder telefonisch unter +31 (0) 20 462 1510, montags bis freitags von 08:30 bis 17:00 Uhr (GMT/UTC +1).

Name und Sitz des Unternehmens

Agendia NV

Radarweg 60

1043NT Amsterdam

Niederlande

Telefon: +31 (0)20 462 1510

E-Mail: customerservice@agendia.com

Basic UDI-DI: 085002484193128042

Ausgabedatum

Februar 2025 Version 7

Änderungen gegenüber vorheriger Version

Abschnitt 3 mit Warnungen und Vorsichtsmaßnahmen aktualisiert und „als prognostischer Marker zusammen“ entfernt. MKT-339 v7

Erweiterung der bestimmungsgemäßen Verwendung von MP und BP, Aktualisierungen der Abschnitte Bestimmungsgemäße Verwendung, Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen, Einschränkungen des Verfahrens, UDI hinzugefügt - MKT-339 v6

Zusätzliche Informationen BP ergänzt – MKT-339 v5

Schritt 2.37 korrigiert – MKT-339 v4

Ergänzung Windows 10 – MKT-339 v3

Update der Website – MKT-339 v2

Erstveröffentlichung – MKT-339-v1

Maßnahmenempfehlung:

Melden Sie jeden schwerwiegenden Vorfall im Zusammenhang mit dem MammaPrint und BluePrint NGS Kit & ADAPT dem Hersteller und der zuständigen Behörde des Mitgliedstaates. Der Hersteller meldet die ernsten Störfälle der zuständigen Behörde des Mitgliedstaats, in dem der Benutzer/Patient ansässig ist.

CE 0459

© 2021 Agendia. Alle Rechte vorbehalten.

Agendia®, MammaPrint® und BluePrint® sind Marken von Agendia NV und/oder ihrer Tochtergesellschaft in den USA. Alle anderen Namen und Marken sind das Eigentum ihrer jeweiligen Inhaber.

Die Anweisungen in diesem Dokument müssen von qualifiziertem und entsprechend geschultem Personal strikt befolgt werden, um die ordnungsgemäße und sichere Verwendung des hier beschriebenen Produkts zu gewährleisten. DAS VERSÄUMNIS, DIE HIERIN ENTHALTENEN ANWEISUNGEN VOLLSTÄNDIG ZU LESEN UND AUSDRÜCKLICH ZU BEFOLGEN, KANN ZU SCHÄDEN AM PRODUKT, ZU VERLETZUNGEN VON PERSONEN, EINSCHLIESSLICH VON BENUTZERN ODER ANDEREN, FÜHREN. AGENDIA ÜBERNIMMT KEINERLEI HAFTUNG FÜR DEN UNSACHGEMÄSSEN GEBRAUCH DES BZW. DER HIER BESCHRIEBENEN PRODUKTE (EINSCHLIESSLICH TEILEN DAVON ODER SOFTWARE).

Symbole

Im folgenden Symbolschlüssel finden Sie eine vollständige Liste der Symbole, die auf der Produktverpackung und -kennzeichnung erscheinen können.

Symbol	Titel des Symbols	Beschreibung des Symbols
	Hersteller	Angabe des Herstellers des Medizinprodukts entsprechend der Verordnung (EU) 2017/746
	Verwendbar bis	Angabe des Datums, nach dem das Medizinprodukt nicht mehr verwendet werden darf.
	Chargencode	Angabe der Chargenkennung des Herstellers zur Identifikation der Charge oder Partie.
	Katalognummer	Angabe der Katalognummer des Herstellers zur Identifikation des Medizinprodukts.
	Keiner direkten Sonneneinstrahlung aussetzen	Kennzeichnet ein Medizinprodukt, das vor Lichtquellen geschützt werden muss.
	Temperaturbegrenzung	Angabe des Temperaturbereichs, dem das Medizinprodukt sicher ausgesetzt werden kann.
	Gebrauchsanweisung zu Rate ziehen	Weist darauf hin, dass der Benutzer die Gebrauchsanweisung zu Rate ziehen muss.
	Achtung	Weist darauf hin, dass der Benutzer für wichtige Sicherheitsinformationen, wie Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen, die aus verschiedenen Gründen nicht auf dem Medizinprodukt selbst angegeben werden können, die Gebrauchsanweisung zu Rate ziehen muss.
	In-vitro-Diagnostikum	Kennzeichnet ein Medizinprodukt, das zur Verwendung als In-vitro-Diagnostikum bestimmt ist.
	Nicht verwenden, falls Verpackung beschädigt	Kennzeichnet ein Medizinprodukt, das nicht verwendet werden sollte, wenn die Verpackung beschädigt oder geöffnet wurde
	Enthält ausreichend für Tests	Gibt die Gesamtzahl der IVD-Tests an, die mit dem IVD durchgeführt werden können.
	Augenschutz benutzen	Augenschutz benutzen
	Handschutz benutzen	Handschutz benutzen

	Schutzkleidung benutzen	Schutzkleidung benutzen
	Korrosiv Symbol: Ätzwirkung	Kann gegenüber Metallen korrosiv sein Verursacht schwere Verätzungen der Haut und schwere Augenschäden
	Ernste Gesundheitsgefahr Symbol: Gesundheitsgefahr	Kann bei Verschlucken und Eindringen in die Atemwege tödlich sein Schädigt die Organe Kann die Organe schädigen Kann die Fruchtbarkeit beeinträchtigen oder das Kind im Mutterleib schädigen Kann vermutlich die Fruchtbarkeit beeinträchtigen oder das Kind im Mutterleib schädigen Kann Krebs erzeugen Kann vermutlich Krebs erzeugen Kann genetische Defekte verursachen Kann vermutlich genetische Defekte verursachen Kann bei Einatmen Allergie, asthmaartige Symptome oder Atembeschwerden verursachen

Literaturverzeichnis

[1] J. C. Haan, R. Bhaskaran, A. Ellappalaym, Y. Bijl, C. Griffioen, W. Audeh, F. Penault-Llorca, L. Mittempergher and A. Glas, "MammaPrint and BluePrint comprehensivly capture the cancer hallmarks in early-stage breast cancer patients," *Genes Chromosomes Cancer,* pp. 148-160, 2021.

[2] L. J. van 'Veer, H. Dai, M. J. van de Vijver, Y. D. He, A. A. Hart, M. Mao, H. L. Peterse, K. van der Kooy, M. J. Marton, A. T. Witteveen, G. J. Schreiber, R. M. Kerkhoven and C. Robert, "Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer," *Nature,* vol. 415, pp. 530 - 535, 2002.

[3] M. J. van de Vijver, Y. D. He, L. J. van't Veer, D. Hongyue, A. Hart, D. W. Voskuil, G. J. Schreiber, J. L. Peterse, C. Roberts, M. J. Marton, M. Parrish, D. Atsma, A. Witteveen and A. Glas, "A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer," *The New Englend Journal of Medicine,* vol. 347, no. 25, pp. 1999 - 2009, 19 December 2002.

[4] A. M. Glas, A. Floore, L. J. Delahaye, A. T. witteveen, P. R. C.F., N. L.-D. J. S. Bakx, T. J. Bruinsma, M. O. Warmoes, R. Bernards, L. F. Wessels and L. J. van 't Veer, "Converting a breast cancer microarray signature into a high-throughput diagnostic test," *BMC Genomics,* October 2006.

[5] O. Krijgsman, P. Roepman, W. Zwart, J. S. Caroll, S. Tian, F. A. de Snoo, R. A. Bender, R. Bernards and A. M. Glas, "A diagnostic gene profile for molecular subtyping of breast cancer associated with treatment response," *Breast Cancer Research and Treatment,* vol. 133, no. 1, pp. 37-47, 2012.

[6] S. Mook, M. K. Schmidt, B. Weigelt, B. Kreike, I. Eekhout, M. J. van de Vijver, A. M. Glas, A. Floore, E. J. T. Rutgers and L. J. van 't Veer, "The 70-gene prognosis signature predicts early metastasis in breast cancer patients between 55 and 70 years of age.," *Annals of Oncology,* vol. 21, no. 4, pp. 717-722, 2009.

[7] M. Buyse, L. Sherene, v. '. V. Laura, G. Viale, M. Delorenzi, A. M. Glas, M. Saghastchian d'Assignies, B. Jonas, R. Liderau, P. Ellis, A. Harris, J. Bogaerts, P. Therasse and A. Floore, "Validation and Clinical Utility of a 70-Gene Prognostic Signature for Women with Node-Negative Breast Cancer," *Journal of the Nat. Can. Int.,* vol. 98, no. 17, pp. 1183 - 1192, 6 September 2006.

[8] C. Drukker, J. Bueno-de-Mesquita, V. Retel, W. van Harten, H. van Tinteren, J. Wesseling, R. Roumen, M. Knauer, L. van 't Veer, G. Sonke, E. Rutgers, M. van de Vijver and S. Linn, "A prospective evaluation of a breast cancer prognosis signature in the observational RASTER study," *International Journal of Cancer,* vol. 133, pp. 929 - 936, January 2013.

[9] I. Beumer, A. Witteveen, L. Delahaye, D. Wehkamp, M. Snel, C. Dreezen, J. Zheng, A. Floore, G. Brink, B. Chan, S. Linn, R. Bernards, L. van 't Veer and A. Glas, "Equivalence of MammaPrint array types in clinical trials and diagnostics," *Breast Cancer Research and Treatment,* vol. 156, no. 2, pp. 279-287, 2016.

[10] S. Gluck, F. de Snoo, J. Peeters, L. Stork-Sloots and G. Somlo, "Molecular subtyping of early-stage breast cancer identifies a group of patients who do not benefit from neoadjuvant chemotherapy," *Breast Cancer Research and Treatment,* vol. 139, no. 3, pp. 759-767, 2013.

[11] M. Piccart, L. J. van 't Veer, C. Poncet, J. M. N. Lopes Cardozo, S. Delaloge, J.-Y. Pierga, P. Vuylsteke, E. Brain, S. Vrijaldenhoven, P. A. Neijenhuis, S. Causeret, T. J. Smilde, G. Viale, A. M. Glas, M. Delorenzi, C. Sotiriou, I. T. Rubio, S. Kümmel, G. Zoppoli, A. M. Thompson, E. Matos, K. Zaman, F. Hilbers, D. Fumagalli, P. Ravdin, S. Knox, K. Tryfonidis, A. Peric, B. Meulemans , J. Bogaerts, F. Cardoso and E. J. T. Rutgers, "70-gene signature as an aid for treatment decisions in early breast cancer: updated results of the phase 3 randomised MINDACT trial with an exploratory analysis by age," *Lancet Oncology,* vol. 22, no. 4, pp. 476-488, 2021.

[12] K. Yao, R. Goldschmidt, M. Turk, J. Wesseling, L. Stork-Sloots, F. de Snoo and M. Cristofanilli, "Molecular subtyping improves diagnostic stratification of patients with primary breast cancer into prognostically defined risk groups," *Breast Cancer Research Treatment,* vol. 154, no. 1, pp. 81-8, 2015.

[13] L. Esserman, C. Yau, C. K. Thompson, L. J. van 't Veer, A. D. Borowsky, K. A. Hoadley, N. P. Tobin, B. Nordenskjöld, T. Fornander, O. Stål, C. C. Benz and L. S. Lindström, "Use of Molecular Tools to Identify Patients With Indolent Breast Cancers With Ultralow Risk Over 2 Decades," *JAMA Oncology,* no. doi: 10.1001/jamaoncol.2017.1261, 2017.

[14] S. Mook, M. K. Schmidt, G. Viale, G. Pruneri, I. Eekhout, A. Floore, A. M. Glas, J. Bogaerts, F. Cardoso, M. J. Piccart-Gebhart, E. T. Rutgers, L. J. Van't Veer and T. C. , "The 70-gene prognosis-signature

predicts disease outcome in breast cancer patients with 1-3 positive lymph nodes in an independent validation study," *Breast Cancer Research and Treatment,* vol. 116, no. 2, pp. 295-302, 2009.

[15] L. J. van 't Veer, C. Yau, N. Y. Yu, C. C. Benz, B. Nordenskjöld, T. Fornander, O. Stål, L. J. Esserman and L. S. Lindström, "Tamoxifen therapy benefit for patients with 70-gene signature high and low risk," *Breast Cancer Research and Treatment,* vol. 166, no. 2, pp. 593-601, 2017.

[16] J. M. Bueno-de-Mesquita, W. H. van Harten, V. P. Retel, L. J. van 't Veer, F. Sam van Dam, K. Karsenberg, K. F. Douma, H. van Tinteren, J. L. Peterse, J. Wesseling, T. S. Wu, D. Atsma, E. J. Rutgers, G. Brink, A. N. Floore, A. M. Glas, R. M. Roumen, F. E. Bellot, C. van Krimpen, S. Rodenhuis, M. J. van de Vijver and S. C. Linn, "Use of 70-gene signature to predict prognosis of patients with node-negative breast cancer: a prospective community-based feasibility study (RASTER)," *Lancet Oncology,* vol. 8, no. 12, pp. 1079-1087, 2007.

[17] B. S. Wittner, D. C. Sgroi, P. D. Ryan, T. J. Bruinsma, A. M. Glas, A. Male, S. Dahiya, K. Habin, R. Bernards, D. A. Haber, L. J. Van't Veer and S. Ramaswamy, "Analysis of the MammaPrint breast cancer assay in a predominantly postmenopausal cohort," *Clinical Cancer Research,* vol. 14, no. 10, pp. 2988-93, 2008.

[18] L. J. Delahaye, D. Wehkamp, A. N. Floore, R. Bernards, L. J. van 't Veer and A. M. Glas, "Performance characteristics of the MammaPrint breast cancer diagnostic gene signature," *Personalized Medicine,* vol. 10, no. 8, pp. 801-811, 2013.

Anhang A: Nukleotidsequenzen von MammaPrint BluePrint NGS 8 bp Indizes

Tabelle 1: Nukleotidsequenzen von MammaPrint BluePrint-Kit-Indizes A01 bis H04

Index (Plattenkoordinate)	**Sequenz**
A01	ATGCCTAA
B01	GAATCTGA
C01	AACGTGAT
D01	CACTTCGA
E01	GCCAAGAC
F01	GACTAGTA

G01	ATTGGCTC
H01	GATGAATC
A02	AGCAGGAA
B02	GAGCTGAA
C02	AAACATCG
D02	GAGTTAGC
E02	CGAACTTA
F02	GATAGACA
G02	AAGGACAC
H02	GACAGTGC
A03	ATCATTCC
B03	GCCACATA
C03	ACCACTGT
D03	CTGGCATA
E03	ACCTCCAA
F03	GCGAGTAA
G03	ACTATGCA
H03	CGGATTGC
A04	AACTCACC
B04	GCTAACGA
C04	CAGATCTG
D04	ATCCTGTA
E04	CTGTAGCC
F04	GCTCGGTA
G04	ACACGACC
H04	AGTCACTA