

Aumento della copertura del promotore *TERT* utilizzando TruSight™ Oncology 500 High-Throughput

Una semplice modifica
del protocollo migliora le
prestazioni nelle regioni
ricche di GC

Introduzione

La lunghezza dei telomeri è notoriamente associata a numerose malattie umane, tra cui il cancro. L'enzima telomerasi trascrittasi inversa (TERT, telomerase reverse transcriptase) svolge un ruolo chiave nel mantenimento dei telomeri. Mutazioni all'interno del promotore *TERT* sono state riscontrate in oltre 50 tipi di cancro.¹ In particolare, due mutazioni puntiformi all'interno del promotore *TERT* sono state riscontrate nel 71% dei melanomi^{2,3} e nell'83% dei glioblastomi⁴, rendendo il sequenziamento accurato di questa regione del gene fondamentale per le applicazioni prognostiche. Tuttavia, la regione del promotore *TERT* è ricca di GC e comprende oltre l'80% di basi GC⁵, complicando l'amplificazione e il sequenziamento del DNA.

In questa nota tecnica viene descritta una modifica alla fase di amplificazione arricchita della libreria (EL-PCR) all'interno del protocollo TruSight Oncology 500 High-Throughput che ottimizza l'amplificazione e il successivo sequenziamento delle regioni ricche di GC, come il promotore *TERT*, senza compromettere le prestazioni delle porzioni del genoma non ricche di GC. Risultati simili sono stati dimostrati con TruSight Oncology 500 (dati non mostrati).

Metodi

Protocollo EL-PCR modificato

Durante la preparazione della libreria, le sonde contenenti le sequenze di amplificazione della PCR e gli adattatori di sequenziamento si legano a regioni specifiche del DNA. Queste porzioni di DNA vengono amplificate mediante PCR e purificate prima di essere caricate su una cella a flusso che lega i frammenti utilizzando gli adattatori ligati. Come già osservato in precedenza, le regioni ricche di GC possono essere problematiche per l'amplificazione mediante PCR, con conseguenti rese inferiori e una minore copertura di queste regioni durante il sequenziamento di nuova generazione (NGS, next-generation sequencing). Per risolvere le complessità legate alla ricchezza di GC riscontrate in NGS, gli scienziati Illumina hanno aumentato i tempi di ciclo durante l'amplificazione finale (EL-PCR) delle librerie nel protocollo TruSight Oncology 500 High-Throughput (Tabella 1).

Condizioni sperimentali

Il test delle modifiche ai tempi di ciclo è stato eseguito utilizzando campioni di DNA fissati in formalina e inclusi in paraffina (FFPE, formalin-fixed paraffin-embedded) positivi per il cancro della vescica o della tiroide e un campione di controllo della linea cellulare SeraCare.

Tabella 1: confronto tra i protocolli EL-PCR standard e modificati

Fase	Temperatura (°C)	Durata standard	Durata modificata	Numero di cicli
Denaturazione	98 °C	30 s	30 s	1
Esecuzione di cicli	98 °C	10 s	30 s	18
	60 °C	30 s	30 s	
	72 °C	30 s	60 s	
Estensione	72 °C	5 min	5 min	1
Tenuta	10 °C	tenuta	tenuta	–

Le librerie sono state generate utilizzando la guida di riferimento TruSight Oncology 500 High-Throughput⁶ mediante il protocollo EL-PCR standard o modificato. Il protocollo EL-PCR modificato ha prolungato il tempo di amplificazione da 41 a 57 minuti. Le librerie preparate sono state sequenziate sul NovaSeq™ 6000 Sequencing System utilizzando la cella a flusso S2 e una lunghezza di lettura di 2 × 101 bp. L'analisi è stata eseguita con il software DRAGEN™ TruSight Oncology 500 Analysis v2.1.0.

Risultati

È stato osservato un miglioramento della copertura della regione del promotore *TERT* ricco di GC e della maggior parte delle regioni ricche di GC nelle librerie preparate con il protocollo EL-PCR modificato (Figura 1 e Figura 2). Allo stesso tempo, la copertura delle regioni non ricche di GC è rimasta elevata e non sembrava influenzata dalle modifiche al protocollo EL-PCR (Figura 3). I risultati sono stati confermati da ulteriori studi su campioni positivi per cancro alla vescica, alle ossa, al seno, ai reni, ai polmoni, alla pelle o all'utero.⁷ È importante notare che la qualità del campione originale influisce sui risultati; i campioni di qualità superiore, quelli con un ΔCq più basso, mostreranno una copertura migliore rispetto ai campioni di qualità inferiore.

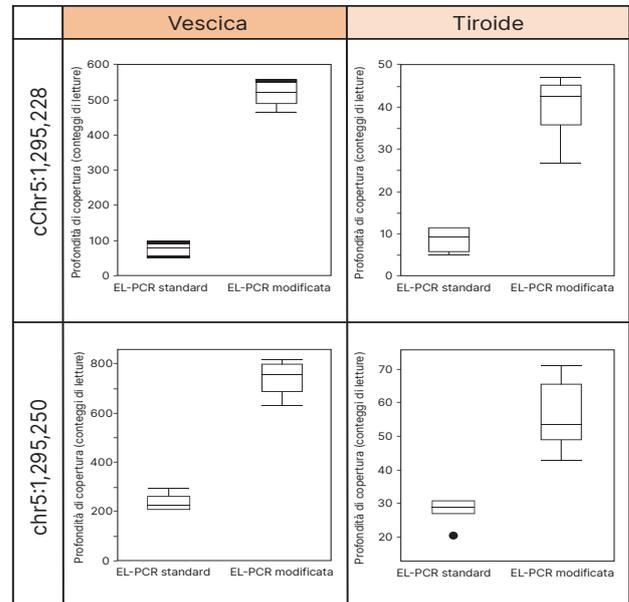


Figura 1: migliore copertura del promotore *TERT* utilizzando il protocollo EL-PCR modificato. Analisi mostrata per due posizioni di mutazioni hotspot ricorrenti nel promotore *TERT*, chr5:1,295,228 e chr5:1,295,250 in campioni di cancro alla vescica (n = 8) e alla tiroide (n = 6). Se mutati, questi siti mostrano una transizione da citidina a timidina.³

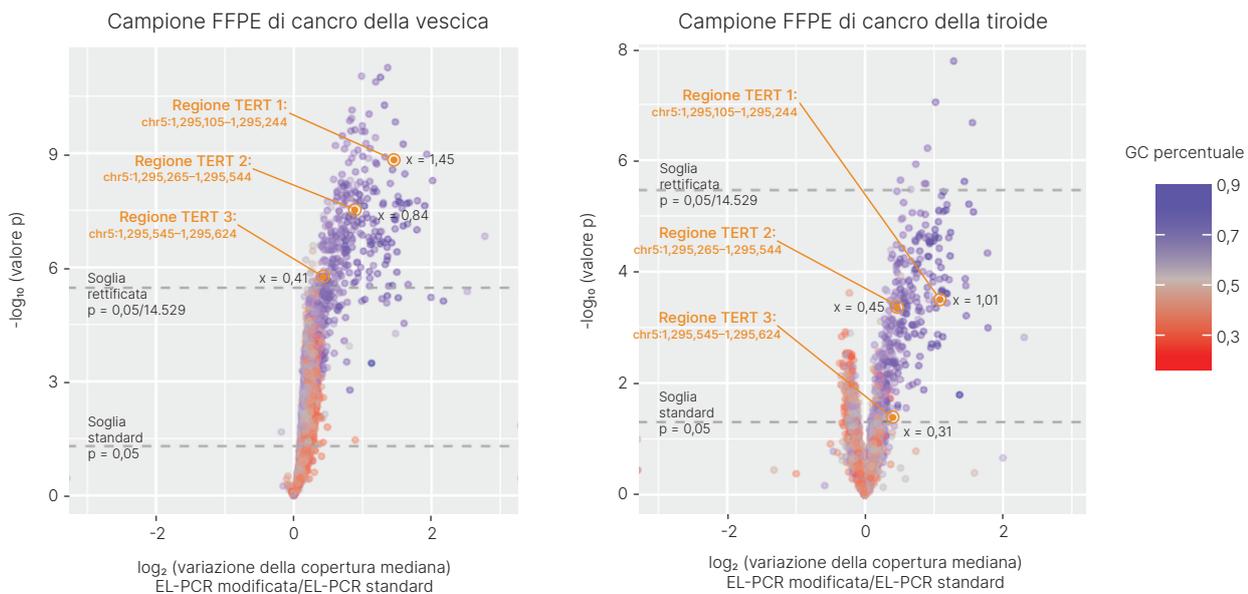


Figura 2: il protocollo EL-PCR modificato aumenta la copertura della maggior parte delle regioni ricche di GC. TruSight Oncology 500 High-Throughput con il protocollo EL-PCR modificato è stato utilizzato per analizzare campioni FFPE di cancro della vescica e della tiroide. I dati FASTQ sono stati sottoposti a un downsampling a 100 milioni di coppie di lettura per l'analisi mediante volcano plot. I grafici mostrano l'analisi statistica rispetto al fold change della copertura. Sono visualizzati i valori p di soglia standard ($p < 0,05$) e rettificati ($p < 0,05/14.529$). La X indica il fold change tra i protocolli EL-PCR modificati e quelli standard per la particolare regione della sonda.

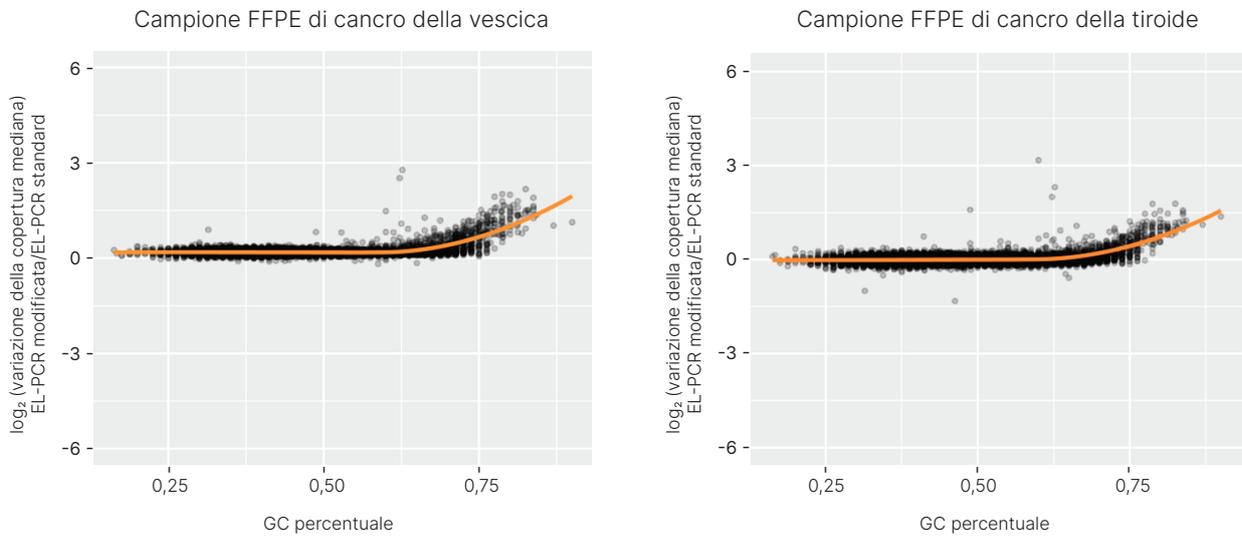


Figura 3: si è continuato a osservare prestazioni elevate per le regioni non ricche di GC. Il protocollo EL-PCR modificato migliora la copertura delle regioni ricche di GC, ma non influisce sulle prestazioni complessive del saggio. I punti dati corrispondenti alle regioni con percentuale di GC maggiore del 70% tendono verso l'alto, mentre quelli con percentuale inferiore al 70% rimangono costanti, il che indica che l'aumento di copertura osservato non estrae in modo significativo le letture da altre regioni.

Riepilogo

Le porzioni del genoma ricche di GC, come ad esempio il promotore *TERT*, possono porre alcune complessità per NGS. Aumentando i tempi di ciclo durante la fase EL-PCR nel protocollo di preparazione delle librerie TruSight Oncology 500 High-Throughput è possibile aumentare la copertura di queste regioni potenzialmente problematiche, mantenendo le elevate prestazioni osservate nelle regioni non ricche di GC.

Domande

Contattare l'indirizzo techsupport@illumina.com

Bibliografia

1. Bell RJA, Rube HT, Xavier-Magalhães A, et al. [Understanding TERT Promoter Mutations: a Common Path to Immortality](#). *Mol Cancer Res*. 2016;14(4):315-323. doi:10.1158/1541-7786.MCR-16-0003
2. Horn S, Figl A, Rachakonda PS, et al. [TERT Promoter Mutations in Familial and Sporadic Melanoma](#). *Science*. 2013;339(6122):959-961. doi:10.1126/science.1230062
3. Huang FW, Hodis E, Xu MJ, Kryukov GV, Chin L, Garraway LA. [Highly recurrent TERT promoter mutations in human melanoma](#). *Science*. 2013;339(6122):957-959. doi:10.1126/science.1229259
4. Killela PJ, Reitman ZJ, Jiao Y, et al. [TERT promoter mutations occur frequently in gliomas and a subset of tumors derived from cells with low rates of self-renewal](#). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(15):6021-6026. doi:10.1073/pnas.1303607110
5. Kang SY, Kim DG, Kim H, et al. [Direct comparison of the next-generation sequencing and iTERT PCR methods for the diagnosis of TERT hotspot mutations in advanced solid cancers](#). *BMC Med Genomics*. 2022;15:25. doi:10.1186/s12920-022-01175-2
6. Illumina. TruSight Oncology 500 High Throughput Reference Guide (1000000094853). <https://support.illumina.com/downloads/trusight-oncology-500-ht-reference-guide.html>. Pubblicato il 15 aprile 2022. Consultato il 5 dicembre 2023.
7. Dati in archivio. Illumina, Inc. 2023.



Numero verde 1.800.809.4566 (U.S.A.) | Tel. +1.858.202.4566
techsupport@illumina.com | www.illumina.com

© 2024 Illumina, Inc. Tutti i diritti riservati. Tutti i marchi di fabbrica sono di proprietà di Illumina, Inc. o dei rispettivi proprietari.
Per informazioni specifiche sui marchi di fabbrica, visitare la pagina web www.illumina.com/company/legal.html.
M-GL-02492 ITA v1.0