

# Maior cobertura do promotor do *TERT* usando o TruSight™ Oncology 500 High-Throughput

Uma simples modificação do protocolo melhora o desempenho em regiões ricas em GC



## Introdução

O comprimento do telômero tem associações conhecidas com várias doenças humanas, incluindo câncer. A enzima transcriptase reversa da telomerase (telomerase reverse transcriptase, TERT) desempenha um papel fundamental na manutenção dos telômeros. Foram encontradas mutações dentro do promotor de *TERT* em mais de 50 tipos de câncer.<sup>1</sup> Em particular, duas mutações de hotspot dentro do promotor de *TERT* foram encontradas em 71% dos melanomas<sup>2,3</sup> e em 83% dos glioblastomas<sup>4</sup>, tornando o sequenciamento preciso dessa região do gene crítico para aplicações prognósticas. No entanto, a região promotora de *TERT* é rica em GC, consistindo em > 80% de bases de GC<sup>5</sup>, o que complica a amplificação e o sequenciamento do DNA.

Nesta nota técnica, descrevemos uma modificação na etapa de amplificação de bibliotecas enriquecidas (EL-PCR) dentro do protocolo TruSight Oncology 500 High-Throughput que otimiza a amplificação e o subsequente sequenciamento de regiões ricas em GC, como o promotor de *TERT*, sem comprometer o desempenho de porções não ricas em GC do genoma. Resultados semelhantes foram demonstrados com o TruSight Oncology 500 (dados não mostrados).

## Métodos

### Protocolo EL-PCR modificado

Durante a preparação da biblioteca, sondas contendo sequências de amplificação de PCR e adaptadores de sequenciamento se ligam a regiões específicas do DNA. Esses fragmentos de DNA são amplificados por PCR e purificados antes de serem carregados em uma lâmina de fluxo que liga os fragmentos usando os adaptadores ligados. Como observado anteriormente, regiões ricas em GC podem ser problemáticas para amplificação de PCR, resultando em rendimentos mais baixos e cobertura mais baixa dessas regiões durante o sequenciamento de última geração (NGS). Para superar os desafios nas regiões ricas em GC experimentados no NGS, os cientistas da Illumina aumentaram os tempos de ciclo durante a amplificação final (EL-PCR) de bibliotecas no protocolo TruSight Oncology 500 High-Throughput (Tabela 1).

### Condições experimentais

O teste das alterações nos tempos de ciclo foi realizado usando amostras de DNA fixadas em formalina e emblocadas em parafina (formalin-fixed paraffin-embedded, FFPE) positivas para câncer de bexiga ou tireoide e uma amostra de controle de linhagem celular SeraCare.

Tabela 1: Comparação dos protocolos EL-PCR padrão e modificado

Etapa	Temperatura (°C)	Duração padrão	Duração modificada	N.º de ciclos
Desnaturação	98 °C	30 segundos	30 segundos	1
	98 °C	10 segundos	<b>30 segundos</b>	
Ciclagem	60 °C	30 segundos	30 segundos	18
	72 °C	30 segundos	<b>60 segundos</b>	
Extensão	72 °C	5 minutos	5 minutos	1
Retenção	10 °C	retenção	retenção	–

As bibliotecas foram geradas seguindo o TruSight Oncology 500 High-Throughput Reference Guide<sup>6</sup> usando o protocolo EL-PCR padrão ou modificado. O protocolo EL-PCR modificado estendeu o tempo de amplificação de 41 para 57 minutos. As bibliotecas preparadas foram sequenciadas no NovaSeq™ 6000 Sequencing System usando a lâmina de fluxo S2 e uma duração da leitura de 2 × 101 bp. A análise foi realizada usando o DRAGEN™ TruSight Oncology 500 Analysis Software v2.1.0.

## Resultados

Foi observada uma melhora na cobertura da região promotora de *TERT* rica em GC e da maioria das regiões de alto GC para bibliotecas preparadas usando o protocolo EL-PCR modificado (Figura 1 e Figura 2). Ao mesmo tempo, a cobertura de regiões não ricas em GC permaneceu alta e não pareceu afetada por alterações no protocolo EL-PCR (Figura 3). Os resultados foram confirmados com estudos adicionais em amostras positivas para câncer de bexiga, osso, mama, rim, pulmão, pele ou útero.<sup>7</sup> É importante observar que a qualidade da amostra original afetará os resultados; amostras de maior qualidade, aquelas com ΔCq mais baixo, mostrarão melhor cobertura em comparação com amostras de menor qualidade.

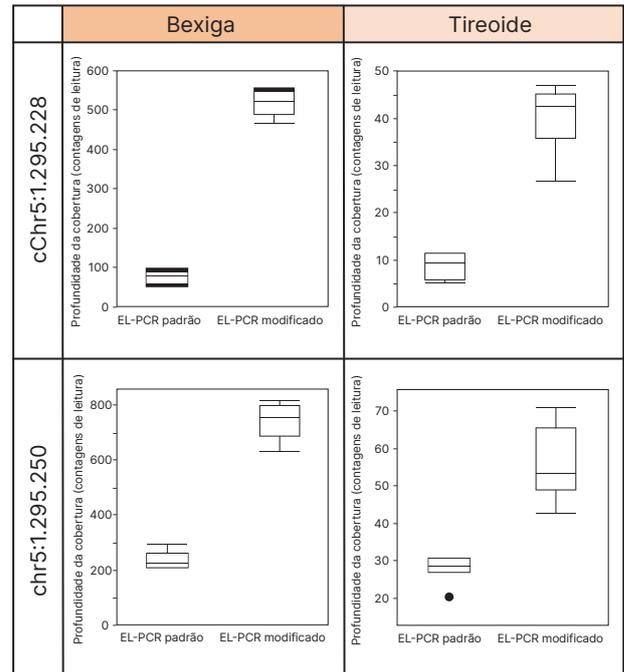


Figura 1: Melhor cobertura do promotor de TERT usando o protocolo EL-PCR modificado - Análise mostrada para duas posições de mutação de hotspot recorrentes no promotor de *TERT*, chr5:1.295.228 e chr5:1.295.250, em amostras de câncer de bexiga (n = 8) e tireoide (n = 6). Quando há mutação, esses locais mostram uma transição de citidina para timidina.<sup>3</sup>

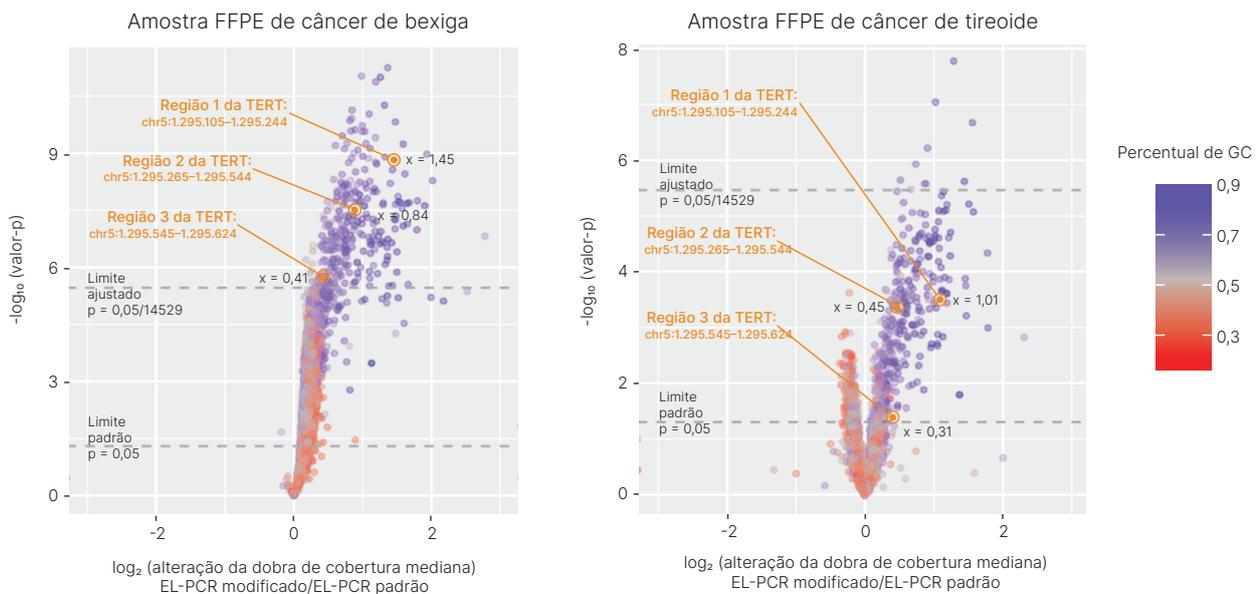


Figura 2: O protocolo EL-PCR modificado aumenta a cobertura da maioria das regiões de alto GC - O TruSight Oncology 500 High-Throughput com o protocolo EL-PCR modificado foi usado para analisar amostras FFPE de câncer de bexiga e tireoide. Os dados do FASTQ tiveram a amostra reduzida para 100 milhões de pares de leitura para análise por gráfico de vulcão. Os gráficos mostram a análise estatística versus a alteração de dobra na cobertura. Os valores-p dos limites padrão (p < 0,05) e ajustado (p < 0,05/14529) são exibidos. X indica a alteração de dobra entre os protocolos EL-PCR modificado e padrão para a região específica da sonda.

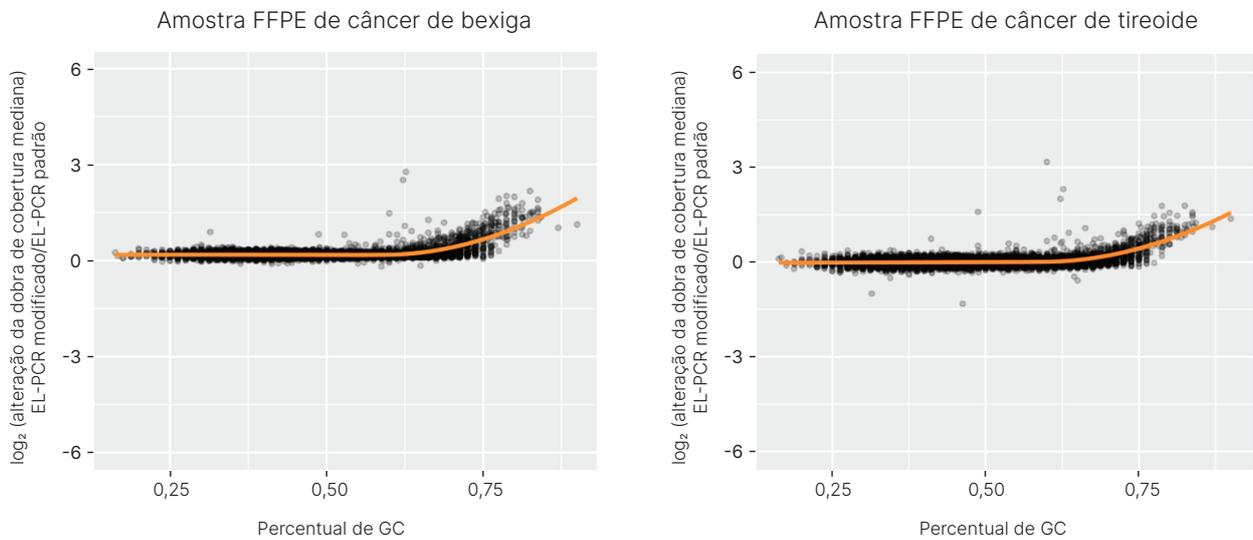


Figura 3: O alto desempenho continuou a ser observado em regiões não ricas em GC. Embora o protocolo EL-PCR modificado melhore a cobertura de regiões ricas em GC, ele não afeta o desempenho geral do ensaio. Pontos de dados correspondentes a regiões > 70% de CG mostram uma tendência crescente, enquanto aqueles < 70% de CG permanecem constantes, indicando que o aumento observado na cobertura não está obtendo leituras significativas de outras regiões.

## Resumo

As porções ricas em GC do genoma, como o promotor de *TERT*, podem representar desafios para o NGS. O aumento dos tempos de ciclo durante a etapa de EL-PCR no protocolo de preparação da biblioteca TruSight Oncology 500 High-Throughput pode aumentar a cobertura dessas regiões potencialmente problemáticas, mantendo o alto desempenho observado em regiões não ricas em GC.

## Perguntas

Contato [techsupport@illumina.com](mailto:techsupport@illumina.com)

## Referências

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>. Publicado em 15 de abril de 2022. Acessado em 5 de dezembro de 2023.
7. Dados em arquivo. Illumina, Inc., 2023.



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

© 2024 Illumina, Inc. Todos os direitos reservados. Todas as marcas comerciais pertencem à Illumina, Inc. ou aos respectivos proprietários. Para obter informações específicas sobre marcas comerciais, consulte [www.illumina.com/company/legal.html](http://www.illumina.com/company/legal.html).

M-GL-02492 PTB v1.0