

Höhere Coverage des *TERT*- Promotors mit TruSight™ Oncology 500 High-Throughput

Eine einfache Modifikation
des Protokolls verbessert
die Leistung in GC-reichen
Regionen

Einleitung

Die Telomerlänge ist bekanntermaßen mit zahlreichen Erkrankungen des Menschen assoziiert, darunter auch Krebs. Dem TERT-Enzym (Telomerase Reverse Transkriptase) kommt eine Schlüsselrolle bei der Aufrechterhaltung der Telomerlänge zu. Bei über 50 Krebsarten konnten Mutationen innerhalb des *TERT*-Promotors nachgewiesen werden.¹ Insbesondere zwei Hotspot-Punktmutationen innerhalb des *TERT*-Promotors wurden bei 71 % der Melanome^{2, 3} und 83 % der Glioblastome⁴ nachgewiesen. Damit ist eine genaue Sequenzierung dieser Region des Gens von höchster Bedeutung für prognostische Anwendungen. Die *TERT*-Promotorregion ist jedoch GC-reich. Sie besteht zu > 80 % aus GC-Basen⁵, was die DNA-Amplifikation und Sequenzierung erschwert.

In diesem technischen Hinweis wird eine Modifikation des EL-PCR-Amplifizierungsschritts (Enriched Library PCR, Polymerase-Kettenreaktion der angereicherten Bibliothek) innerhalb des TruSight Oncology 500 High-Throughput-Protokolls erläutert, die die Amplifikation und nachfolgende Sequenzierung GC-reicher Regionen wie des *TERT*-Promotors optimiert, ohne die Leistung bei nicht GC-reichen Teilen des Genoms zu beeinträchtigen. Ähnliche Ergebnisse wurden mit TruSight Oncology 500 erzielt (Daten nicht dargestellt).

Methoden

Modifiziertes EL-PCR-Protokoll

Während der Bibliotheksvorbereitung binden sich Sonden, die PCR-Amplifikationssequenzen und Sequenzierungsadapter enthalten, an bestimmte DNA-Regionen. Diese DNA-Abschnitte werden anhand der PCR amplifiziert und aufgereinigt, bevor sie in eine Fließzelle geladen werden, die die Fragmente mithilfe der ligierten Adapter bindet. Wie bereits erwähnt, sind GC-reiche Regionen bei der PCR-Amplifikation unter Umständen problematisch, was die während der NGS (Next-Generation Sequencing, Sequenzierung der nächsten Generation) für diese Region erzielten Ergebnisse und die entsprechende Coverage beeinträchtigt. Zur Überwindung der Herausforderungen im Zusammenhang mit GC-reichen Regionen bei der NGS haben Illumina-Wissenschaftler die Zykluszeiten während der finalen Amplifikation (EL-PCR) der Bibliotheken im TruSight Oncology 500 High-Throughput-Protokoll verlängert ([Tabelle 1](#)).

Versuchsbedingungen

Die Auswirkungen der Zykluszeiten wurden anhand von FFPE-DNA-Proben (formalinfixiert, in Paraffin eingebettet) ermittelt, die für Blasen- oder Schilddrüsenkrebs positiv waren, sowie anhand einer SeraCare-Zelllinienkontrollprobe. Die Bibliotheken wurden gemäß dem TruSight Oncology 500 High-Throughput Reference Guide (Referenzhandbuch zu TruSight Oncology

Tabelle 1: Vergleich zwischen Standard- und modifiziertem EL-PCR-Protokoll

Schritt	Temperatur (°C)	Dauer (Standard)	Dauer (modifiziert)	Anzahl der Zyklen
Denaturierung	98 °C	30 s	30 s	1
Zyklen	98 °C	10 s	30 s	18
	60 °C	30 s	30 s	
Zyklen	72 °C	30 s	60 s	18
	72 °C	30 s	30 s	
Erweiterung	72 °C	5 min	5 min	1
Bereithalten	10 °C	bereithalten	bereithalten	–

500 High-Throughput)⁶ unter Verwendung des Standard- oder modifizierten EL-PCR-Protokolls erstellt. Durch das modifizierte EL-PCR-Protokoll verlängerte sich die Amplifikationsdauer von 41 auf 57 Minuten. Die vorbereiteten Bibliotheken wurden auf dem NovaSeq™ 6000 Sequencing System mit der S2-Fließzelle und einer Read-Länge von 2 × 101 bp sequenziert. Die Analyse erfolgte mithilfe der DRAGEN™ TruSight Oncology 500 Analysis Software v2.1.0.

Ergebnisse

Für Bibliotheken, die mit dem modifizierten EL-PCR-Protokoll erstellt wurden, wurde eine Erhöhung der Coverage GC-reichen *TERT*-Promotorregion sowie der meisten GC-reichen Regionen beobachtet (Abbildung 1 und Abbildung 2). Gleichzeitig blieb die Coverage nicht GC-reicher Regionen hoch. Es zeigte sich keine Beeinträchtigung durch Änderungen des EL-PCR-Protokolls (Abbildung 3). Die Ergebnisse konnten im weiteren Verlauf auch an Proben bestätigt werden, die für Blasen-, Knochen-, Brust-, Nieren-, Lungen-, Haut- oder Gebärmutterkrebs positiv waren.⁷ Hierbei ist unbedingt zu beachten, dass die Qualität der Ausgangsprobe die Ergebnisse beeinflusst. Proben mit höherer Qualität (Proben mit einem niedrigeren ΔCq) zeigen im Vergleich zu Proben mit niedrigerer Qualität eine höhere Coverage.

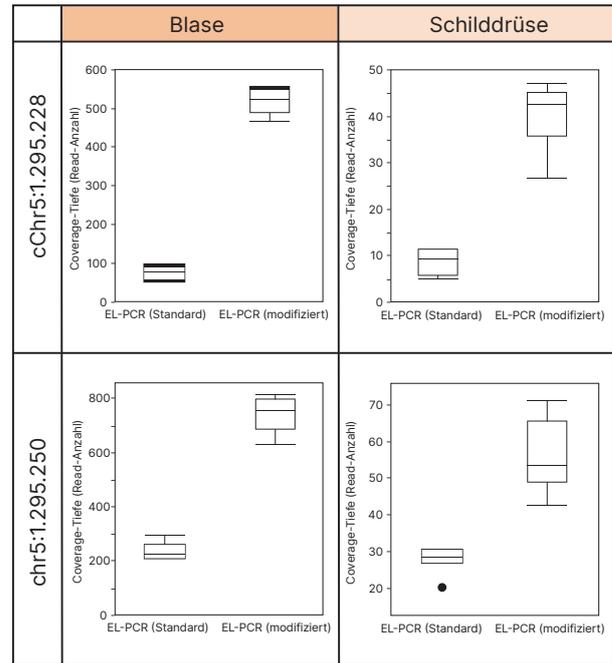


Abbildung 1: Höhere *TERT*-Promotor-Coverage mithilfe des modifizierten EL-PCR-Protokolls: Analyse für zwei rezidivierende Hotspot-Mutationspositionen im *TERT*-Promotor, chr5:1.295.228 und chr5:1.295.250 in Blasen- (n = 8) und Schilddrüsenkrebsproben (n = 6). Im Fall einer Mutation zeigt sich bei diesen Loci eine Cytidin-Thymidin-Transition.³

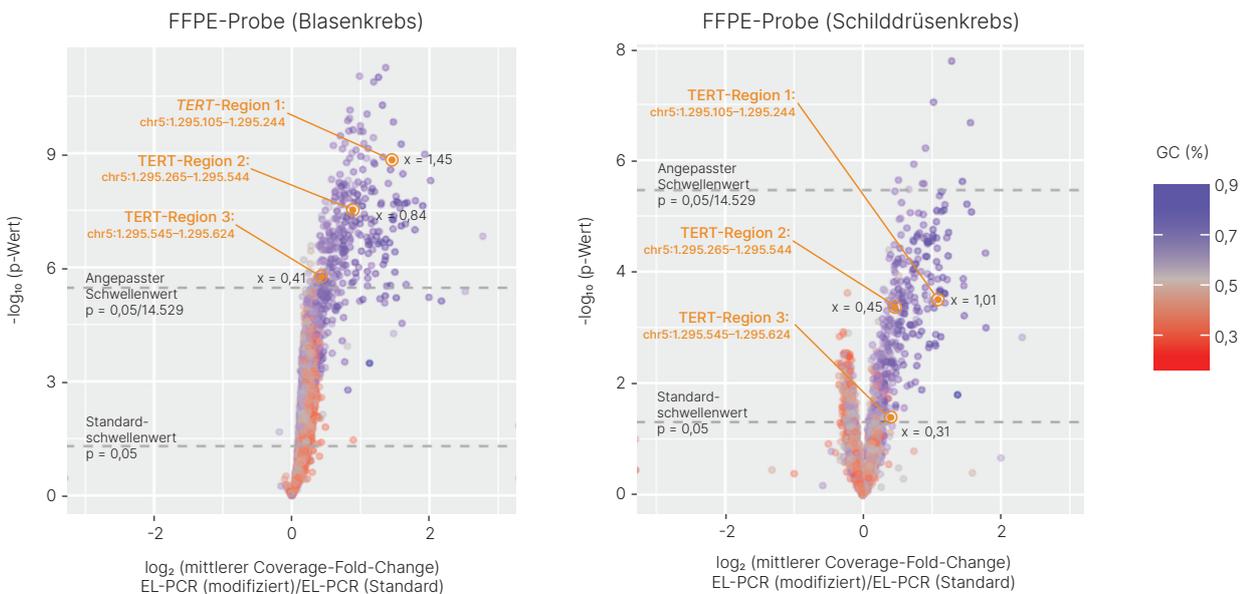


Abbildung 2: Das modifizierte EL-PCR-Protokoll erhöht die Coverage der meisten GC-reichen Regionen: TruSight Oncology 500 High-Throughput mit dem modifizierten EL-PCR-Protokoll wurde zur Analyse von Blasen- und Schilddrüsenkrebs-FFPE-Proben verwendet. FASTQ-Daten wurden für die Volcano-Plot-Analyse einem Downsampling auf 100 Mio. Read-Paare unterzogen. Die Diagramme zeigen statistische Analysen im Vergleich zum Fold-Change der Coverage. Es werden Standard- ($p < 0,05$) und angepasste ($p < 0,05/14,529$) p-Schwellenwerte dargestellt. X gibt den Fold-Change zwischen dem modifizierten und dem Standard-EL-PCR-Protokoll für den jeweiligen Sondenbereich an.

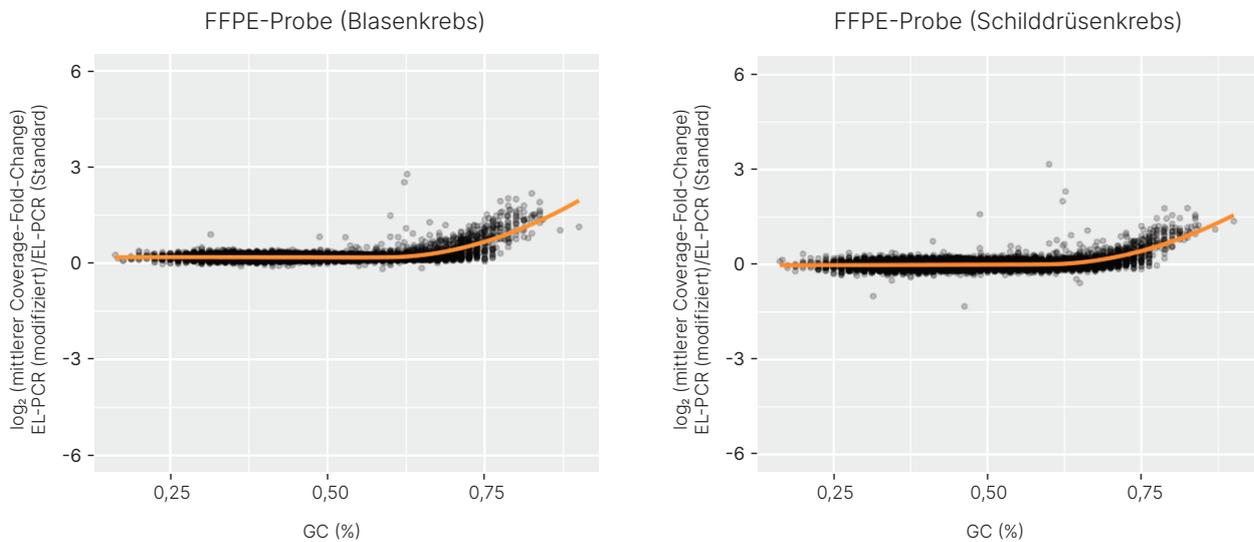


Abbildung 3: In den nicht GC-reichen Regionen wurde weiterhin eine hohe Leistung beobachtet: Das modifizierte EL-PCR-Protokoll verbessert die Coverage GC-reicher Regionen ohne Beeinträchtigung der Gesamtleistung des Assays. Datenpunkte, die Regionen > 70 % GC entsprechen, zeigen einen Aufwärtstrend, während diejenigen < 70 % GC konstant bleiben. Dies deutet darauf hin, dass die beobachtete Erhöhung der Coverage nicht mit einer Verringerung der Read-Anzahl in anderen Regionen einhergeht.

Zusammenfassung

GC-reiche Genomabschnitte wie der *TERT*-Promotor sind bei der NGS unter Umständen problematisch. Die Verlängerung der Zykluszeiten beim EL-PCR-Schritt im TruSight Oncology 500 High-Throughput-Protokoll zur Bibliotheksvorbereitung kann die Coverage dieser potenziell problematischen Regionen erhöhen, ohne die in nicht GC-reichen Regionen beobachtete hohe Leistung zu beeinträchtigen.

Fragen

Kontakt: techsupport@illumina.com

Quellen

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>. Veröffentlicht am 15. April 2022. Aufgerufen am 5. Dezember 2023.
7. Archivdaten. Illumina, Inc. 2023.



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

© 2024 Illumina, Inc. Alle Rechte vorbehalten. Alle Marken sind Eigentum von Illumina, Inc. bzw. der jeweiligen Inhaber. Spezifische Informationen zu Marken finden Sie unter www.illumina.com/company/legal.html.
M-GL-02492 DEU v1.0