



**SARDEGNA  
RICERCHE**

**Sardegna FESR 2014/2020 - ASSE PRIORITARIO I**

**“RICERCA SCIENTIFICA, SVILUPPO TECNOLOGICO E INNOVAZIONE”**

**Azione 1.1.4 Sostegno alle attività collaborative di R&S per lo sviluppo di nuove tecnologie  
sostenibili, di nuovi prodotti e servizi**

Progetto cluster Top Down  
“NIASMIC - Not Invasive Analysis of Somatic  
Mutations In Cancer”

Rapporto Tecnico  
Rilascio del protocollo per l'isolamento e il  
sequenziamento del ctDNA

0/5



### **RAPPORTO R3.3 Protocollo sperimentale per l'isolamento e il sequenziamento del ctDNA.**

Il progetto NIASMIC si propone di sviluppare un protocollo di analisi del profilo genetico del DNA estratto da biopsia liquida di pazienti oncologici, mediante l'applicazione del sequenziamento NGS, per fornire delle informazioni genetiche utili sia per una diagnosi precoce e più precisa, che per la personalizzazione della terapia. Nel seguito sono riportate le procedure di riferimento da impiegare nel progetto per l'estrazione e il sequenziamento del ctDNA.

L'uso della NGS per la biopsia liquida richiede modifiche dei protocolli normalmente usati per analisi su sangue e tessuti. Il tasso di errore dell'NGS varia da 0,1 a 1% quindi, ad esempio, una mutazione con una frequenza allelica sotto tale soglia non può essere differenziata dal cosiddetto "rumore di fondo". Per identificare gli opportuni protocolli operativi dedicati alla biopsia liquida occorre quindi tenere presente la necessità di limitare, ove possibile, il tasso di errore del procedimento utilizzato.

Nel caso in oggetto, i campioni di sangue verranno processati seguendo un protocollo, brevemente descritto nel seguito, per la cui definizione sono state consultate pubblicazioni inerenti l'analisi del DNA libero circolante (cell free DNA, cfDNA) e utilizzati i risultati ottenuti da precedenti esperienze del laboratorio di sequenziamento del CRS4.

I campioni di sangue saranno sottoposti ad una doppia centrifugazione per il recupero del plasma e l'eliminazione della frazione corpuscolata. Il plasma ottenuto verrà aliquotato in diverse provette, una delle quali verrà usata immediatamente per l'estrazione da fresco del cfDNA, mentre le restanti aliquote saranno conservate a -80°C come backup in caso di necessità, ad esempio per consentirne l'utilizzo per poter eseguire ulteriori indagini molecolari anche a distanza di tempo.

Dopo la prima centrifugazione verrà recuperato anche il buffy coat rappresentato dalle cellule nucleate per l'estrazione del DNA costituzionale del paziente.

Esistono molti metodi per l'estrazione del cfDNA, che comprendono sia l'utilizzo di kit commerciali che di protocolli sviluppati dai laboratori. A causa della piccola quantità e della natura molto frammentata del cfDNA nel plasma (<1.000 bp), per generale consenso si ritiene che non dovrebbero essere utilizzate metodiche di estrazione validate su campioni tissutali o su altre matrici biologiche. Si ritiene, infatti che il metodo di estrazione debba essere molto affidabile e



## SARDEGNA RICERCHE

debba in particolare generare quanto più DNA possibile del campione in esame, per non compromettere il risultato dell'analisi e generare risultati falsi negativi o positivi.

Per l'estrazione e la purificazione del cfDNA da plasma sono oggi disponibili vari kit commerciali dedicati a questo specifico uso. Questi kit sono in genere basati sull'utilizzo di colonnine dotate di membrane di silice, in associazione con pompa a vuoto, oppure sull'impiego di biglie magnetiche, per la cattura degli acidi nucleici.

Nel caso in studio, l'estrazione del cfDNA verrà svolta con l'utilizzo del kit commercializzato dalla QIAGEN denominato QIAamp circulating nucleic acid kit. La preparazione delle librerie sarà svolta con un protocollo basato sulla combinazione di diverse soluzioni commerciali. Il kit TruSeq Nano della Illumina, associato agli xGen Dual Index UMI Adapters (Unique Molecular Identifiers, Kivioja et al., 2012; Islam et al., 2014) commercializzati da IDT, permettono di ottenere librerie da esili quantità di DNA frammentato e di distinguere le varianti genetiche presenti nel campione da quelle introdotte in-vitro dalla PCR e dal sequenziamento. Inoltre, l'utilizzo di questi speciali adattatori facilitano il riconoscimento dei duplicati di PCR dalle sequenze originarie del campione permettendo un'analisi quantitativa più fine.

Per il sequenziamento delle librerie genomiche sono state valutate le seguenti strategie:

- sequenziamento di tutto l'esoma o Whole Exome Sequencing (WES): include le sequenze codificanti, circa l'1,5% di tutto il genoma. I diversi kit commercializzati, ognuno con caratteristiche specifiche, si differenziano per le dimensioni della regione target da sequenziare, con o senza UTR, smallRNA, long non-coding RNA, molecole di RNA regolatorie. Questa strategia, se da un lato consente di avere una visione completa delle regioni codificanti presenti nel ctDNA, con una sensibilità paragonabile a quella del target sequencing su geni mirati (Keppel et., 2017), dall'altro presenta ovviamente dei costi di sequenziamento più elevati rispetto ad un pannello focalizzato su una frazione delle regioni codificanti dell'esoma.
- pannelli genici predefiniti: focus su set di geni associati a varie patologie, e.g. Illumina TruSight Tumor 170 che comprende 170 geni coinvolti in vari tumori solidi comuni. Dato che i pannelli coprono una regione di taglia inferiore a quella del WES, diminuiscono i costi di sequenziamento ed è facilitata l'interpretazione dei risultati. Tali pannelli possono essere a loro volta divisi in pannelli ad ampio spettro, come nel caso del TruSight Tumor 170 (170 geni) o IDT xGen Pan-Cancer Panel (127 geni), o focalizzati su un numero inferiore di geni, come per esempio il TruSight Tumor 15 (15 geni frequentemente mutati nei tumori solidi).



**SARDEGNA  
RICERCHE**

- pannelli custom: focus su un determinato elenco di geni o di regioni genomiche di interesse. I pannelli customizzati possono avere diverse grandezze ed il loro costo dipende dalla grandezza del target e soprattutto dal numero di campioni per il quale viene richiesta la produzione. Per la creazione di pannelli custom, è di particolare interesse la strategia proposta dalla Integrated Dna Technologies (IDT) che consente di acquistare singolarmente delle sonde pre-disegnate disponibili per tutti i geni (IDT xGen Predesigned Gene Capture Pools). Il vantaggio di questo approccio è quello di poter variare la composizione dei pool genici per la cattura, in funzione della tipologia di tumore studiato e per ampliare il pannello sulla base di aggiornamenti dalla letteratura scientifica.

Alla luce delle considerazioni sopra esposte, le librerie genomiche saranno successivamente sottoposte ad un protocollo di target capture con un pannello custom per la selezione dei geni d'interesse mediante sonde acquistate dalla IDT (Integrated DNA Technologies). Il sistema di cattura è stato selezionato sulla base di un'analisi di mercato delle principali aziende produttrici di reagenti per il sequenziamento NGS, con cui sono stati organizzati degli incontri nel corso del primo semestre (Qiagen, Agilent, SophiaGenetics, Illumina Integrated DNA Technologies). Sono state inoltre considerate le indicazioni della recente letteratura e le esperienze acquisite nel laboratorio di sequenziamento del CRS4.

Il protocollo scelto è parzialmente automatizzabile utilizzando la strumentazione presente nel laboratorio di sequenziamento del CRS4. Nel corso degli anni, presso il laboratorio di sequenziamento del CRS4 sono stati sviluppati protocolli per l'esecuzione di alcuni passaggi di purificazione delle librerie e la loro applicazione garantirà maggiore uniformità tra i campioni e maggiore processività.

## Bibliografia

1. Alidousty C et al. (2017) *Comparison of Blood Collection Tubes from Three Different Manufacturers for the Collection of Cell-Free DNA for Liquid Biopsy Mutation Testing*. The Journal of Molecular Diagnostics, September 2017, Pages 801-804
2. Sorber L et al. (2017) *A Comparison of Cell-Free DNA Isolation Kits: Isolation and Quantification of Cell-Free DNA in Plasma*. The Journal of Molecular Diagnostics, January 2017, Pages 162-168



**SARDEGNA  
RICERCHE**

3. Diefenbach RJ et al. (2018), *Evaluation of commercial kits for purification of circulating free DNA*, Cancer Genetics, Volumes 228–229, December 2018, Pages 21-27
4. Islam S, Zeisel A, Joost S, La Manno G, Zajac P, Kasper M, Lönnerberg P, Linnarsson S (2014). *Quantitative single-cell RNA-seq with unique molecular identifiers*. Nat. Methods. 11 (2): Pages 163–6
5. Kivioja T et al. (2012) *Counting absolute numbers of molecules using unique molecular identifiers*. Nat. Methods , 9, Pages 72–74.
6. Koeppel F, et al. (2017) *Whole exome sequencing for determination of tumor mutation load in liquid biopsy from advanced cancer patients*. PLoS ONE 12(11): e0188174. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0188174>
7. Gruppo di Lavoro AIOM – SIAPEC-IAP – SIF – SIBioC (2018) *Raccomandazioni per l'esecuzione di test molecolari su biopsia liquida in oncologia*. Luglio 2018 <https://www.aiom.it/pubblicazioni/raccomandazioni-position-paper/raccomandazioni-per-lesecuzione-di-test-molecolari-su-biopsia-liquida-in-oncologia-luglio-2018/>