



# MS-MLPA

## Methylation-Specific Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification

### Introduzione

Il laboratorio Cancer Genetic Test (CGT Lab) di Cogentech ha sviluppato test di diagnostica molecolare per individuare e valutare le varianti patogeniche che predispongono il paziente e i suoi familiari ad un più elevato rischio di sviluppo di tumori, permettendo all'oncologo di formulare diagnosi tempestive ed accurate per un miglior indirizzo del trattamento il paziente. Nei nostri laboratori vengono effettuati test diagnostici per diverse tipologie di tumori ereditari e test per la ricerca di varianti predittive della risposta ad alcune terapie, in particolare Parp inibitori.

Vi sono evidenze che alcuni tipi di tumore sono soggetti a difetti di metilazione: in particolare negli ultimi anni è stato raccomandato l'utilizzo di un test universale su carcinomi coloretali ed endometriali per l'identificazione della Sindrome di LYNCH, che prevede, tra l'altro, l'analisi dello stato di metilazione del promotore del gene MLH1 per identificare correttamente i soggetti da sottoporre al test genetico dei geni MMR, e poi, in presenza di varianti patogenetiche di suscettibilità, poter eventualmente applicare, a cascata, i test predittivi sui loro famigliari.

L'MS-MLPA è una tecnica semiquantitativa e non automatizzata in grado di valutare sia il numero di copie che lo stato di metilazione di una sessantina di sequenze grazie a una PCR multiplex.

### MS-MLPA (Methylation-Specific Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification)

Il principio dell'MS-MLPA si basa sull'amplificazione di un massimo di 60 sonde per ogni kit, ciascuna delle quali è specifica per una determinata sequenza di DNA. La reazione ha come risultato una serie di ampliconi di specifica lunghezza compresa tra 64 e 500 nt, separati mediante elettroforesi capillare.

Dopo una denaturazione iniziale del DNA del campione, vengono aggiunte le sonde che sono costituite da due oligonucleotidi che devono ibridarsi con sequenze target direttamente adiacenti per poter essere ligati in un'unica sonda.

Durante la successiva reazione di PCR, tutte le sonde legate vengono amplificate simultaneamente utilizzando la stessa coppia di primer, ottenendo una serie di ampliconi unici. Uno dei primers è marcato con un fluorocromo, consentendo la visualizzazione dei prodotti di amplificazione dopo separazione dei frammenti con elettroforesi capillare. La separazione dei frammenti produce un elettroferogramma specifico del campione.

Alcune delle sonde sono specifiche per una regione che contiene un sito di restrizione per l'endonucleasi HhaI sensibile alla metilazione. Dopo la fase di ibridazione la reazione viene sdoppiata e una parte continuerà il protocollo standard di MLPA (per dare le informazioni sul numero di copie) mentre l'altra metà verrà prima digerita con l'enzima di restrizione prima dell'amplificazione (per avere l'informazione sullo stato di metilazione)

Se il DNA non è metilato, le sonde specifiche della metilazione verranno legate e simultaneamente digerite da HhaI e quindi non verrà più amplificata. Al contrario, quando la sequenza target della sonda MS-MLPA è metilata, il gruppo metilico impedirà la digestione HhaI. Una sonda non digerita e legata può essere amplificata durante la PCR, ottenendo un segnale di picco normale.

MS-MLPA è una tecnica relativa: solo le differenze relative possono essere rilevate confrontando i picchi del campione con quelli di campioni di riferimento. L'inclusione di campioni di riferimento all'interno di ciascun esperimento è quindi essenziale.

Le condizioni di amplificazioni sono semiquantitative per cui l'altezza relativa di ogni singolo picco, rispetto alle altezze relative dei picchi della sonda in vari campioni di DNA di riferimento, riflette il numero di copie della sequenza target corrispondente in un campione. L'inclusione di campioni di riferimento nella stessa analisi è quindi essenziale. L'eliminazione di una o più sequenze target è visibile come una diminuzione relativa dell'altezza del picco, mentre un aumento dell'altezza relativa del picco riflette un aumento del numero di copie.

I software utilizzati per l'analisi sono Gene Marker v.3.0.1 (SoftGenetics) e Coffalyser.Net v. 220513.1739 (MRC-Holland).

Il protocollo analitico utilizzato ha una sensibilità del 99% e una specificità del 97% nell'identificare estese delezioni/duplicazioni (Vorstman et al., Hum Mutat;27(8), 2006); e un'alta sensibilità e specificità nell'identificare alterazioni dei livelli di metilazione dei promotori (Nygren et al., Nucleic Acids Res. 33:e128, 2005).



MS-MLPA | Version 1.0 date 01.09.2023

Sono disponibili in commercio kit SALSA MS-MLPA forniti dalla ditta MRC-Holland (la maggior parte marchiati CE-IVD) con sonde specifiche per geni di interesse, in particolare ME011 per i geni del Mismatch repair. Il test può essere eseguito su DNA genomico (gDNA) ottenuto dal prelievo ematico del paziente o estratto da tessuto tumorale incluso in paraffina (FFPE).

### Limiti dell'analisi

L'MS-MLPA non è in grado di rilevare alcuna delezione o duplicazione o metilazione che si trovi al di fuori della sequenza target delle sonde e non è in grado di rilevare inversioni o traslocazioni bilanciate.

Inoltre varianti sotto le sonde o nelle immediate vicinanze possono dare falsi positivi per cui bisogna sempre verificare tale evenienza nel caso venga persa un'unica sonda.

In caso di scarsa denaturazione del DNA del campione, possono dare falsi positivi in particolare le regioni cromosomiche estremamente ricche di GC non vengono denaturate a 98°C quando sono presenti più di 40 mM NaCl o KCl.

La maggior parte delle sonde MS-MLPA rilevano la metilazione del primo nucleotide della citosina in un singolo sito HhaI trovato all'interno della sequenza rilevata dalla sonda (GmCGC). Se la metilazione è assente per questo particolare sito CpG, non significa necessariamente che l'intera isola CpG non sia metilata.

Lo stato di metilazione può essere diverso in diversi tessuti; per esempio, le sequenze metilate nel DNA derivato da sangue potrebbero essere non metilate nel DNA derivato dal liquido amniotico.

MRC Holland fornisce una scheda per ogni kit che descrive il disegno delle sonde e lo scopo del pannello a cui si deve far riferimento per l'analisi.

### Conclusioni

L'MS-MLPA è una metodica affidabile, riproducibile e veloce, grazie anche alla stabilità ed efficienza dei kit commerciali utilizzati e all'accuratezza e precisione dei software di analisi di cui il nostro laboratorio dispone.